

Revista

IBEROAMERICANA

de

Micología

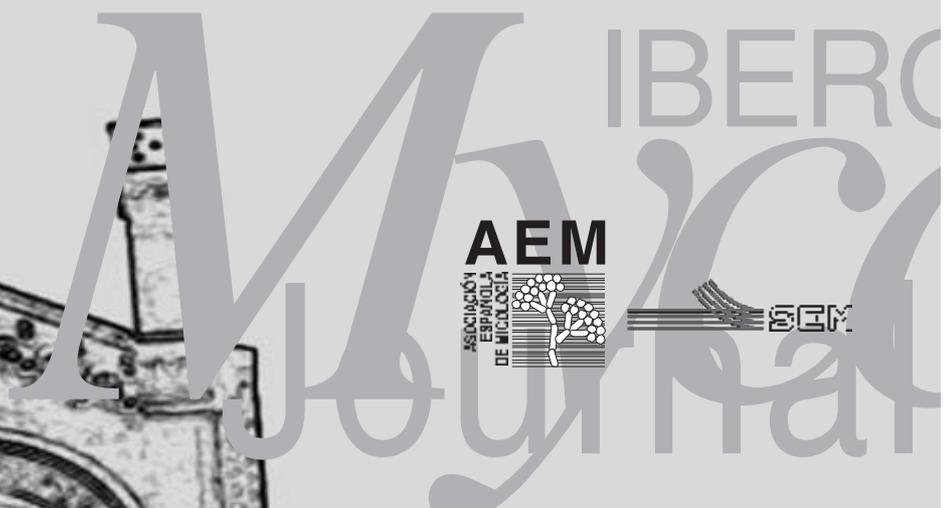
volumen

23

VIII Congreso Nacional **MICOLOGIA** Barcelona 2006

19 - 22 de Octubre de 2006

Libro
de
Resúmenes



VIII Congreso Nacional MICOLOGIA Barcelona 2006

Presidente: Ferran Sánchez Reus

Comité Ejecutivo: Joseba Bikandi Bikandi
Eduardo Espeso Fernández
Mónica López Daunes
Carme Muñoz Batet
Roser Pericas Pagès
Isabel Ruiz Camps

Comité Científico: Josefina Ayats Ardite
Jose Luis Barrio Medrano
Joseba Bikandi Bikandi
Fco. Javier Cabañes Sáenz
Eduardo Espeso Fernández
Josep Guarro Artigas
Merce Gurgui Ferrer
Jordi Puig de la Bellacasa Brugada
Virginia Rodríguez Garrido
Isabel González Roncero
Eva Rosello Mayans
Ferran Sánchez Reus
Josep M^a Torres Rodríguez



Actividad acreditada por el
Consell Català de la Formació Mèdica Continuada
Comisión de Formación Continuada del Sistema Nacional de Salud
con 2,2 créditos



Actividad con reconocimiento de interés sanitario
otorgado por el *Institut d'Estudis de la Salut (IES)*
de la *Generalitat de Catalunya*

Programa índice

19 de Octubre de 2006

16:00	SESIÓN INAUGURAL: El reto de la tecnología Proteómica. Aplicaciones en el estudio de la interacción <i>Candida albicans</i> -hospedador .	S1
	<i>Concha Gil</i>	
17:00	APERTURA del CONGRESO	
17:30	SESIÓN PLENARIA 1. Epidemiología de las infecciones fúngicas invasoras en nuestro medio	S1
	<i>Moderadora: Merce Gurgui</i>	
19:30	Cóctel de bienvenida	

20 de Octubre de 2006

09:00	SESIÓN PLENARIA 2. Estudios de sensibilidad in vitro	S2
	<i>Moderador: Juan Luis Rodríguez-Tudela</i>	
11:00	Pausa café	
11:30	POSTERS	
12:30	SESIÓN AEM 1: Nuevos antifúngicos	S4
	<i>Moderador: Francisco Álvarez</i>	
	SESIÓN SEM 1: Biología del desarrollo	S5
	<i>Moderador: Eduardo Espeso</i>	
14:00	Comida de trabajo	
15:30	SESIÓN AEM 2: Nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de las micosis invasoras	S6
	<i>Moderador: Rodrigo Martino</i>	
	SESIÓN SEM 2: Respuesta a estreses	S7
	<i>Moderador: Antonio Di Pietro</i>	
17:00	Pausa café	
17:30	SESIÓN AEM 3: Dermato-micología	S8
	<i>Moderadora: Carmen Rubio</i>	
	SESIÓN SEM 3: Tecnologías recientes aplicadas a los hongos	S9
	<i>Moderadora: M^a Isabel González Roncero</i>	
21:00	Cena del VIII Congreso Nacional de Micología	

21 de Octubre de 2006

09:00	SESIÓN PLENARIA 3: Diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras	S11
	<i>Moderador: Guillermo Quindos</i>	
11:00	Pausa café	
11:30	POSTERS	
12:30	SESIÓN PLENARIA 4: Aplicación de las técnicas de Biología Molecular en Micología	S13
	<i>Moderador: Pere Coll</i>	
14:00	Comida de trabajo	
15:30	REUNIÓN ADMINISTRATIVA AEM REUNIÓN ADMINISTRATIVA SEM	
16:30	SESIÓN AEM 4: <i>Cryptococcus</i> spp. y zoonosis	S14
	<i>Moderador: Javier Cabañes</i>	
	SESIÓN SEM 4: Regulación de la expresión génica	S15
	<i>Moderador: Victoriano Garre</i>	
18:00	SESIÓN DE CLAUSURA: Contribución de la AEM al desarrollo de la Micología en España	S16
	<i>Josep M^a Torres</i>	
	COMUNICACIONES	S17
	ÍNDICE DE AUTORES	S45
	AGRADECIMIENTOS	S48

SESIÓN INAUGURAL

P1. El reto de la tecnología Proteómica. Aplicaciones en el estudio de la interacción *Candida albicans*-hospedador

Concha Gil García

Departamento de Microbiología II y Unidad de Proteómica UCM-
Parque Científico de Madrid. Facultad de Farmacia, Universidad
Complutense de Madrid. conchagil@farm.ucm.es

Desde que en 1995 se secuenció el primer organismo unicelular (*Haemophilus influenzae*) se han desarrollado numerosos proyectos de secuenciación que han hecho posible que conozcamos (Julio 2006) la secuencia del genoma de 403 organismos (27 arqueas, 335 bacterias, 41 eucariotas, incluidas 13 especies fúngicas) y que haya más de 2000 proyectos de secuenciación en marcha. Esta información es de enorme utilidad para realizar estudios de expresión génica que pueden ayudar a comprender las funciones celulares. Sin embargo, hay una serie de procesos (procesamiento alternativo del mRNA, modificaciones co- y post-traduccionales, etc.) que hacen indispensable el estudio de la expresión a nivel proteico. El conocimiento de que un gen puede dar lugar a más de una proteína demuestra que la complejidad de un organismo no sólo se ve reflejada por la secuencia de su genoma. Además, las proteínas son los motores de la mayoría de los procesos celulares.

El análisis global de mezclas complejas de proteínas ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas de separación de proteínas, y de métodos de ionización suave de péptidos para su análisis mediante espectrometría de masas y posterior identificación y caracterización. La palabra proteoma se empezó a utilizar en la mitad de los años noventa para definir el conjunto de proteínas expresadas por un genoma. Aunque inicialmente el objetivo de la proteómica fue la caracterización del proteoma de un organismo, la gran complejidad de estos estudios ha hecho que el término proteómica se utilice en estudios más concretos. La proteómica se puede subdividir en dos áreas principales, Proteómica de Expresión y Proteómica funcional. En la Proteómica de Expresión se analiza el perfil de expresión proteica en estado normal, bajo una determinada condición o en estado de enfermedad. El objetivo de estas aproximaciones es conocer en detalle los procesos moleculares implicados que posteriormente tienen que ser estudiados y validados por métodos tradicionales. Estos estudios pueden permitir la identificación de nuevos marcadores de diagnóstico/pronóstico o de potenciales dianas terapéuticas. El típico esquema de trabajo implica la utilización de técnicas de separación de proteínas, el análisis cuantitativo de la abundancia proteica relativa entre las muestras y la identificación y caracterización de las proteínas diferencialmente expresadas. En la Proteómica Funcional se aplican técnicas similares para realizar un análisis detallado de una determinada función de un sistema biológico. Aquí se incluyen los estudios de complejos proteicos y las redes de interacción de proteínas. La utilización de todas estas aproximaciones está permitiendo realizar grandes avances en las Ciencias Biomédicas. La proteómica en el campo de la Micología tiene un enorme potencial y cada vez son más numerosos los estudios que utilizan estrategias proteómicas para complementar los estudios moleculares de los microorganismos y proporcionar un mayor conocimiento de la interacción de los microorganismos patógenos con el hospedador. Nuestro grupo de investigación está interesado en el estudio de la interacción de *Candida albicans* con el hospedador. En concreto nuestros principales objetivos son: (1) descubrir nuevas dianas para agentes antifúngicos, (2) identificar marcadores de diagnóstico y pronóstico de las candidiasis sistémicas y (3) detectar proteínas candidatas para el desarrollo de vacunas. Para abordar estos objetivos hemos desarrollado y estamos poniendo a punto diversas tecnologías proteómicas en un modelo de interacción *Candida*-macrófago: proteómica de expresión (DIGE y proteómica sin gel) y fosfoproteómica. También estamos estudiando la respuesta de anticuerpos en pacientes con candidiasis sistémica (immunoproteómica) con el objetivo de desarrollar un "chip de proteínas" de utilidad en el diagnóstico de la candidiasis. Todas estas tecnologías se pueden aplicar al estudio de otros hongos y permitir un avance importante en el estudio de las enfermedades fúngicas.

MESAS REDONDAS

Sesión Plenaria 1

Epidemiología de las infecciones fúngicas invasoras en nuestro medio

Moderadora: Merce Gurgui. Hospital de Sant Pau. Barcelona

P2. Micosis invasora por *Candida*

Benito Almirante

Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario
Vall d'Hebron, Barcelona, España

La candidiasis invasora puede ocasionar más de un 10% de las infecciones nosocomiales y es responsable de más del 70% de las infecciones fúngicas adquiridas en las instituciones sanitarias. La candidemia es la cuarta causa de sepsis nosocomial y condiciona unas tasas elevadas de mortalidad. En los últimos años se ha observado un cambio en el espectro de las especies causantes de candidemia, con un incremento de las especies diferentes a *C. albicans*, en especial en población con inmunodeficiencia grave. La incidencia de la candidemia ha aumentado a lo largo del tiempo y muestra variaciones importantes entre los diferentes países. En USA la incidencia es de 8-10 episodios por 100.000 habitantes y año, mientras que esta tasa en Europa es alrededor de 3 veces inferior. La población de edades extremas de la vida, neonatos y ancianos, es la de mayor riesgo de candidemia, observándose en todos los pacientes afectos la existencia de múltiples factores de riesgo. En nuestro medio, alrededor del 50% de las candidemias están causadas por *C. albicans* y una cuarta parte por *C. parapsilosis*. La fuente de infección más común son los catéteres vasculares centrales. La tasa global de resistencia a los azoles es inferior al 10%, siendo excepcional en las candidemias por *C. albicans*. La mortalidad supera el 40%, estando relacionada con la candidemia en alrededor de la mitad de los casos. La coexistencia de la candidemia con una neoplasia hematológica es un factor asociado a la mortalidad precoz, mientras que la retirada de los catéteres vasculares y el tratamiento antifúngico son factores protectores de dicha mortalidad.

P3. Micosis invasoras por *Aspergillus*

Jordi Carratalà

Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet, Barcelona

La incidencia de las micosis oportunistas invasoras ha aumentado de forma significativa en las dos últimas décadas. Entre los hongos filamentosos *Aspergillus spp.* son los organismos responsables con mayor frecuencia de micosis invasora. Clásicamente la aspergilosis invasora (AI) afecta a pacientes con neoplasias hematológicas con neutropenia profunda y prolongada. El uso de corticosteroides, la fludarabina, el alemtuzumab, el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) alógeno, la enfermedad del injerto contra huésped (grado III-IV) son factores de riesgo asociados. En los últimos años, la población de pacientes susceptibles a desarrollar AI se ha ampliado de forma notable y los receptores de un trasplante de órgano sólido (TOS), los pacientes con EPOC en tratamiento con corticoesteroides así como otros pacientes inmunodeprimidos constituyen importantes grupos de riesgo.

Diversos aspectos epidemiológicos de la AI, en distintas poblaciones de riesgo, han sido analizados recientemente en nuestro medio. En un estudio multicéntrico de 395 TPH alogénicos, la incidencia de AI fue del 8%. En este grupo de pacientes la mortalidad supera con frecuencia el 80%. En un estudio multicéntrico de casos y controles, que incluyó un total de 156 (1.4%) AI en 11.014 TOS, se analizaron los factores de riesgo asociados a enfermedad precoz y tardía. Alrededor de un 60% de casos de ocurrieron en \approx 3 meses después del TOS (enfermedad precoz) y los factores de riesgo identificados fueron: postoperatorio complicado, infecciones bacterianas de repetición o enfermedad por CMV e insuficiencia renal o necesidad de diálisis. Los factores asociados a enfermedad tardía (> 3 meses) fueron: edad avanzada, inmunodepresión grave por rechazo e insuficiencia renal postrasplante. La mortalidad global fue del 76,3%, sin observarse diferencias entre los distintos tipos de trasplante. En los últimos años, los pacientes con EPOC en tratamiento con corticoesteroides se han convertido en el principal grupo de riesgo para AI en algunos centros. En un estudio de 443 pacientes con uno ó más aislamientos de *A. fumigatus* de muestras clínicas (1999-2005), se concluyó que el 11% tenían AI probada o probable. La EPOC tratada con corticoesteroides fue la enfermedad de base más frecuente (17%), superando en frecuencia a la leucemia (15%) y al TOS (10%). La mortalidad de la AI en los pacientes EPOC en tratamiento con corticoesteroides es muy elevada (80%-100% en distintas series).

En conclusión, la AI constituye un importante problema en el manejo de los pacientes inmunodeprimidos en los que ocasiona una elevada morbilidad y mortalidad. Es necesario profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la AI para poder diseñar estrategias de prevención. Por otro lado se deben producir avances en el diagnóstico y tratamiento de la AI para mejorar el pronóstico de los pacientes.

P4. Micosis invasoras por *Scedosporium*, *Fusarium* y *Mucorales*

Patricia Muñoz

Hospital Gregorio Marañón, Madrid

Scedosporium, *Fusarium* y los Mucorales son los representantes más significativos de los hongos miceliales emergentes. Su incidencia global ha experimentado un incremento significativo en los últimos años, fundamentalmente en unidades que atienden pacientes inmunodeprimidos y que usan profilaxis antifúngica de amplio espectro.

Las tres especies de hongos son de distribución universal, aunque *Scedosporium prolificans* ha mostrado una especial predilección por nuestro país y por Australia. En general afectan pacientes inmunodeprimidos en estadios avanzados y en ocasiones aparecen como "micosis de brecha" en el seno de tratamiento antifúngico sistémico con fármacos a los que son resistentes. Sin embargo, pueden afectar también a pacientes con inmunosupresión menos profunda, como los diabéticos o los dializados, o a pacientes sanos que sufren accidentes como la sofocación en aguas contaminadas o un traumatismo.

Las manifestaciones clínicas causadas por los tres grupos de hongos son superponibles en cierta medida, aunque cada uno muestra alguna característica específica. Baste comentar la elevada frecuencia de afectación del sistema nervioso central de *Scedosporium*, las lesiones cutáneas características de *Fusarium* y la velocidad de avance de la necrosis de los Mucorales.

El diagnóstico depende fundamentalmente de la sospecha clínica, del conocimiento de las entidades y del aislamiento en cultivo. Es extremadamente importante conocer los factores de riesgo que incrementan la posibilidad de infección por uno de estos hongos.

El verdadero problema lo constituye el tratamiento, ya que muestran una significativa resistencia a los antifúngicos. Las especies de *Scedosporium* suelen ser resistentes a anfotericina B y *S. prolificans* es resistente a la mayoría de los antifúngicos comercializados. *Fusarium* puede ser también resistente a anfotericina y los Mucorales, por el contrario, son resistentes a los azoles con la excepción de posaconazol. La reversión de la neutropenia y en ocasiones, la cirugía, son elementos esenciales del tratamiento.

Sesión plenaria 2

Estudios de sensibilidad in vitro

Moderador: Juan Luis Rodríguez-Tudela. Instituto de Salud Carlos III. Madrid

P5. Obtención y utilidad clínica de los puntos de corte mediante metodología EUCAST

Manuel Cuenca-Estrella

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

El EUCAST es un organismo europeo, creado por la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID), cuya función primordial es el desarrollo de estándares para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos (www.eucast.org). Este comité debe tomar en consideración las metodologías preexistentes en países europeos, lograr el mayor consenso posible entre expertos y las sociedades nacionales, así como intentar que los estándares sean compatibles con los procedimientos de organismos homólogos no europeos.

La finalidad de los estándares es establecer puntos de corte que permitan realizar estudios epidemiológicos, con el propósito de vigilar y controlar el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos. En 2002, el EUCAST fue reformado para incluir miembros de cada uno de los países europeos, recibiendo el apoyo financiero de la Dirección General de la Salud y Protección de los Consumidores (DG-SANCO) de la Unión Europea.

Entre 1999 y 2002, el AFST-EUCAST realizó varios estudios experimentales para desarrollar un método de microdilución, que sirviera para determinar la sensibilidad a los antifúngicos de las levaduras fermentadoras de la glucosa. El estándar del EUCAST fue publicado en 2003 (documento 7.1), y ha mostrado una reproducibilidad elevada (>85%), tanto intra como inter-laboratorio, así como una buena correlación con el procedimiento M27-A2 del CLSI.

Actualmente, el AFST-EUCAST está desarrollando una metodología para establecer puntos de corte para interpretar los estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Esta metodología se inicia con el análisis de las CMIs de un gran número de cepas para cada una de las especies fúngicas, con la intención de establecer *cut-offs* epidemiológicos. Tras ello, se analizan las pautas de administración de los antifúngicos en clínica, las variables farmacocinéticas de estos fármacos, las variables farmacodinámicas y se hacen proyecciones probabilísticas sobre estas (simulaciones de Monte-carlo...). Por último se establecen los puntos de corte clínicos para cada una de las especies analizadas.

No obstante, no debe olvidarse que las personas que suelen desarrollar micosis graves son pacientes debilitados, con enfermedades crónicas o con inmunodepresión. En estos casos, el diagnóstico y el manejo de la infección fúngica es muy complicado, por lo que los resultados de los estudios de sensibilidad deben considerarse como un dato más a la hora de tratar la infección, un dato que debe integrarse entre las variables a tomar en consideración cuando nos enfrentamos a una micosis.

P6. Técnicas de difusión de disco del CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos

Ana Espinel-Ingroff

VCU Medical Center; Division of Infectious Diseases. Medical Mycology Research Laboratory. Richmond, VA, USA

Las razones más importantes para hacer las pruebas de sensibilidad *in vitro* en el laboratorio clínico son: (i) Proporcionar un resultado *in vitro* fiable de la actividad relativa de un antifúngico para predecir la respuesta clínica más probable al tratamiento. (ii) Identificar el aislamiento resistente para predecir el potencial fallo terapéutico. Los laboratorios clínicos han asumido un mayor papel en la selección y control de la quimioterapia antifúngica. El método utilizado más frecuentemente en la realización de las pruebas de sensibilidad antifúngica de las levaduras es el método de dilución en caldo (M27-A2) del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, llamado antes NCCLS). Sin embargo, la técnica utilizada más comúnmente a nivel mundial para la comprobación de la sensibilidad antibacteriana es la prueba de difusión de disco, la cual produce un resultado cuantitativo (zonas o diámetros de inhibición) y una categoría interpretativa cualitativa (p.ej., sensible o resistente). Con el fin de simplificar la determinación de la sensibilidad de *Candida* spp. al fluconazol, al posaconazol y al voriconazol en el laboratorio clínico, el Subcomité del CLSI ha desarrollado un método de disco estandarizado (M44-A). Este método de difusión de disco para las levaduras es similar a los usados para las bacterias y el medio estándar es el agar de Mueller Hinton (MHA) con dos suplementos, 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno (GMB). Los aislamientos *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* ATCC 90028 y *C. tropicalis* ATCC 750 han sido seleccionados como cepas del control de calidad para esta prueba de disco; los diámetros de inhibición para categorizar cada aislamiento de *Candida* spp. como sensible, S-DD o resistente han sido establecidos cuando la prueba de disco con el fluconazol (25 µg) o el voriconazol (1 µg) se ejecuta siguiendo los directrices del documento M44-A.

Últimamente el Subcomité del CLSI ha conducido estudios colaborativos (cinco laboratorios) para desarrollar un método de disco estandarizado para los hongos filamentosos (18 especies) evaluando dos formulaciones de agar: (i) MHA+MB y (ii) MHA. Un sumario de estos adelantos será presentado.

P7. Interpretación de los resultados *in vitro* de las combinaciones de antifúngicos

Emilia Cantón

Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe, Valencia

El tratamiento de las micosis sistémicas resulta complejo, sobretudo en pacientes inmunodeprimidos, donde se presentan con mayor frecuencia estas infecciones, debido entre otras causas al escaso número de opciones terapéuticas, a los graves efectos adversos de algunos de los antifúngicos y a la aparición de resistencias tanto en levaduras como en hongos filamentosos. Aunque la mayoría de las infecciones responden a la monoterapia, hay circunstancias en las que una combinación de antifúngicos puede resultar ventajosa. Las bases teóricas para la asociación de antifúngicos son: espectro de acción complementario, propiedades farmacológicas distintas o complementarias, diferente modo de acción y/o diferente diana. Con la asociación de antifúngicos se pretende ampliar el espectro, reducir la aparición de cepas resistentes, disminuir la toxicidad, acortar el tiempo de tratamiento y potenciar la acción de los mismos (sinergismo), aunque esto último no siempre es posible y con algunas asociaciones lo que se consigue es el efecto contrario (antagonismo). La actividad de los antifúngicos combinados se puede determinar a través de los estudios *in vitro* y la eficacia de la combinación mediante los estudios *in vivo* en modelos experimentales de infecciones fúngicas en animales y de los estudios prospectivos o retrospectivos en pacientes. Los primeros datos sobre la actividad y eficacia de los antifúngicos se obtienen con los ensayos *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, aunque con ninguno de ellos se tiene la completa seguridad de lo que va a ocurrir en el paciente. Ninguna de las técnicas está estandarizada ni su correlación *in vitro-in vivo* determinada. Según los conocimientos actuales, una misma combinación de antifúngicos puede comportarse de forma sinérgica, antagónica o indiferente dependiendo del aislado, la concentración absoluta y relativa de los antifúngicos combinados, del lugar y tipo de infección, y del método y las definiciones utilizadas. Debido a que las asociaciones pueden ser sinérgicas o antagónicas, dependiendo del aislado, debemos disponer de métodos rápidos, y fiables que nos permitan ayudar al clínico en la elección de la mejor combinación posible. Los métodos disponibles para medir la interacción entre los antifúngicos *in vitro* son: 1) Tablero de ajedrez, 2) Curvas de mortalidad y 3) Etest.

Tablero de ajedrez. Se basa en medir la CMI de un antifúngico A en presencia de otro antifúngico B utilizando el método estandarizado por el CLSI, tanto en el formato de microdilución como el de macrodilución. La actividad de la asociación se mide por el índice de fracción de concentraciones, IFC, o FIC en la nomenclatura anglosajona. $FIC(A) = CMI(A) / CMI(A)$ en presencia del antifúngico B / $CMI(A)$. $FIC(B) = CMI(B)$ en presencia del antifúngico A / $CMI(B)$.

Interpretación: la interacción se mide por la suma de los índices de fracción de concentraciones de la asociación: $\Sigma FIC = FIC(A) + FIC(B)$. Sinergismo: $\Sigma FIC \leq 0,5$. Antagonismo: $\Sigma FIC \geq 4$. Indiferencia: $\Sigma FIC > 0,5$ y $\neq 4$.

Curvas de mortalidad. Mide el número de células viables a lo largo del tiempo obtenidos con los antifúngicos asociados y lo compara con el número de células viables obtenidos con los antifúngicos individualmente.

Interpretación: Sinergismo: Aumento de la mortalidad ≥ 2 log con respecto al antifúngico más activo. Antagonismo: disminución de la mortalidad ≥ 2 log con respecto al antifúngico menos activo.

Etest (por superposición de las tiras). Se basa en la rápida difusión al medio del antifúngico depositado en las tiras de Etest. Se sigue el mismo procedimiento que para realizar la CMI. El efecto de la asociación se determina aplicando la tira de Etest, de uno de los antifúngicos que se quiere combinar, durante dos horas, sobre la superficie de la placa agar, se retira y en el mismo lugar se sitúa la tira del otro antifúngico. Transcurridas 24 ó 48 horas de incubación se lee la CMI de los dos antifúngicos, siguiendo los criterios de lectura establecidos (100% de inhibición para anfotericina B, y 80% de inhibición para 5 fluorocitosina y azoles). Este método ha mostrado buena correlación con el de las curvas de letalidad.

Interpretación: Sinergismo: descenso de la CMI ≥ 3 diluciones log₂. Antagonismo: Aumento de la CMI ≥ 3 diluciones log₂.

Aunque, como se ha mencionado, ninguno de los métodos está estandarizado, el de las curvas de mortalidad es el que se utiliza habitualmente como de referencia. Tanto el método de las curvas de mortalidad como el del tablero de ajedrez son los recomendados para estudios de investigación y el método de Etest puede ser el idóneo dar una respuesta rápida al clínico y también para hacer un escrutinio de las combinaciones.

En cuanto a los estudios *in vivo* en animales, se han utilizado diferentes animales (ratón, cobaya, conejo, etc.) y diferentes criterios para valorar la efectividad de la combinación de antifúngicos, como son: porcentaje de mortalidad o de supervivencia, reducción de la carga fúngica en el órgano diana (riñón, hígado, pulmón, etc.).

En la presentación se discutirán las ventajas, inconvenientes y problemas de interpretación de cada método, así como los resultados obtenidos en los estudios prospectivos y retrospectivos con pacientes.

P8. Cómo elegir una técnica comercial de sensibilidad a los antifúngicos

Estrella Martín Mazuelos

Servicio Microbiología. Hospital Universitario Valme. Sevilla. España

A pesar de existir documentos estandarizados para el estudio de sensibilidad *in vitro* de los hongos a diferentes agentes antifúngicos, éstos no subsanan del todo las necesidades de la rutina de un laboratorio de Microbiología clínica. En lo que respecta a las levaduras (*Candida spp* y *Cryptococcus neoformans*), el documento estándar (CLSI M27 A2), tiene una serie de limitaciones, entre ellas, la falta de detección de resistencia a anfotericina B y los problemas de crecimiento del *C. neoformans* en el medio RPMI 1640, por estas razones y por la dificultad técnica para introducir el método estándar en el laboratorio de Microbiología se han evaluado y se están evaluando métodos alternativos. Entre ellos tenemos los métodos colorimétricos (Sensititre Yeast One[®] y Fungitest[®]) ambos están comercializados y se basan en el método estándar de microdilución en caldo, con un indicador de oxido reducción que cambia de color cuando existe crecimiento, facilitando la lectura visual. El Sensititre es cuantitativo, muy similar al de referencia en cuanto al medio de cultivo (se diferencia en que el RPMI 1640 lleva glucosa) y a los rangos de concentraciones de antifúngicos. El Fungitest es otro método colorimétrico comercial pero utiliza concentraciones críticas en vez de diluciones seriadas, siendo éstas concentraciones muy altas para anfotericina B e itraconazol. De éstos dos métodos, el primero ha sido aprobado por la FDA en USA para el estudio de la sensibilidad *in vitro* de *Candida spp* a fluconazol, itraconazol y 5 fluorocitosina por su buena correlación con el método de referencia y su reproducibilidad. El Fungitest, a pesar de ser de fácil manejo, su uso está limitado por incluir sólo fluconazol, itraconazol, 5 fluorocitosina y ketoconazol y por la falta de detección de cepas resistentes a los azoles, según los estudios publicados. Otro método alternativo no colorimétrico comercial es el ATB Fungus 2, basado también en el método de referencia, utilizando diluciones seriadas de los principales antifúngicos (anfotericina B, itraconazol, fluconazol y 5 fluorocitosina), los pocos datos de correlación de los que se disponen con el método CLSI muestran que es alta para anfotericina B y 5 fluorocitosina, pero baja para fluconazol e itraconazol.

Entre los métodos basados en la difusión en agar se encuentran el E test[®] y el de difusión con tabletas de Neo Sensitabs[™]. El E test es un método cuantitativo basado en un gradiente de concentración de antifúngicos que están impregnados en una tira de plástico inerte. Este método está comercializado y según los datos publicados en la literatura muestra una correlación variable según los estudios, con el método de referencia, considerándose el método de elección para la detección de resistencia a anfotericina B (aunque en la actualidad esto está en discusión según una publicación reciente) utilizando el medio Antibiótico n^o 3 o el RPMI 1640 con glucosa para *Candida spp*, en el caso de *C. neoformans* se puede utilizar para 5 fluorocitosina y fluconazol. En cuanto al método de difusión de discos, además del método estándar CLSI M 44 A, existen las tabletas Neo Sensitabs con concentraciones de distintos antifúngicos que muestran utilidad para el estudio de sensibilidad de los azoles y caspofungina, por mostrar buena correlación con los métodos estándar (CLSI M 27 A2 y M 44 A).

En relación con los hongos filamentosos, el documento CLSI M 38 A es el de referencia, pero al igual que ocurre con las levaduras el método es complicado y requiere mucho trabajo para ser utilizado como método de rutina en un laboratorio de Microbiología clínica, por ello se ha intentado buscar métodos alternativos, entre ellos está el Sensititre Yeast One[®], el mismo que se utiliza para las levaduras, que parece tener buena correlación con el método de referencia para los azoles, a pesar de que puede ser un buen método alternativo para estos antifúngicos se requieren más estudios para poder utilizarlo en la rutina. En cuanto a métodos basados en la difusión en agar también disponemos del E test, que ha demostrado ser de gran utilidad para estos hongos y los azoles y la anfotericina B, aunque existe una publicación reciente que pone en duda su utilidad para la anfotericina B, igual que ocurría con las levaduras. Otro método basado en la difusión en agar es el de difusión, utilizando discos comerciales impregnados de antifúngicos, este método parece ser útil para anfotericina B y equinocandinas.

A la vista de la revisión de los métodos alternativos a los documentos de referencia publicados por el CLSI, podemos decir que para las levaduras el método más útil para la rutina de un laboratorio clínico de microbiología es el Sensititre Yeast One para la mayoría de los antifúngicos, excepto para anfotericina B, que parece que estamos sin saber qué método utilizar. Para los hongos filamentosos, podrían ser útiles tanto el Sensititre Yeast One como el E test, aunque se necesitan más estudios de correlación de los datos *in vitro* e *in vivo*.

Sesión AEM 1

Nuevos antifúngicos

Moderador: Francisco Alvarez. Hospital Universitari del Mar. Barcelona

P9. Nuevos azoles

Javier Pemán

Hospital Universitario La Fe, Valencia

Los azoles pertenecen a una clase bien diferenciada de antifúngicos que, desde su introducción, juegan un importante papel en el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas. Estos fármacos actúan inhibiendo el citocromo P450, enzima imprescindible para la síntesis del ergosterol, que es el esteroide más importante de la membrana celular fúngica. Desde que se comercializaron los primeros azoles, hace más de 30 años, estos fármacos constituyeron una alternativa más segura a los viejos antifúngicos sistémicos (anfotericina B y 5-fluorocitosina).

Con el paso de los años, se han ido introduciendo en el mercado más de 20 moléculas diferentes de azoles, la mayoría de ellas de uso exclusivamente tóxico. Los azoles de uso sistémico, a semejanza de otros antimicrobianos, han sido clasificados en distintos grupos (o generaciones) en función de su estructura molecular y espectro de acción. De esta forma, los imidazoles (ketoconazol) pertenecen a la primera generación de azoles, los primitivos triazoles (fluconazol e itraconazol) a la segunda generación y los nuevos triazoles (voriconazol, posaconazol, ravuconazol, etc.) a la tercera generación.

Las moléculas de los nuevos triazoles han sido modificadas para aumentar su espectro de actividad antifúngica, incluyendo hongos filamentosos (mayoritariamente resistentes a los antiguos azoles) y también las especies de *Candida* resistentes al fluconazol. Desde el lanzamiento al mercado de los primeros triazoles, fluconazol e itraconazol, al inicio de la última década, el desarrollo de nuevos azoles ha sido constante. Algunos de ellos, como el voriconazol, ya han sido comercializados en Europa; otros están a punto de serlo (posaconazol) y el resto, se encuentra en diferentes fases de desarrollo.

En la presente revisión se comentarán los aspectos más significativos y las indicaciones terapéuticas de estos nuevos fármacos incluyendo también los que se encuentran en fases más avanzadas de desarrollo preclínico como ravuconazol, albaconazol e isavuconazol (BAL8557).

Voriconazol. Este nuevo azol fue aprobado por la FDA americana y por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en 2002 para el tratamiento inicial de las aspergilosis, candidiasis esofágicas e infecciones invasoras por *Fusarium* y *Scedosporium*. Con posterioridad, también se aprobó su uso para el tratamiento de candidiasis invasoras y candidemia. Es un fármaco derivado del fluconazol con actividad fungicida sobre hongos filamentosos, excelente farmacocinética y muy buena distribución tisular, incluyendo el líquido cefalorraquídeo. Generalmente se tolera bien y sus efectos adversos raramente obligan a suspender el tratamiento. Voriconazol es activo *in vitro* sobre una amplia variedad de hongos; entre ellos, *Candida spp*, *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Penicillium marneffei*. Además, es activo sobre especies de *Candida* resistentes o con sensibilidad disminuida al fluconazol como *C. krusei*, *C. glabrata* o *C. guilliermondii*. Sin embargo, su actividad sobre zigomicetos, como *Mucor spp* o *Rhizomucor spp*, es sensiblemente inferior.

Voriconazol se puede administrar tanto por vía oral (biodisponibilidad superior al 95%), como por vía intravenosa. Una vez administrado, se distribuye ampliamente por tejidos y líquidos orgánicos presentando una farmacocinética no lineal. Sus efectos adversos suelen estar relacionados con la dosis y pueden incluir trastornos visuales, erupción cutánea, alteraciones gastrointestinales y elevación de las enzimas hepáticas.

Posaconazol. Posaconazol es un derivado sintético del itraconazol recientemente aprobado por la FDA y la EMA para el tratamiento de infecciones fúngicas graves (aspergilosis, fusariosis, cromoblastomycosis y coccidioidomycosis) en pacientes que no responden a la terapia antifúngica inicial o que son intolerantes a la misma. En España se espera su comercialización, con las mismas indicaciones, en los próximos meses. Hasta el momento, posaconazol presenta el espectro de actividad más amplio de todos los azoles. Es activo sobre *Candida spp*, *Aspergillus spp*, *C. neoformans*, *Fusarium spp*, *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, *Rhizopus spp*, *Scedosporium apiospermum*, dermatofitos y hongos dematiáceos. Además, es activo sobre especies de *Candida* resistentes o con sensibilidad disminuida al fluconazol como *C. krusei* y *C. glabrata*.

Posaconazol se administra exclusivamente por vía oral y posee un biodisponibilidad superior al 80% cuando se administra después de las comidas. Posee un gran volumen de distribución, una semivida de casi 20 horas y no se metaboliza a través del citocromo P450. Los efectos adversos relacionados con su uso no son muy frecuentes y, entre los más habituales, destacan la elevación de las enzimas hepáticas, erupción cutánea, náuseas y vómitos.

Ravuconazol. Estructuralmente muy similar al fluconazol, ravuconazol es un nuevo triazol desarrollado para su uso por vía oral actualmente en fase de ensayos clínicos previos a su comercialización.

Su actividad *in vitro* es superior al fluconazol e itraconazol, siendo activo sobre *C. krusei*, *C. glabrata*, cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol, *C. neoformans*, *A. fumigatus*, dermatofitos y hongos dematiáceos. Sin embargo, su actividad sobre *Sporothrix schenckii*, *Scedosporium* spp y *Fusarium* spp es limitada.

Una vez absorbido, ravuconazol desarrolla una farmacocinética plasmática lineal y una semivida superior a 4 horas. Su dosis terapéutica todavía no han sido determinadas y en los modelos animales estudiados, no se han apreciado efectos adversos después de una semana de tratamiento. **Albaconazol.** El último triazol de amplio espectro que se encuentra actualmente en desarrollo preclínico, albaconazol, ha demostrado una buena actividad *in vitro* e *in vivo* sobre *C. krusei*, *C. glabrata*, *Aspergillus* spp, dermatofitos y *S. apiospermum*. Además, sobre *S. prolificans*, albaconazol presenta una actividad superior a la de cualquier otro azol.

Actualmente, se encuentran en desarrollo ensayos clínicos con albaconazol, en solución oral, para el tratamiento de candidiasis vulvovaginal y de micosis sistémicas. Por otra parte, se está investigando en estudios preclínicos una formulación parenteral.

En los estudios realizados hasta la fecha, albaconazol ha demostrado una buena biodisponibilidad y tolerancia.

Isavuconazol. El isavuconazol (BAL8557) es un nuevo profármaco de la familia de los triazoles. En la actualidad se están desarrollando estudios en Fase II para demostrar su utilidad en candidiasis esofágica administrado en una única dosis semanal, demostrando una eficacia notable acompañada de un buen perfil de seguridad. Además, los últimos estudios realizados en voluntarios sanos revelan unas excelentes características farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como una tolerancia similar a la del fluconazol.

P10. Nuevas equinocandinas

Jesús Fortún

Hospital Ramón y Cajal. Madrid

Las equinocandinas son una nueva clase de antifúngicos, constituidos por grandes moléculas lipopeptídicas, que actúan a nivel de la pared de la célula fúngica mediante la inhibición no competitiva de la síntesis de 1-3 β glucano. Todos los agentes pertenecientes a esta familia son administrados por vía parenteral. Su actividad "in vitro" e "in vivo" es rápidamente fungicida frente a *Candida* spp y fungistática frente a *Aspergillus* spp. No tienen actividad con relevancia clínica frente a *Cryptococcus neoformans*, *Zygomycetes* o *Fusarium* spp. Son metabolizadas a nivel hepático. No poseen una diana específica a nivel de la célula humana, lo que les permite un perfil de seguridad muy benigno, habitualmente limitada a la producción de flebitis, fiebre, alteración de pruebas hepáticas y hemólisis. Los resultados en candidemia y candidiasis invasiva sugieren equivalencia a anfotericina B, con una significativa reducción del número de efectos secundarios. Caspofungina fue la primera equinocandina aprobada, seguida recientemente por micafungina y anidulafungina. Caspofungina está aprobada en la actualidad (FDA y EMEA) para el tratamiento de esofagitis candidiásica y candidemia, tratamiento de rescate de aspergilosis y tratamiento empírico de neutropenia febril. Micafungina está aprobada (FDA) para el tratamiento de la esofagitis candidiásica y profilaxis antifúngica en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos. Anidulafungina está aprobada (FDA) para el tratamiento de esofagitis candidiásica y candidemia. Existe experiencia anecdótica con todas ellas en el manejo de otro tipo de micosis. Su diferente mecanismo de acción al de otros antifúngicos las han convertido en los antifúngicos más elegidos en los diferentes tratamientos de combinación ensayados, sobre todo en el tratamiento de aspergilosis. Las equinocandinas suponen una importante incorporación en el armamento terapéutico de las infecciones fúngicas tanto del paciente inmunocomprometido como del paciente con inmunidad normal.

P11. Nuevas vías de administración

Joan Gavaldà

Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona

Resumen no disponible

Sesión SEM 1

Biología del desarrollo

Moderador: Eduardo Espeso. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Madrid

P12. Biosíntesis de quitina y la morfogénesis de la célula fúngica

Cristina Jiménez, Abigail Reyes, Alberto Gómez, Marcia Matos,

Ángel Durán y César Roncero*

Instituto de Microbiología Bioquímica. Departamento de Microbiología y Genética. CSIC/ Universidad de Salamanca. Salamanca

La quitina constituye un polímero esencial en la construcción de la pared celular fúngica y como tal ha sido considerado desde hace tiempo como una diana antifúngica excelente junto con la propia pared. Sin embargo, las expectativas generadas no se han cumplido en la identificación y comercialización de inhibidores de la síntesis de quitina con interés terapéutico.

El trabajo realizado usando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo ha permitido demostrar durante los años 90 que la síntesis de quitina no es un proceso único, sino mediado por tres actividades enzimáticas distintas. Dos de ellas, ScChs2p y ScChs3p, juegan un papel relevante en la morfogénesis de esta levadura y su utilidad como diana antifúngica ha sido validada en *Candida albicans*. Estos genes se consideran como los prototipos de las dos familias de quitín sintetas identificadas hasta la fecha. Tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*, Chs3p es la subunidad catalítica de la CSIII, una enzima regulada a nivel postraduccional y responsable de la síntesis de más del 90% de la quitina celular.

Con la excepción de las levaduras, la situación en el resto de los hongos es mucho más compleja al poseer un número de quitín sintetas muy superior. Todos los hongos para los que se dispone de información genómica contienen al menos 3 genes homólogos al ScChs3 (Familia 2) encuadrados en dos clases distintas, las clase IV similar a la citada, y la clase V, que incluye en su secuencia un dominio miosina. Esta es exclusiva de hongos filamentosos y está integrada por dos miembros. Dada la similitud entre las regiones catalíticas de estos genes debería pensarse que son los responsables de la síntesis de la mayor parte de la quitina y por lo tanto susceptibles de utilización como diana antifúngica.

Con el objeto de verificar esta hipótesis se ha iniciado un proyecto en *Aspergillus fumigatus* con un doble enfoque, por un lado la construcción de mutantes en todos los genes *CHS* de este hongo, y por otro la expresión heteróloga de estos genes en *S. cerevisiae* para su caracterización bioquímica. Con este doble enfoque se pretende por una parte determinar la contribución de cada gen *CHS* en la biosíntesis de quitina y en la formación de la pared celular, y por otro generar una herramienta molecular que permita la identificación de inhibidores de las quitín sintetas fúngicas utilizando un microorganismo simple y fácilmente manipulable como *S. cerevisiae*.

Con estos objetivos en mente se ha logrado la construcción de mutantes simples, doble y triples en los genes *CHS* que conforman la Familia 2 de *Aspergillus fumigatus*. Además se ha logrado la expresión heteróloga de los genes *AfCHSF* (IV) y *AfCHSE* (V) en *S. cerevisiae*. Los resultados más recientes en estas dos líneas serán discutidos a la hora de explicar los mecanismos implicados en la construcción de la pared celular fúngica.

P13. Cdk2, a second essential cyclin-dependent kinase in the corn smut fungus *Ustilago maydis*

Sonia Castillo-Lluva, Ignacio Flor-Parra, Gero Steinberg and

José Pérez-Martín*

Centro Nacional de Biotecnología-CSIC. Campus de Cantoblanco-UAM. Madrid. Spain. e-mail: jperez@cnb.uam.es

Cdk2 is a member of the Pho85 family of cyclin-dependent kinases. Unlike other fungal members of this family, Cdk2 appears to be essential for growth in *U. maydis*. A temperature-sensitive allele of *cdk2* was generated, caused cell separation defects, G1 arrest and polarity defects at restrictive temperature. Therefore, the essential function may involve cell cycle control and morphogenesis. To further characterize the roles of Cdk2 in *U. maydis*, we also analyzed the putative cyclin partners. We found seven distinct cyclin genes (*pcl1-7*) and we started the search for suppressors of the growth defects present in the ts-mutant. Details of this search will be provided.

P14. Molecular motors for polarized growth in***Aspergillus nidulans***

Reinhard Fischer

University of Karlsruhe, Institute for Applied Biosciences, Applied Microbiology, Karlsruhe, Germany. e-mail: reinhard.fischer@bio.uka.de

We identified 11 kinesins in the genome of *Aspergillus nidulans*, of which BimC and KlpA were already characterized as mitotic motors. We characterized five unknown motors for their functions.

The conventional kinesin motor, KinA is a very fast moving motor protein (2-3 μm per sec), which moves processively along microtubules. Deletion of the gene in *A. nidulans* caused a decrease in hyphal tip extension and thus the formation of compact colonies. KinA is involved in vesicle transportation towards the growing hyphal tip. It delivers cell wall components and corresponding enzymes enclosed in secretion vesicles to a vesicle supply centre, called the Spitzenkörper. From there, vesicles are probably transported via the actin-myosin system to fuse with the membrane at the tip of the hypha. A second motor with a similar function is UncA. It belongs to the Unc104 family and is characterized by a PH domain at the C-terminus, likely to be involved in vesicle binding. Deletion of *uncA* caused also a reduction in colony growth. KinA and UncA appear to be the most important motors for hyphal extension.

Polarized growth depends on the integrity of the microtubule cytoskeleton. We found that growing microtubules in *A. nidulans* merge at the centre of the growing tip and discovered that the kinesin motor protein, KipA, related to Tea2 of *Schizosaccharomyces pombe*, is required for their temporal anchorage. In a Δ kipA strain microtubule plus ends reach the tip but remain mobile in the cytoplasm. Hyphae loose directionality and grow in curves. GFP-KipA localizes to the microtubule plus end and jams behind them, suggesting that KipA is a moving motor. Using KipA as a microtubule plus end marker we determined the location of MTOCs in *A. nidulans* compartments close to nuclei, in the cytoplasm and at septa. For full activity of the MTOCs a novel MTOC associated protein, ApsB, is required.

The fourth kinesin-like motor protein studied here, is KipB. Phylogenetic analyses based on the motor domains, grouped KipB into the Kip3 family of microtubule depolymerases close to *Saccharomyces cerevisiae* Kip3 and *S. pombe* Klp5 and Klp6. Disruption of *kipB* revealed that it is not essential for vegetative growth, although microtubule dynamics and integrity was disturbed. Mutant strains were resistant to high concentrations of the microtubule-destabilizing drug benomyl suggesting that KipB destabilizes microtubules. Several microtubule-dependent processes were consequently altered in the mutant. *kipB* mutation caused a delay in anaphase and an increase of bent mitotic spindles, a decrease in depolymerization of cytoplasmic microtubules during mitosis and a failure of spindle positioning in the cell. Disruption of the *kipB* gene was synthetically lethal with the mitotic kinesin motor mutation *bimC4*.

UncB is a second member of the Unc104 family, but in comparison to UncA lacks the long C-terminal extension following the motor domain. It localized to septa and to nuclei, suggesting functions in mitosis and/or septation.

Referencias:

- Konzack, S., Rischitor, P., Enke, C. & Fischer, R. The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Bio Cell* 2005; 16:497-506.
- Requena, N., Alberti-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen, P., Liese, R. & Fischer, R. Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbio* 2001; 42:121-132.
- Rischitor, P., Konzack, S. & Fischer, R. The Kip3-like kinesin KipB moves along microtubules and determines spindle position during synchronized mitoses in *Aspergillus nidulans* hyphae. *Euk Cell* 2004; 3:632-645.
- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V. P. & Fischer, R. Role of the spindle-pole body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci.* 2005; 118:3705-3716.

Sesión AEM 2**Nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de las micosis invasoras**

Moderador: Rodrigo Martino. Servicio de Hematología Clínica. Hospital de Sant Pau. Barcelona

P15. Profilaxis de la infección fúngica invasora (IFI) en el paciente hematológico de alto riesgoM^a Isabel Ruiz Camps

Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España

Las infecciones fúngicas invasoras (IFI) constituyen una de las principales causas de morbi-mortalidad en los pacientes hematológicos. El riesgo de sufrir una IFI no es el mismo para todos los pacientes, siendo los más expuestos aquellos sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) y los afectos de leucemia mieloide aguda (LMA), bajo tratamiento poliquimioterápico de inducción, intensificación o consolidación. La incidencia de IFI en estos pacientes, en algún momento de su evolución, oscila entre un 15-20% con una escasa variación en la tasa de mortalidad.

En la actualidad, a través de diferentes ensayos clínicos publicados o presentados a congresos, sabemos que existen antifúngicos que funcionan en la profilaxis de las IFI, aunque no exista repercusión sobre la mortalidad, tales como itraconazol, micafungina, caspofungina, voriconazol, posaconazol y anfotericina liposomal o complejo lipídico. Sin embargo las cosas no son tan sencillas, puesto que muchos de ellos presentan efectos adversos gastrointestinales que dificultan su administración; otros, los azólicos, presentan problemas de interacciones farmacológicas o con los alcaloides de la vinca que exigen un control detallado de los mismos. Y, finalmente, algunos como las candinas presentan dificultad en su uso profiláctico mantenido ya que únicamente pueden administrarse por vía endovenosa. Es por ello, que en este momento y en espera de nuevos antifúngicos se intentan buscar nuevas e interesantes alternativas terapéuticas con los fármacos comercializados en la actualidad. Hay autores que utilizan anfotericina liposomal a dosis altas semanal o quincenalmente, otros dosis bajas diarias, etc.

Dado que el mecanismo de adquisición de muchos hongos es la inhalatoria, resulta muy atractiva la posibilidad de poder actuar sobre el mismo árbol bronquial antes de que se produzca la invasión tisular. Recientemente, se han publicado y presentado los primeros resultados de eficacia y seguridad de las anfotericinas lipídicas, liposomal y complejo lipídico, en pacientes sometidos a alo-TPH y LMA. Dada la comodidad de administración y su buena tolerancia es posible, que al igual que ha sucedido en el trasplante de pulmón, constituya una nueva vía de administración a seguir en estos pacientes.

Queda por dilucidar que pasará con las pruebas microbiológicas rápidas de diagnóstico de IFI, tales como galactomanano, puesto que hay autores que apuntan hacia una menor sensibilidad de las mismas en los pacientes bajo profilaxis con azoles. Este y otros puntos tendrán que ser valorados con la realización de estudios clínicos multicéntricos.

P16. Nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de las micosis invasoras. Tratamiento anticipado

Montserrat Rovira Tarrats

Médico Consultor. Unitat TPH. Servicio de Hematología, Hospital Clínic. Barcelona

La estrategia denominada tratamiento anticipado o precoz en las micosis invasoras, pretende "adelantarse" en la instauración de un tratamiento antifúngico a lo que se hace tradicionalmente en el manejo de los pacientes de más riesgo de infección fúngica invasora, básicamente *Aspergillus*, que son los enfermos hematológicos. Este interés en adelantar dicho tratamiento es debido a la elevada mortalidad que tienen estos pacientes con una infección fúngica ya instaurada.

La aplicación de esta estrategia es en similitud a lo que hace ya algunos años se ha introducido en el manejo habitual del citomegalovirus (CMV) en los pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Dicha estrategia terapéutica anticipada, en base a unas técnicas diagnósticas de detección de infección por CMV, instaura tratamiento antiviral antes de que se produzca enfermedad por CMV. El CMV que era el máximo responsable de la mortalidad infecciosa en el mencionado colectivo de pacientes pasó a dejar de ser "el problema infeccioso" fundamental gracias a esta estrategia anticipada.

Sin embargo, cabe mencionar que no se trata de situaciones idénticas. El CMV es un herpesvirus que se reactiva en situaciones de inmunosupresión. El hongo está presente en el huésped o no, por tanto no monitorizamos una reactivación. Además, las técnicas diagnósticas de detección de infección fúngica, todavía no están estandarizadas o introducidas en

todos los laboratorios de microbiología de los hospitales para basar una estrategia de vigilancia y por tanto de tratamiento anticipado en las micosis invasoras.

En esta ponencia se hará hincapié en todo ello, en la necesidad de tener unas definiciones uniformes de lo que es un tratamiento anticipado; cuales son las técnicas diagnósticas en las que se tiene que basar dicha estrategia, en que pacientes debe realizarse la monitorización, y con que periodicidad deben hacerse. Así mismo, también se discutirán las opciones terapéuticas, de que fármacos disponemos en función de la distintas micosis invasoras que pueden presentarse en estos pacientes.

P17. Tratamiento antifúngico combinado:

in dubio abstine, in dubio agite

Miguel Salavert Lleti

Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Desde el advenimiento histórico de sucesivas familias y grupos de antimicrobianos, el tratamiento combinado ha sido uno de los ejemplos de que "la unión hace la fuerza", sobre todo en la batalla contra los microorganismos, bien para conseguir su control o su erradicación. Múltiples ejemplos antiguos y actuales lo atestiguan, como es el caso del tratamiento antibacteriano, del antiviral o del antiparasitario: tratamiento empírico de la neumonía comunitaria grave, tratamiento frente a especies de *Brucella*, tratamiento antituberculoso, tratamiento antirretroviral, tratamiento frente al VHC, tratamiento frente a especies de *Plasmodium*, tratamiento anti-*Toxoplasma* y muchos otros casos. En el campo de las infecciones fúngicas, a excepción de una situación paradigmática como es el caso del tratamiento antifúngico combinado de la meningitis por *Cryptococcus neoformans*, no disponemos de estudios ni pruebas suficientes para soportar unas recomendaciones sólidas de combinación de antifúngicos en otros síndromes o entidades clínico-micológicas. Si bien los numerosos datos de combinación de antifúngicos procedentes de los estudios *in vitro* y de los ensayos *in vivo* en modelos animales de experimentación son favorecedores, en la teoría, de estas terapias combinadas, pocos son los datos procedentes de la investigación en humanos que puedan justificar, en la práctica, este tipo de actuaciones terapéuticas sobre las infecciones fúngicas invasivas (IFI). Los estudios que disponemos sobre combinación son limitados, anecdóticos, observacionales, retrospectivos y con críticas metodológicas relevantes que impiden asentar un cuerpo doctrinal de guía respecto a la terapia antifúngica combinada, tanto para las IFI causadas por especies de *Candida* como por *Aspergillus*, las cuales constituyen no menos del 90% de las micosis sistémicas graves a las que nos enfrentamos. ¿Cuándo?, ¿cómo?, ¿en quiénes?, ¿con qué combinar?, ¿en qué momento iniciar? y muchas otras preguntas están aún por responder, en un momento donde la idoneidad de las evidencias está ausente frente a la realidad de las indicaciones cotidianas en pacientes complejos y graves por estas patologías. No puede olvidarse que las combinaciones no están exentas de problemas: posible antagonismo, interacciones, toxicidad y coste económico. Con el mayor espectro y cualidades intrínsecas alcanzado gracias a la llegada de nuevos antifúngicos (equinocandinas, azoles de última generación), algunas cuestiones parecen ir aclarándose: ausencia de antagonismo entre anfotericina B y azoles frente a *Candida*, reducción de toxicidad debido al buen perfil de las equinocandinas, buena eficacia y coste aceptable de algunas combinaciones frente a *Aspergillus* (voriconazol más caspofungina). Queda también por dilucidar la validez y la necesidad de las terapias de combinación, frente a la monoterapia, en el tratamiento de las IFI según el escenario contemplado (terapia empírica, terapia dirigida inicial, terapia dirigida de rescate), la naturaleza del hongo implicado (levaduras o mohos) y el tipo de paciente al que atendemos (neutropénico, trasplantado, crítico, etc.). Por último, es preciso resaltar que la terapia antifúngica combinada es mucho más, y tanto la lógica como la imaginación nos abrirán frentes para recordar que la combinación puede y debe darse con otras moléculas no antifúngicas con propiedades antimicóticas (como algunos inmunosupresores), con la instrumentación o la cirugía, con la administración por diversas vías (instilación, tópica, en aerosol) y con otras estrategias de tratamiento como la inmunoterapia y la inmunomodulación. Es aquí donde más queda por desarrollar y, con los primeros estudios de combinación de polienos con *Mycograb* (una anticuerpo monoclonal recombinante frente a una chaperona, la HSP90) en el tratamiento de la candidiasis invasora, tal vez podremos abrir la vía de la combinación hacia lo que algunos han dado en llamar la tercera edad del tratamiento antimicrobiano.

Sesión SEM 2

Respuesta a estreses

Moderador: Antonio Di Pietro. Universidad de Córdoba. Córdoba

P18. Estrés salino en la levadura marina *Debaryomyces hansenii*

Fernando Calero, Vera Montiel, Clara Navarrete, Raúl García-Salcedo y José Ramos*

Departamento de Microbiología, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Córdoba, España

Debaryomyces hansenii es una de las levaduras más abundantes en el agua de mar, ecosistema caracterizado por su elevada concentración salina. En esas condiciones, las levaduras modelo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*, son incapaces de desarrollarse. A esta característica hay que añadir que la fisiología de *D. hansenii* se viene estudiando desde hace años y que su genoma se ha secuenciado de forma completa. Por todo ello, nuestro grupo considera a *D. hansenii* un buen modelo en el estudio de las respuestas a este tipo de estrés aunque la escasez de herramientas genéticas que permitan la obtención y selección de mutantes es el principal freno para el desarrollo de la investigación con esta levadura.

Nuestro grupo intenta abordar de una manera integrada el estudio de los procesos de halotolerancia/halofilia de *D. hansenii*. De esta manera estamos adaptando técnicas de biología molecular y proteómica al manejo de esta levadura y hemos identificado toda una batería de genes/proteínas que intervienen en la tolerancia a sal. Mientras que la mayor parte de estos determinantes también se han identificado en *Saccharomyces* con funciones muy probablemente similares (Ena1, 2, Nhx1, Trk1), otros parecen tener un comportamiento, de alguna manera diferente, al que poseen en *S. cerevisiae* (Hal2, Ppz1, Gzf3, Tdh1) y alguno no se ha identificado ni en *S. cerevisiae* ni en *Sch. pombe* (Hak1). Durante la presentación se mostrarán resultados concretos obtenidos con algunos de estos factores. En conjunto, los datos que manejamos sugieren que el proceso de halotolerancia en *D. hansenii* podría ser consecuencia de la actuación de múltiples factores, realizando cada uno de ellos su aportación individual al comportamiento final de esta levadura.

P19. Interacción entre la ruta HOG y la ruta SVG y de integridad celular en el hongo patógeno *Candida albicans*

Rebeca Alonso-Monge*, Elvira Román, David M. Arana, Susanne Gola, Pablo Castán, Alberto Miranda, Verónica Urrialde, César Nombela y Jesús Pla

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Madrid. E-mail: realonso@farm.ucm.es

Candida albicans es el hongo que con más frecuencia se aísla en infecciones fúngicas siendo además la cuarta causa de infecciones nosocomiales en países desarrollados. El arsenal terapéutico del que se dispone es limitado e ineficiente en casos de infección sistémica grave. Esta, junto a otras razones hace necesaria la investigación en *Candida albicans*, una investigación enfocada al estudio de nuevos antifúngicos o de dianas para el desarrollo de nuevos fármacos.

En este sentido las rutas de transducción de señales mediadas por quinasas MAP (Mitogen-Activated Protein Kinases) constituyen importantes factores de virulencia en *C. albicans*. En este hongo se han descrito cuatro MAPK pertenecientes a cuatro rutas de transducción de señales. Aunque en un principio a cada ruta se le asignó un papel principal, el estudio de los mutantes generados en las distintas cascadas de MAP quinasas ha demostrado que estas están implicadas en varios procesos y que existen entre ellas mecanismos de regulación. La ruta HOG media principalmente la respuesta a estrés (osmótico, oxidativo, metales y bajada de temperatura), además tiene un papel represor de la transición levadura-hifa, es necesaria para la formación de clamidosporas y para el mantenimiento de infección sistémica en un modelo de infección en ratón, además ejerce una función sobre la formación de la pared celular en condiciones no estresantes. Esta ruta controla además la fosforilación de la Mkc1, la MAPK de la ruta de integridad celular, en respuesta a estrés oxidativo y nitrosativo. La concentración necesaria para activar Mkc1 y su nivel de fosforilación varían cuando la ruta HOG está seccionada. Hog1 también ejerce una función represora sobre la activación de Cek1, la MAPK de la ruta de crecimiento invasivo y de la ruta SVG. Cek1 presenta un nivel de fosforilación elevado en condiciones basales en mutantes *hog1* y *pbs2* comparado con una cepa silvestre, esta hiperactivación se correlaciona con una mayor resistencia a compuestos que alteran la pared celular como son rojo Congo y el blanco de calcoflúor. La MAPK Cek1 se activa cuando un cultivo en fase estacionaria es refrescado en medio fresco a una baja densidad óptica, los resultados obtenidos sugieren que Cek1 estaría mediando la reconstrucción de la pared celular en las nuevas condiciones de cultivo. La ruta HOG parece jugar una función clave en el control de la activación/fosforilación de las otras rutas descritas hasta el momento en *Candida albicans*.

P20. Distintos niveles de H₂O₂ inducen distintas rutas de estrés en *Schizosaccharomyces pombe*

Mónica Jara, Ana P. Vivancos, Esther A. Castillo, José Ayté y Elena Hidalgo*

Unitat de Senyalització Celular. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona

El papel de la peroxiredoxina Tpx1 en transmisión de señal ha sido establecido recientemente: esta proteína detoxificadora de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es necesaria para la activación del factor de transcripción Pap1 en respuesta al oxidante. La activación de Pap1, encargado de activar la transcripción de genes antioxidantes en situaciones de estrés oxidativo moderado, no tiene lugar a dosis más altas de H₂O₂, aquellas que activan fuertemente a la ruta de la MAP quinasa Sty1. Mostraremos evidencias que demuestran que: (i) Tpx1 es el sensor de H₂O₂ en la ruta Pap1, encargado de transmitir a éste la señal redox; (ii) a dosis altas de H₂O₂, Tpx1 se inactiva temporalmente por formación de un ácido sulfínico en su cisteína catalítica; (iii) la reactivación de Tpx1, y puesta en marcha de la ruta Pap1, sólo se dará tras dosis altas de H₂O₂ cuando la proteína reductora de Tpx1, Srx1, se exprese en forma Sty1-dependiente; (iv) la función de Tpx1 como activador de la ruta Pap1 no excluye a esta peroxiredoxina de su función como detoxificador de H₂O₂, ya que dicha proteína es esencial para el crecimiento en condiciones aeróbicas (pero no anaeróbicas) de la levadura de fisión; (v) discutiremos acerca del significado biológico de que la peroxiredoxina eucariota Tpx1 sea sensible a la inactivación por sustrato.

Sesión AEM 3

Dermato-micología

Moderadora: Carmen Rubio. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza

P21. Dermatosis. Cambios epidemiológicos asociados a la inmigración

M^a Soledad Cuétara García

Servicio de Microbiología. Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid

En un sentido amplio se definen como dermatosis las infecciones superficiales causadas por una variedad de agentes etiológicos, entre los que cabe mencionar: levaduras del género *Candida* spp, *Malassezia* spp y *Trichosporon* spp y hongos miceliales como dermatofitos, *Scytalidium* spp y *Hortaea werneckii*. Algunos de estos géneros tienen una repartición geográfica y el aumento de la inmigración ocurrida en los últimos 15 años en España ha llevado consigo la aparición de cambios epidemiológicos ligados a este hecho, que se circunscriben especialmente a hongos dermatofitos y a *Scytalidium* spp.

Scytalidium spp nuestro medio se aísla habitualmente en pacientes que proceden de zonas endémicas, aunque existen tres casos descritos en población autóctona sin historia de viajes a zona endémica aunque en uno de ellos sí existía el contacto estrecho con inmigrantes. Una dificultad añadida es el hecho de que las infecciones producidas por dicho agente, en un alto porcentaje de casos coexisten con infección por hongo dermatofito; como clínicamente son indistinguibles uno de otro, es imprescindible sospecharlo para evitar el uso de acidina en los medios de cultivo cuando se quiere aislar *Scytalidium* spp. Además puesto que las infecciones causadas por este último son prácticamente intratables (no responden a tratamiento antifúngico tóxico ni sistémico), cuando coexisten ambas infecciones puede haber falta de respuesta terapéutica por la persistencia de *Scytalidium* spp.

En cuanto a las dermatofitosis resurgen especies que estaban erradicadas en nuestro país desde hace 50 años tales como *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum* y *Microsporium audouinii*, observándose en población inmigrante procedente de África, Caribe y América del Sur. Además, como consecuencia del contacto directo con dicha población inmigrante, ha emergido en población autóctona la infección por *T. tonsurans*. Esto fue observado en primer lugar en el área de influencia del Hospital 12 de Octubre en Madrid (del Palacio et al. Rev Iberoam Micol 1994; 11: 87-89) y fue confirmado tras un estudio prospectivo amplio realizado en nuestra Comunidad (Cuétara et al. Rev Iberoam Micol 1995; 12: 114-115; Cuétara et al. Rev Iberoam Micol 1996; 13: 24-25; Cuétara et al. Mycoses 1997; 40: 131-137; Cuétara et al. Br J Dermatol 1998; 138: 58-60); coincidiendo con lo observado en otras ciudades europeas con una gran tasa de inmigración tales como París y Londres.

Otras especies tales como *Trichophyton soudanense*, *Microsporium ferrugineum*, y más improbablemente como *Trichophyton schoenleinii* o más remotamente como *Trichophyton concentricum*, podrían detectarse en el futuro si aumentara la tasa de inmigración procedente de zonas endémicas. (Por razones epidemiológicas utilizo la terminología clásica de las especies de hongos dermatofitos sin basarme en los modernos estudios moleculares ni en otras clasificaciones propuestas por Kane & Summerbell & Kraiden et al. Laboratory Handbook of Dermatophytes. Star Publishing Company – Belmont, California).

P22. Diagnóstico de laboratorio de las onicomicosis

Antonio Rezusta^{1*}, M^a Carmen Rubio², M^a Carmen Aspiroz³,

M^a José Revillo¹

¹Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet; ²Microbiología, Hospital Universitario Lozano Blesa, y ³Microbiología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza

La onicomicosis es una infección fúngica progresiva y recurrente, que se inicia normalmente en el lecho ungueal y progresa hacia la uña. Aunque es una infección superficial debería considerarse seriamente ya que, entre otros problemas de salud significativos, origina los siguientes:

1. Pueden ser contagiosas: constituyen un reservorio y comportan como fuente de infección para otras personas –ya sea por contacto o a través del calzado– o para el mismo paciente (extendiéndose a otras partes del cuerpo).

2. Los pacientes con onicomicosis tienen aumentada la susceptibilidad a complicaciones: a) en diabéticos abren la puerta de entrada para infecciones bacterianas secundarias; favorecen el pie diabético y complicaciones subsiguientes como la amputación de miembros; b) desencadenan celulitis recurrente y tromboflebitis; c) el 92% de los pacientes manifiestan efectos negativos sociales o psicológicos; d) disminuye la calidad de vida; e) es causante de infecciones crónicas en otras localizaciones; f) el paciente se enfrenta también a la opinión del sistema de salud que considera la infección como un problema estético.

Hay un amplio acuerdo entre autores clínicos y de laboratorio sobre la necesidad de realizar un diagnóstico micológico antes de iniciar el tratamiento, ya que éste es prolongado, no está exento de efectos secundarios (vía oral) y es costoso. Pero además permite elegir de forma más adecuada el tratamiento, dependiendo de si se trata de un hongo dermatofito (HD), hongo micelial no dermatofito (HND) o levadura (L) y permite conocer otros afectados en el entorno del paciente, especialmente importante cuando el agente es *Trichophyton rubrum*. Sin embargo, el diagnóstico micológico sigue siendo excepcional, y manejando datos europeos, éste solamente se solicita desde Atención Primaria en un 3,4% de los casos, y en Atención Especializada (Dermatología) en un 39,6% de ellos. En el proceso diagnóstico es fundamental la toma de muestras, siendo necesario adaptarla al tipo de lesión que sufran las uñas, y siempre contemplando completarla con una observación detallada y toma de muestras del pie, especialmente de los espacios interdigitales.

El laboratorio debe siempre realizar cultivo y observación microscópica (OM) que, hasta el momento, son el "gold standard". Este criterio podrá ser modificado en un futuro, a la luz de las publicaciones que utilizan técnicas moleculares. De especial interés son las publicaciones en las que, mediante PCR, se ha identificado el agente etiológico de la onicomicosis en casos en los que el cultivo había resultado negativo pero se había observado el hongo mediante OM.

El no realizar OM hacer perder un buen número de diagnósticos (aproximadamente un tercio), pero además impide la correcta valoración de aquellos aislados que no son dermatofitos. El cultivo permite conocer el hongo causante, aunque no siempre se desarrolle y, la mejor manera de afrontar el tratamiento, las medidas higiénicas y las recomendaciones epidemiológicas y sociales.

También la realización de cortes histopatológicos aumenta los diagnósticos, y además permite saber si ante una onicomicosis blanca superficial, la infección es realmente superficial, especialmente en los casos en los que puede afectar a gran parte de la uña.

La aplicación de todos los métodos, cultivo, OM y PCR, permiten realizar un diagnóstico correcto en muchos casos, pero en gran medida dependen de la calidad de la muestra. También hay que tener en cuenta que un diagnóstico correcto no siempre garantiza que el tratamiento curará definitivamente, y así se debe comunicar al paciente.

P23. Tratamiento de las onicomicosis: elaboración de una guía terapéutica de consenso

Mario Lecha

Servicio de Dermatología. Hospital Clínic. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. Barcelona

El tratamiento de las onicomicosis sigue constituyendo un reto a pesar de los avances en la terapia antifúngica por las especiales características del sustrato anatómico la lámina ungueal.

El resultado del tratamiento no depende sólo de un correcto diagnóstico y una selección apropiada de fármacos sino de una serie de factores propios del mismo paciente y factores exógenos.

Como factores del propio paciente cabe destacar la situación de inmunocompetencia y la existencia de otras patologías como alteraciones endocrínicas –diabetes– o vasculares –insuficiencia venosa o arterial–. Como factores exógenos fundamentalmente factores mecánicos, traumatismos u oclusión excesiva y manipulación defectuosa de las láminas ungueales.

Por otra parte no debemos olvidar desde el punto de vista micológico, la etiología múltiple de las onicomicosis. Pueden ser debidas a infección dermatofítica, candidótica, por mohos o infecciones mixtas. De ahí la importancia de un buen diagnóstico micológico que determine la etiología de cada caso y nos permita una información sobre las posibles diferencias de susceptibilidad de los agentes implicados frente a los antifúngicos disponibles.

Otros aspectos de interés son: 1 –La forma clínica de la afectación ungueal y su extensión así como la afectación o no de la matriz ungueal, y 2 –Los parámetros a considerar para valorar la curación - curación micológica / curación clínica.

Las posibilidades terapéuticas abarcan el tratamiento tópico, oral, quirúrgico y combinado. El desarrollo de un documento de consenso en la 1ª Reunión Internacional de la Task Force on Onychomycoses ha sugerido el siguiente enfoque terapéutico:

1 – *Monoterapia tópica*: puede ser empleada en onicomicosis con afectación < 50 % de la lámina ungueal sin afectación de la matriz.

2 – *Monoterapia oral o terapia combinada* en casos de afectación > 50 % de la lámina ungueal y matriz ungueal. Cuando existen modificaciones de la lámina ungueal que determinen un transporte inadecuado de los antifúngicos a la misma (presencia de onicolisis, dermatofitoma) deben recomendarse medidas quirúrgicas asociadas.

Referencias

M Lecha, I Efendi, MF de Chauvin, N di Chiacchio, R Baran. Treatment options – development of consensus guidelines. JEADV 2005; 19:25-33.

Sesión SEM 3

Tecnologías recientes aplicadas a los hongos

Moderadora: M^a Isabel González Roncero. Universidad de Córdoba. Córdoba

P24. La genómica de los hongos: una nueva herramienta molecular

Luis M. Corrochano

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

Los genomas de hongos tienen un tamaño asequible a las técnicas de secuenciación genómicas y no suelen ser abundantes en secuencias repetidas. Además, la diversidad evolutiva que existe entre distintos grupos de hongos permite augurar que la investigación de la genómica de los hongos dará lugar a descubrimientos novedosos sobre los mecanismos implicados en la evolución de los genomas. Las investigaciones sobre la genómica de los hongos también ayudarán a descubrir genes y proteínas que pueden participar en algunos de los procesos biológicos en los que participan los hongos, como son la patogénesis animal y vegetal, la producción de compuestos de interés químico o biológico, y la degradación de compuestos naturales o artificiales. La genómica de los hongos puede y debe ser una más de las herramientas disponibles para investigar las bases moleculares de los problemas biológicos en los que participan los hongos.

Las bases de datos actuales contienen información sobre los genomas de 5 hongos, la mayoría ascomicetos. Pero existen varios proyectos de secuenciación de genomas de hongos que están en fase de ejecución y que permite suponer que el número de genomas de hongos disponibles en las bases de datos públicas se multiplicará hasta alcanzar los 25 en los próximos dos años. La mayoría de los genomas de los hongos modelos ya han sido secuenciados: los ascomicetos *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* y el basidiomiceto *Ustilago maydis* fueron de los primeros en entrar en el selecto club de los organismos con genomas secuenciados. El genoma del cigomiceto *Rhizopus oryzae* está ya disponible en las bases de datos y el genoma del cigomiceto *Phycomyces blakesleeanae* y del quitridiomyceto *Pyromyces* está en proceso de secuenciación lo que permitirá disponer en pocos meses de, al menos, un genoma de cada uno de los grandes grupos de hongos. Además, la disponibilidad del genoma de los hongos fitopatógenos *Fusarium* y *Magnaporthe* está permitiendo un enfoque genómico a las investigaciones sobre la naturaleza molecular de la patogénesis vegetal.

Los genomas de hongos tienen un tamaño relativamente parecido que oscila entre los 10 y 60 Mb y no suelen tener muchas secuencias repetidas, aunque hay excepciones. La disponibilidad de genomas de hongos evolutivamente emparentados permite estimar el papel de las duplicaciones génicas en la evolución de los hongos. Las secuencias genómicas están llenas de sorpresas. Por ejemplo, el genoma de *Neurospora crassa* contiene genes para varios tipos de fotorreceptores de luz azul y dos genes para fitocromos que son fotorreceptores de luz roja, aunque todas las fotorrespuestas investigadas en *Neurospora* solo responden a la luz azul. El genoma de *Neurospora* también contiene genes relacionados con la patogénesis vegetal, aunque no se conoce que *Neurospora* sea un hongo fitopatógeno. Ascomicetos y basidiomicetos contienen en su genoma una copia del gen *wc-1* responsable de un fotorreceptor que actúa, además, como factor de transcripción junto al producto del gen *wc-2*. El genoma de los cigomicetos *Phycomyces*, *Mucor* y *Rhizopus* contiene, sorprendentemente, tres genes *wc-1* y cuatro genes *wc-2*, como resultado de duplicaciones que han incluido en algunos casos a genes cercanos y que deben haber permitido que esta clase de hongos tenga disponible un gran surtido de proteínas fotorreceptoras. La genómica comparada de hongos debe permitir descubrir, además, algunas de las rutas evolutivas que han dado lugar a la gran diversidad de hongos que existen en la naturaleza.

P25. Metabolómica: precursores, enzimas y regulación de la biosíntesis de β -lactamas

Carlos García-Estrada^{1*} y Juan Francisco Martín^{1,2}

¹Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC). Parque Científico de León, León y ²Área de Microbiología, Fac. CC. Biológicas y Ambientales, Universidad de León, Campus de Vegazana, León

Las penicilinas y cefalosporinas son los antibióticos β -lactámicos más frecuentemente utilizados para el tratamiento de numerosas enfermedades infecciosas. A diferencia de la penicilina, que se produce por algunos hongos filamentosos como *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus nidulans*, las cefalosporinas se sintetizan tanto por bacterias como por el hongo *Acremonium chrysogenum*. Tanto la biosíntesis de penicilinas como la de cefalosporinas comienzan de un modo similar, compartiendo las dos primeras reacciones enzimáticas, las cuales consisten en la condensación no ribosomal de los tres aminoácidos precursores (ácido L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina) para constituir el tripéptido \bar{U} (L- α -aminoadípil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) y su posterior ciclación para formar isopenicilina N (IPN). La biosíntesis de penicilina está compartimentalizada dentro del interior celular, lo que implica el transporte de las enzimas, precursores, intermediarios y productos a través de los distintos compartimentos. Esta organización subcelular de la biosíntesis de penicilina permite la separación espacial de los procesos, lo que indica que cada paso posee un entorno sujeto a diferentes procesos de regulación para conseguir las óptimas condiciones. La síntesis de ACV se lleva a cabo en el citosol y está catalizada por la enzima ACV sintetasa (codificada por el gen *pcbAB*). La ciclación oxidativa del tripéptido para generar IPN está catalizada por la enzima IPN sintasa (codificada por el gen *pcbC*) y también tiene lugar en el citosol. El último paso se lleva a cabo por la isopenicilina N aciltransferasa (IAT), que está codificada por el gen *penDE* y consiste en la sustitución de la cadena lateral L- α -aminoadípil de la IPN por un grupo acilo hidrofóbico previamente activado en forma de acil-CoA por una aril-CoA ligasa específica. Tanto la sustitución de la cadena lateral de la IPN como la activación del precursor acilo, se llevan a cabo en el interior de los peroxisomas (microcuerpos) bajo un ambiente ligeramente alcalino. Los genes que codifican las enzimas que participan en la biosíntesis de penicilinas están organizados en un clúster génico, que a su vez se encuentra localizado en una región que sufre amplificación en tándem en las cepas de *P. chrysogenum* de alta producción. En *A. chrysogenum* los genes que codifican las dos primeras enzimas de la ruta biosintética de cefalosporinas están agrupados en el mismo clúster que los genes que codifican las enzimas responsables de la epimerización de la IPN (genes *cefD1* y *cefD2*). En cambio, existe un segundo clúster génico situado en un cromosoma diferente que contiene los genes que codifican las enzimas que catalizan las últimas reacciones de formación de cefalosporinas (genes *cefEF* y *cefG*). La biosíntesis de β -lactamas está controlada por numerosos factores tales como la fuente de carbono y nitrógeno, el pH o la presencia de determinados aminoácidos. Esto indica la existencia de procesos complejos de regulación que controlan la expresión de los genes que codifican las enzimas que participan en las rutas biosintéticas de antibióticos β -lactámicos.

P26. Señales autorreguladoras y su papel en la morfogénesis

Unai Ugalde Martínez

Facultad de Ciencias Químicas de Donostia-San Sebastián UPV/EHU

El micelio es un tipo de colonia capaz de generar diversos tipos de célula simultáneamente en función de distintos microentornos que encuentra, y a la posición de cada célula. En las zonas periféricas, tiene lugar una extensión radial a través de hifas que se extienden por el ápice principalmente, sin aparente formación de ramificaciones laterales. En las zonas distales, sin embargo, las ramificaciones se prodigan y resultan en anastomosis, creando así una matriz de células interconectadas. También en estas zonas, las hifas aéreas pueden dar lugar a conidióforos. Las zonas más antiguas a menudo sufren autólisis controladas en combinación con la formación de estructuras de resistencia a condiciones adversas a largo plazo, como son los cleistotecios o esclerocios, por ejemplo.

Este nivel de organización apoya la conclusión de que el micelio está gobernado por un sofisticado sistema quimiosensorial. Es probable que muchos de los compuestos que actúan en este sistema ya hayan quedado inventariados tras las muchas décadas de búsqueda de metabolitos fúngicos. Sin embargo, la mayoría de los procesos morfogenéticos descritos de manera exhaustiva en la literatura se han asignado a señales sin identificar (Ugalde, 2006).

La inducción de la conidiación representa un buen ejemplo para ilustrar la complejidad de este proceso biológico y la actual desconexión entre la información sobre señalización química y sus funciones biológicas. En 1994, Lee y Adams describieron una mutación en el gen *fluG* de *Aspergillus nidulans* que resultaba en ausencia de conidiación. Estos mismos investigadores mostraron que el gen participaba en la síntesis de un metabolito que activaba el proceso, puesto que el contacto de cepas *fluG* con la cepa silvestre resultaba en la recuperación del fenotipo conidiante. La acumulación del metabolito en las hifas se postuló como una señal de emergencia a la atmósfera. Estudios recientes en nuestro laboratorio indican que se trata de un terpeno de peso molecular 314, cuya estructura y funciones se tratarán en detalle.

En 2005, Soid-Raggi y colaboradores descubrieron la intervención del gen *tmpA* en la señalización de la conidiación, a través de una ruta aparentemente independiente de la antes descrita, sugiriendo que la inducción de la conidiación pudiese requerir más de una señal para desencadenarse. Recientemente, nuestro grupo ha encontrado una tercera señal que actúa en la misma ruta de señalización en la que interviene el gen *fluG*, a través de un metabolito distinto.

Estos datos aportan una nueva perspectiva sobre la inducción de la conidiación como un proceso complejo en el que se integran múltiples señales que dan cuenta de parámetros ambientales, metabólicos y fisiológicos.

Referencias

- Lee, B.N. y Adams, T.H. The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamin synthetase. *Genes and Development* 1994; 8:641-651.
- Soid-Raggi, G., Sanchez, O., y Aguirre, J. *tmpA*, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 2005; 59:854-869.
- Ugalde, U. Autoregulatory signals in mycelial fungi. In *Mycota* Vol. 1 Growth and Development. Fischer y Kúes Editores. Springer. Berlin. 2006.

Sesión Plenaria 3

Diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras

Moderador: Guillermo Quindós. Universidad del País Vasco. Bilbao

P27. Retos actuales en el diagnóstico de las micosis invasoras

Guillermo Quindós

Laboratorio de Micología Médica, Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao

Las micosis invasoras han adquirido una gran importancia médica y, aunque la mayoría de las infecciones están causadas por *Candida*, la frecuencia de las producidas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos ha introducido importantes cambios en el espectro etiológico de estas enfermedades.

La inmunodeficiencia y la alteración de las barreras anatómicas y fisiológicas son los mayores riesgos que predisponen a estas micosis y los pacientes ingresados en determinados servicios clínicos, como hematología, oncología, trasplantes o unidades de cuidados intensivos, son los que las sufren con mayor frecuencia. Las micosis más graves afectan a pacientes con neoplasias hematológicas y/o con neutropenia más profunda. Estas infecciones no se caracterizan por desarrollar signos o síntomas patognomónicos y su sospecha y diagnóstico clínico son realmente complicados.

Una prueba diagnóstica ideal debería tener unas adecuadas propiedades técnicas, estar adaptada a cualquier laboratorio de microbiología clínica, proporcionar un alto grado de certeza diagnóstica y ser positiva en una fase temprana de la enfermedad.

No poseemos todavía ninguna prueba que cumpla estos requisitos para el diagnóstico de las micosis invasoras y muchas veces es necesario combinar varias técnicas para conseguir unos resultados aceptables. El aislamiento de hongos en los hemocultivos y otras muestras clínicas habitualmente estériles se mantiene como un marcador diagnóstico insensible para las micosis invasoras, aunque se ha mejorado ostensiblemente en el diagnóstico microbiológico e histopatológico. Además, en los últimos años se han desarrollado varias pruebas que pueden contribuir a conseguir un diagnóstico rápido de las micosis invasoras, como las pruebas de imagen y la detección de marcadores fúngicos circulantes como (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano, galactomanano o ADN fúngico. Las pruebas diagnósticas basadas en la imagen, sobre todo en el empleo de TAC, son útiles principalmente en las micosis pulmonares, como la aspergilosis pulmonar invasora. Los métodos de detección de antígenos o componentes fúngicos como el (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano y el galactomanano, que se encuentran en evaluación clínica, son prometedores. El (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano puede estar presente en la sangre de pacientes con micosis por una amplia variedad de hongos que incluye *Candida*, *Aspergillus* y *Fusarium* y, junto con la detección de ácidos nucleicos fúngicos, se pueden considerar marcadores panfúngicos. El galactomanano puede ser detectado en la sangre en estadios tempranos de una aspergilosis invasora y la prueba puede volverse positiva antes de que exista una sospecha clínica de aspergilosis. Sin embargo, la etiología de los resultados positivos falsos con la detección de galactomanano no ha sido completamente dilucidada. La utilidad diagnóstica de la detección de ADN o ARN fúngicos mediante PCR está siendo investigada y la mayoría de las pruebas necesitará una adecuada adaptación y validación antes de poder ser recomendado su uso clínico.

Agradecimientos: El autor ha sido financiado por los proyectos PI030662/2003 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

P28. Diagnóstico por la imagen de las infecciones fúngicas invasoras

Jose Alberto Hidalgo Pérez

Servicio de Radiodiagnóstico. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Las infecciones fúngicas invasoras suelen afectar a pacientes inmunodeprimidos graves. Debido a que este tipo de infecciones tienen un alto riesgo para la vida del paciente, es importante que se realice un diagnóstico precoz que permita instaurar el tratamiento adecuado.

Las técnicas de imagen radiológica han tenido un desarrollo espectacular en los últimos años, lo que ha permitido aumentar tanto la sensibilidad como la especificidad a la hora de diagnosticar las infecciones fúngicas en pacientes a riesgo. En la actualidad, las técnicas de imagen están incorporadas de manera rutinaria en la mayor parte de los centros en el manejo de este tipo de pacientes.

Las infecciones fúngicas invasoras pueden afectar a cualquier estructura del organismo. No obstante, el sistema respiratorio y el sistema nervioso central son los órganos que con mayor frecuencia se ven afectados por este tipo de microorganismos.

La afectación del sistema nervioso central puede comprometer el parénquima y ser focal (abscesos) o difusa (encefalitis). No obstante, también las meninges y los compartimentos extra-axiales pueden verse afectados (empiema epidural y subdural). La mejor técnica para la valoración de estas lesiones es la resonancia magnética. La excelente resolución que permiten las secuencias con contraste junto con la capacidad de obtener imágenes en distintos planos del espacio y la correcta diferenciación de las estructuras óseas adyacentes hacen posible una mejor y más precoz localización de las infecciones parenquimatosas cerebrales. Recientemente, el uso de nuevas técnicas como la espectroscopia, las secuencias de difusión y las secuencias de perfusión permitirán una mejora en la detección y caracterización de estas infecciones.

Las infecciones fúngicas invasoras en el sistema respiratorio pueden afectar a la vía aérea y/o al parénquima pulmonar. La radiografía de tórax es la primera técnica que se usa en la valoración de los pacientes con sospecha de infección fúngica pulmonar, pero en la mayor parte de los casos es necesario completar la exploración mediante tomografía computarizada dado que es una técnica más sensible y específica. La tomografía computarizada de alta resolución (TACAR) es una modalidad de tomografía computarizada que permite una mejor valoración del parénquima pulmonar. En el caso concreto de las aspergilosis angioinvasivas, la tomografía computarizada de alta resolución diagnostica la presencia de afectación pulmonar hasta 5 días antes que la radiografía de tórax. Las infecciones fúngicas de la vía aérea son la traqueobronquitis, la bronquiolitis y la bronconeumonía. Excepto la traqueobronquitis, que generalmente no da imagen radiológica y suele diagnosticarse mediante broncoscopia, tanto la bronquiolitis como la bronconeumonía producen imagen mediante TACAR bastante sugestivas (imagen de árbol en gemación e imagen de consolidación). En aquellos casos en los que la infección del parénquima pulmonar se produzca por hongos angioinvasivos (p.ej. *Aspergillus*, *Scedosporium*), la imagen que suele obtenerse mediante TACAR es la del nódulo "con halo" y la del nódulo cavitado con morfología de semiluna ("crescent sign").

El diagnóstico por la imagen tiene un papel fundamental en el diagnóstico de la infección fúngica invasora. En aquellos casos en los que los hallazgos radiológicos son sutiles o equívocos, las técnicas de tomografía computarizada, sobre todo la TACAR, permiten en la mayoría de los casos el diagnóstico de la infección. Aunque los hallazgos radiológicos de las diferentes infecciones fúngicas invasoras no son específicos, en el contexto clínico apropiado, el conocimiento de la semiología del TACAR puede sugerir e incluso establecer el diagnóstico correcto.

P29. Diagnóstico de laboratorio de infecciones fúngicas invasoras (IFI)

Amalia del Palacio^{1*}, Almudena Alhambra¹ y M^ª Soledad Cuétara²
¹Unidad de Micología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Doce de Octubre, y ²Servicio de Microbiología, Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid

Casi el 70% de los enfermos con infección fúngica invasora (IFI) no reciben tratamiento antifúngico y son diagnosticados en la necropsia, debido a las limitaciones microbiológicas utilizando procedimientos clásicos, y a que el cuadro clínico de IFI es inespecífico, de aparición tardía en el curso de la enfermedad e incluso pueden estar ausentes los síntomas en los enfermos inmunosuprimidos.

Actualmente las nuevas pruebas diagnósticas mediante detección de antígenos fúngicos (galactomanano (GM), 1-3-β-D-glucano (BG)), anticuerpos (anticuerpos antimicelio (AAM)) y la detección mediante PCR de DNA fúngico han supuesto un avance diagnóstico que permite la instauración de un tratamiento adelantado de IFI, la monitorización terapéutica e incluso limitan el tratamiento antifúngico empírico y desterrar la profilaxis. Los mananos (Mn) y anticuerpos anti Mn (AcMn) permitirían la detección de infecciones producidas por *Candida* spp. En la tabla se recogen las principales características de estos marcadores comercializados. Omitimos PCR por no haber sistema comercializado.

Los diversos marcadores pueden ser detectados transitoriamente en la sangre y por consiguiente una sola muestra de suero no es válida para descartar IFI, necesitando al menos 2 muestras de suero semanales durante todo el periodo de riesgo.

Para la detección de los marcadores es fundamental definir las poblaciones que tienen riesgo de IFI, estratificando los enfermos y diferenciando los grupos de pacientes, situaciones clínicas (neutropénicos adultos, receptores de trasplantes, enfermos críticos etc). Hay que tener en cuenta que para que estas pruebas de diagnóstico indirecto (screening o cribado en pacientes con riesgo de IFI) tengan utilidad diagnóstica e impacto sobre los enfermos deben ser hechas prospectivamente y deben ser validadas siguiendo los criterios conjuntos de la EORTC y del MSG (del NIAID), estableciendo 3 categorías de IFI: probadas, probables y posibles.

En el momento actual es necesario validar las distintas pruebas de diagnóstico indirecto. Solo el GM en poblaciones neutropénicas adultas ha sido validado rigurosamente (los estudios de validación del GM realizados en enfermos neutropénicos adultos en Centroeuropa son un ejemplo de lo que debería hacerse para validar estos marcadores). En neutropénicos adultos (Maertens et al; Clin Infect Dis 2005; 41:1242-1250) utilizando la detección prospectiva de GM, CT torácico (y/o senos) de alta resolución y broncoscopia con lavado (en enfermos sin hipoxia ni plaquetopenia) es posible la reducción del tratamiento empírico en neutropénicos febriles del 35% al 8% y la iniciación de tratamiento adelantado (pre-emptive) en el 60%. Todos los marcadores tienen limitaciones por lo que la utilización conjunta de todos ellos en el diagnóstico de IFI permitiría obviarlas.

Tabla1. Características de los marcadores fúngicos comercializados

Detección de IFI	GM	BG	Mn	AcMn	AAM
Género	<i>Aspergillus</i> spp	Panfúngico*	<i>Candida</i> spp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Candida</i> spp.
Población estudiada					
Neutropénicos adultos	++++	++	+/-	+/-	++
Paciente crítico	-	+	+/-	+/-	+
Receptores de Tx	+	+	-	-	+
Estudios prospectivos controlados	Sí	No	No	No	Escaros datos
Datos colonización	+/-	-	-	-	+/-
Sensibilidad					
Valor predictivo negativo	Elevado	Elevado	No disponible	No disponible	Elevado

*Excepto *Cryptococcus* spp. y zigomicetos.

Agradecimientos: Amalia del Palacio es receptora de las siguientes becas: Fondo de Investigación Sanitario (PI040776), Fundación Mutua Madrileña Automovilista y beca de Investigación Médica de Pfizer, España.

P30. Diagnóstico histopatológico de las micosis

E. Mayayo Artal
Hospital Universitario Juan XXIII. Tarragona

Decir que las infecciones asientan sobre todo en países poco desarrollados o mal llamados del tercer mundo, es una gran aseveración. Son los pobladores de estos países los que fundamentalmente sufren diversas y variadas infecciones con millones de afectados. Pero, los países más desarrollados no estamos exentos de padecer estas enfermedades, aunque si en menor frecuencia y poseyendo mejores métodos de diagnóstico y un amplio arsenal de fármacos para su tratamiento. En estos países desarrollados, la incidencia suele relacionarse a un alto grado de tecnificación, a poseer una medicina de alta calificación y a disponer de fármacos de última generación. Podemos decir que el realizar una medicina más agresiva, los trasplantes, la inmunosupresión producida como consecuencia de terapias agresivas, el uso y abuso de fármacos, la mayor incidencia de diabetes, la hospitalización o la misma longevidad, hacen que seamos más propensos a sufrir muchas y variadas infecciones. Mención especial a una enfermedad con muy distinto pronóstico, según a quién y donde afecte, pero con un vector común que es ser gran favorecedor de padecer secundariamente todo tipo de infecciones, como es el sida. Punto que nos llevaría a la reflexión y a recordar la famosa frase que reza "polos opuestos se atraen".

Delimitando las causas de las infecciones y centrando la atención a aquellas producidas por los hongos, recordar que hay más de 2 millones de géneros y especies reconocidas, pero que afortunadamente las patógenas se limitan a unas 700 especies. Esos hongos afectan fundamentalmente a pacientes inmunocomprometidos, pero no exclusivamente. Lo pueden hacer de forma local o sistémica y clínicamente se clasifican en relación a su asentamiento ya sea superficial, subcutáneo, profundo o sistémico. Ante la sospecha de una micosis lo principal es su diagnóstico y conocer correctamente el agente causal. Ello es necesario para poder realizar un tratamiento más específico, por disponer cada vez más de más y mejores fármacos antifúngicos. Hecho que puede llevar a un mejor pronóstico. Entre los profesionales que trabajan para realizar el diagnóstico, están los patólogos. Con su metodología de estudio en muchos casos pueden ser la clave del diagnóstico de las micosis, aunque se hallan limitados por las peculiaridades de los hongos. Este hecho hace que la mejor manera de llegar a un correcto diagnóstico sea trabajar en conjunto patólogos, clínicos, micólogos y todos los profesionales de la salud que tengan contacto con estas patologías.

Los patólogos mediante los estudios citológicos, biopsicos y autópsicos, determinan la lesión, el tipo de respuesta del organismo hacia el patógeno y las características del hongo. Es en relación a las características morfológicas como orienta el diagnóstico. La forma, tamaño, septaciones, ramificaciones o la coloración orientan el género. Las técnicas de histoquímica o inmunohistoquímica son las que nos permiten precisar los detalles que nos concretarán el diagnóstico.

Candida, *Aspergillus*, Zigomicetos, *Cryptococcus* son los hongos más habituales en nuestro entorno. Sin embargo los hongos dimorfos como son *Blastomyces*, *Paracoccidioides*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, los más fáciles de diagnosticar por sus peculiaridades morfológicas. Otros, como los productores de cromomicosis, feohifomicosis, hialohifomicosis, lobo-micosis, rinosporidiosis, son orientables en su diagnóstico y el patólogo es de gran ayuda para su confirmación. La experiencia y sobre todo el estudio, son dos pilares básicos para saber diferenciar una micosis de otras muchas lesiones que poseen características semejantes y que a veces pueden ser confundidas.

Presentamos casos de citologías, biopsias o autopsias en los que el patólogo, con su metodología de estudio, ha llegado a un diagnóstico de patología fúngica.

Sesión Plenaria 4

Aplicación de las técnicas de biología molecular en Micología

Moderador: Pere Coll. Servicio de Microbiología. Hospital de Sant Pau. Barcelona

P31. Técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico de las infecciones fúngicas

José Carlos Palomares Folá

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Valme. Sevilla

Las técnicas moleculares de diagnóstico microbiológico, se están incorporando al espectro de herramientas propias de la microbiología clínica, en primer lugar como una opción que salva las dificultades de detección de microorganismos no cultivables o de difícil/lento desarrollo *in vitro*, pero además, con la ventaja frente a las técnicas basadas en el cultivo, de la mayor rapidez de obtención de resultados.

El diagnóstico molecular permite aumentar la sensibilidad y la rapidez de la detección fúngica y, además, identificar al patógeno sin necesidad de cultivarlo. Otra clara ventaja de los métodos de detección de ácidos nucleicos frente al cultivo, es la posibilidad de detección de patógenos en muestras de pacientes que están recibiendo terapia antifúngica ya que la viabilidad del hongo no es imprescindible para el diagnóstico aunque, obviamente, puede haber disminuido la carga fúngica en la muestra por efecto del tratamiento recibido.

¿Será o no útil y rentable instaurar las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de las infecciones fúngicas en el laboratorio? Esta es la pregunta que no hacemos los microbiólogos clínicos, y para tratar de responderla discutiremos en nuestra ponencia cuestiones claves que no están definitivamente resueltas, por ejemplo: ¿qué muestras son las que ofrecen un mejor rendimiento para la detección del ADN fúngico?, ¿qué secuencia debe elegirse para su uso en el diagnóstico rutinario?, ¿cuál es el método óptimo para extraer el ADN?, ¿qué métodos de amplificación y detección son los mejores? y ¿cuanta de la información generada por estas técnicas redundará definitivamente en beneficio del paciente?

Para el diagnóstico de las infecciones fúngicas, se puede utilizar prácticamente cualquier tipo de muestra clínica, desde líquidos orgánicos a tejidos. Las muestras que han sido más estudiadas, hasta el momento, son la sangre y el suero; aunque se dispone de interesantes resultados con casi cualquier fluido primariamente estéril, como líquido cefalorraquídeo, humor acuoso y vítreo, líquidos de derrames, lavado broncoalveolar y diversos tejidos.

La eficacia diagnóstica de los distintos métodos moleculares dependerá en gran medida de la técnica de extracción utilizada. En términos generales, los métodos de extracción deben seguir protocolos universales y, si es posible, deben estar comercializados. Además, se debe intentar mejorar su capacidad de concentración y purificación de los ácidos nucleicos mediante procesos de automatización o mediante tratamientos específicos (sonicación, congelación, etc.).

Las moléculas utilizadas como blanco de detección en las pruebas desarrolladas para el diagnóstico de las micosis incluyen tanto genes mitocondriales como nucleares, de una o múltiples copias. En general, los métodos diagnósticos moleculares que utilizan genes multicopia ofrecen mejores resultados que aquellos que emplean genes con una sola copia. La diana multicopia más utilizada son los genes ribosómicos. De un modo práctico, pueden considerarse las dianas ribosómicas y las no ribosómicas como dos categorías diferenciadas para valorar los distintos métodos de detección de hongos.

El hallazgo de zonas variables, como los fragmentos ITS 1 y 2 del ADN ribosómico (ADNr) o las zonas D1/D2 del 28S de ADNr, están desplazando las pruebas basadas en la detección del 18S.

En cuanto al sistema de amplificación y detección, la mayoría de los trabajos que están demostrando mejores resultados, emplean PCR a tiempo real. Con esta técnica, la recolección y el análisis de datos se producen al mismo tiempo que la reacción de amplificación de dianas. Para ello, al mismo tubo de reacción se añaden marcadores de ADN o sondas fluorescentes; de esta forma, durante la amplificación se mide la aparición de ciertos componentes y así es posible recoger y analizar los datos al mismo tiempo, reduciendo con ello la contaminación por "arrastré" que proviene de los mismos amplicones obtenidos en PCRs anteriores.

En micología médica, las técnicas alternativas al cultivo se han desarrollado como métodos de diagnóstico precoz de las micosis invasoras en enfermos inmunodeprimidos. La rentabilidad actual de estas técnicas no es muy elevada, aunque en algunas instituciones sanitarias, la detección de componentes fúngicos, como el galactomanano y el β -glucano, se incluyen rutinariamente entre las pruebas diagnósticas que se realizan en enfermos oncohematológicos con alto riesgo de micosis invasoras, particularmente de aspergilosis y de candidiasis.

La aparición de métodos basados en la PCR, así como la difusión de las técnicas de cuantificación de ácidos nucleicos, como la PCR en tiempo

real, pueden ayudar a la implantación del diagnóstico molecular en la práctica microbiológica asistencial. Estas técnicas están automatizadas, parcial o totalmente, y aportan sistemas comerciales de extracción, purificación, amplificación y detección de ácidos nucleicos, por lo que existe la posibilidad de elaborar protocolos estandarizados, aplicables a los laboratorios clínicos, con fiabilidad metodológica y, quizá, rentabilidad diagnóstica.

Actualmente, algunos centros con experiencia, como algunos hospitales terciarios y centros de referencia, utilizan métodos basados en la biología molecular, como complemento de las técnicas clásicas en el diagnóstico de las IFI y están encontrando resultados esperanzadores. Por ello, aunque estas micosis no son frecuentes, ante una sospecha de IFI se recomienda valorar la posibilidad de emplear un método de diagnóstico molecular en su diagnóstico.

P32. Epidemiología molecular de las infecciones fúngicas

María Francisca Colom

Laboratorio de Micología. Facultad de Medicina. Universidad Miguel Hernández. Campus de Sant Joan d'Alacant. Alicante

La aplicación de técnicas de biología molecular para el estudio del comportamiento de un microorganismo patógeno en una comunidad, es lo que llamamos epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. En micología, estos métodos han sido aplicados desde principios de los años 90 en estudios aislados sobre especies o géneros muy concretos. Desde entonces se han ensayado diferentes técnicas y se han obtenido gran cantidad de datos que permiten orientar el uso de distintos métodos según las aplicaciones. Los métodos basados en el fenotipado de hongos, como en otros microorganismos, tienen una menor fiabilidad que los basados en el genotipado. El fenotipo es siempre más susceptible de variación que el genotipo, de hecho es el resultado de la expresión del genotipo, por lo que la diferenciación de poblaciones es más estable con métodos de estudio del genoma. Esta diferenciación de poblaciones dentro de un género o una especie, puede ser de gran utilidad en clínica para distinguir reinfecciones de recidivas y en la detección de cepas con distinta virulencia pero, sin duda, la aplicación más importante de estos métodos es el estudio y seguimiento de brotes de enfermedad. Los métodos moleculares permiten detectar el número de clones circulantes en una comunidad en un momento concreto, identificar la fuente o reservorio del microorganismo y el posible vehículo de transmisión, así como evaluar la efectividad de los métodos de control del proceso, entre otros parámetros de interés epidemiológico.

La importancia creciente de las micosis oportunistas de tipo nosocomial, ha sido el principal impulsor en el desarrollo de estos métodos en micología clínica y por tanto, la mayoría de los estudios se centran en el tipado intragénero e intraespecie de los géneros *Candida* y *Aspergillus*. Por otra parte, el peculiar comportamiento patógeno de las especies de *Cryptococcus* y el desconocimiento de muchos detalles de su transmisión desde los reservorios descritos, ha llevado también al desarrollo de importantes trabajos de epidemiología molecular de la criptococosis, que es otra de las graves micosis oportunistas que despiertan gran interés en clínica. Otros géneros y especies de hongos implicados en procesos infecciosos han sido sometidos a tipado molecular con la finalidad de obtener información epidemiológica. *Histoplasma capsulatum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton tonsurans*, *Sporothrix schenckii*, son algunas de las especies sometidas a estudios de epidemiología molecular. La información obtenida de estos trabajos, en ocasiones no pretende ser válida más allá del estudio de un brote concreto, pero a veces se plantea en el sentido de crear fondos de datos válidos para estudios comparativos que amplíen el conocimiento sobre distribución de cepas de una especie en grandes ámbitos geográficos.

En cuanto a los métodos, se han utilizado un gran número de técnicas moleculares con finalidad epidemiológica. Entre las primeras empleadas cabe destacar el estudio del electrocariotipo mediante electroforesis en gel en campo pulsado -PFGE- (Pulsed Field Gel Electrophoresis) y la obtención de perfiles mediante diferentes métodos de hibridación de ácidos nucleicos. Todas ellas han quedado obsoletas tras la aplicación de métodos basados en la amplificación de fragmentos de DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Estos métodos a su vez pueden subclasificarse según la estrategia utilizada para evidenciar diferencias en la secuencia genómica. Puede considerarse que los más importantes son los que amplifican secuencias al azar mediante el uso de cebadores arbitrarios -RAPD- (Random Amplified Polymorphic DNA), los que obtienen diferentes perfiles tras la digestión enzimática del fragmento amplificado -RFLP- (Restriction Fragment Length Polymorphism) y los que obtienen "huellas digitales" (fingerprinting) por amplificación mediante secuencias cortas altamente repetidas (mini y micro-satélites) que se utilizan como cebadores únicos. Actualmente se está imponiendo el uso de estas últimas especialmente cuando se precisa un alto poder discriminativo entre los aislados. En estos casos, el estudio de los perfiles que se obtienen, con frecuencia necesita análisis mediante software específico, que ordena los clones representándolos en agrupamientos o *clusters* según su grado de similitud.

La elección de una técnica u otra depende, además de las consideraciones económicas, de la aplicación concreta del estudio y de factores de

tipo técnico, como la rapidez, laboriosidad, dificultad de interpretación, poder discriminativo, reproducibilidad, etc.

En la actualidad se busca la estandarización de los métodos de trabajo y los criterios de interpretación de resultados para la aplicación de estas herramientas en un ámbito globalizado y con indicaciones precisas según el objetivo y el patógeno implicado.

P33. Biología molecular y filogenia

José F. Cano*, Josepa Gené, Felix Gilgado, Rita Marimon, Mónica Azor y Josep Guarro

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Vigili, 43201-Reus, Tarragona

El fácil acceso a las secuencias de diferentes tipos de genes fúngicos ha permitido el desarrollo del concepto "genealogical concordance phylogenetic species recognition (GCPSR)" que ha demostrado ser útil para la definición de especies fúngicas en sustitución de otros tales como "concepto biológico de especie" que no puede ser aplicado en muchos hongos como por ejemplo en aquellos que no expresan su teleomorfo. Los estudios de GCPSR se basan generalmente en el análisis conjunto de las secuencias de diferentes genes estructurales y ribosomales y han permitido poner en evidencia agrupamientos de individuos genéticamente aislados en la naturaleza y que finalmente han resultado ser especies crípticas. Esta metodología ha permitido reconocer que determinadas especies morfológicas de interés clínico como por ejemplo *Histoplasma capsulatum*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus* o *Paracoccidioides brasiliensis* entre otras, agrupaban a varias especies filogenéticas. Sin embargo, algunas de estas especies solo pueden ser reconocidas utilizando técnicas moleculares. En muchos casos estos problemas pueden solucionarse utilizando criterios polifásicos para la delimitación de las especies, consistentes en la utilización de características morfológicas, culturales y fisiológicas junto a los resultados obtenidos en el análisis de las secuencias. Se revisan algunos trabajos recientes donde se pone de manifiesto el potencial de este enfoque, no tan solo desde el punto de vista taxonómico sino también a nivel epidemiológico y mostramos los resultados de nuestra experiencia en este tipo de estudios con las especies de los complejos *Pseudallescheria boydii*, *Sporothrix schenckii* y *Fusarium solani*.

Sesión AEM 4

Cryptococcus spp. y zoonosis

Moderador: Javier Cabañes. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra

P34. The expanding realm of *Cryptococcus neoformans* Teun Boekhout

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS-KNAW), Utrecht, The Netherlands, boekhout@cbs.knaw.nl

Cryptococcus neoformans is a basidiomycetous human pathogenic yeast with a predilection for the central nervous system. For a long time a single species divided into three varieties and four serotypes (A-D) was recognized, but various genotyping approaches have yielded a more complex genotypic and infraspecific substructure. *C. neoformans* contains two serotypes A, D, and the AD hybrids. *C. gattii*, previously considered to be a variety under *C. neoformans*, comprises serotype B and C isolates. Nine different genotypes can be discerned. Six of them represent haplotypes, two in *C. neoformans* and four in *C. gattii*. Three genotypes represent diploid or aneuploid hybrids between the haplotypes. Demographic and geographical differences occur between the different genotypes. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* is known to be a risk for immunodeficient patients, in particular those infected with HIV. Estimates of UNAIDS/WHO show that in Africa, in particular sub-Saharan Africa, more than 28 million people are infected with HIV (www.who.int/hiv/data 2002), and in the S. African province of Gauteng, the incidence of cryptococcosis has been reported to be 3.117 per 100,000 HIV-infected people. *C. neoformans* var. *neoformans* seem to have a preference to infect Caucasian elderly (patients > 60 years of age), and those receiving corticosteroid therapy.

C. gattii, until recently considered to have a tropical or subtropical distribution is mainly involved in infections of immunocompetent humans. Since 1999 a major outbreak caused by *C. gattii* serotype B is responsible for infection of immunocompetent patients, and domestic and wild animals on Vancouver Island (Canada). The fungus could also be isolated from a number of temperate trees as well as air surrounding these trees. Detailed genotyping demonstrated the presence of two genotypes. As almost no genetic divergence was observed within the two genotypic lineages involved in the outbreak, it is assumed that the expansion of the population size is due to clonal propagation. The three other genotypes of *C. gattii* occur both in the environment (viz., trees) and are able to infect humans as well.

Here, we will discuss current views on the systematics of the complex, the clinical relevance of the various genotypes, and the application of comparative genome hybridization using microarrays in order to understand the complexity at the genomic level.

P35. *Cryptococcus neoformans* y animales de compañía

Gemma Castellá*, M^{re} Lourdes Abarca y F. Javier Cabañes

Grup de Micologia Veterinària. Dept. de Sanitat i d'Anatomia Animals. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona

La criptococosis es una micosis esporádica y poco frecuente en los animales domésticos. El agente etiológico más frecuentemente aislado es *Cryptococcus neoformans*, aunque también *Cryptococcus gattii* ha sido aislada de distintas especies animales. Este tipo de micosis ha sido citada en una gran variedad de animales domésticos como gatos, perros, caballos, cabras, ovejas o vacas, existiendo cierta variación en la prevalencia de estas infecciones según las condiciones climáticas y geográficas. Las aves se suponen resistentes a las infecciones debido a su elevada temperatura corporal que impediría el desarrollo de la levadura. No obstante se han descrito algunos casos en aves de compañía pertenecientes principalmente a la familia de las psitácidas.

A diferencia de otras micosis sistémicas, la criptococosis es más frecuente en el gato que en el perro y otras especies animales. Los gatos son especialmente susceptibles a la infección por *C. neoformans* y en menor proporción por *C. gattii*. Una infección previa por el virus de la leucemia felina o por el virus de la inmunodeficiencia felina es considerada por algunos autores como factor predisponente para el desarrollo de la micosis en los gatos. Entre otros factores destacarían las neoplasias, diabetes, cirugía y el tratamiento con esteroides. La vía más frecuente de infección es la inhalación, afectando inicialmente las vías respiratorias altas, principalmente la cavidad nasal, y pudiéndose diseminar desde el tracto respiratorio al SNC o a la piel vía hematogéna. La diseminación y el establecimiento de la infección dependen del estado inmunitario del animal.

Tanto perros como gatos pueden ser portadores asintomáticos de *C. neoformans*, localizándose esta levadura en la cavidad nasal, aunque no son considerados fuentes de infección para el hombre. La principal fuente de esta especie son las deyecciones de palomas. Se han descrito algunos

casos de posible zoonosis, en los que los aislamientos de *C. neoformans* de los pacientes y sus aves de compañía eran genéticamente iguales. Recientemente se ha citado, en estudios realizados a propósito del brote de criptococosis humana aparecido en la Isla de Vancouver (British Columbia, Canadá), que tanto gatos como perros con una infección asintomática o colonización nasal producida por *C. gatii* pueden eliminar la levadura, seguir con una infección subclínica o progresar hasta la aparición de la micosis, por lo que se ha especulado con el hecho de que podrían ser transmisores de estas levaduras al hombre.

P36. La paloma como portadora de *Cryptococcus* spp. con impacto en la salud pública

Begoña Acosta Hernández

Facultad de Veterinaria, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria

En las últimas décadas se ha producido un aumento llamativo de infecciones y enfermedades sistémicas causadas por hongos considerados generalmente como saprofitos. Estas infecciones ocurren en pacientes debilitados o con su sistema inmune comprometido. Los hongos causantes de dichas infecciones se denominan a menudo, "hongos oportunistas". Las infecciones fúngicas oportunistas más comunes son las causadas por especies de candidas y criptococos, especialmente *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* respectivamente, existiendo muy poca información de su incidencia en los diferentes grupos de riesgo (enfermos de SIDA, receptores de trasplantes o pacientes con cáncer) (Xu y cols., 2000 y Colom y cols., 2001).

Si bien la criptococosis es una enfermedad ampliamente distribuida por todo el mundo, esta no se encuentra incluida en las de declaración obligatoria. Su prevalencia entre los pacientes con SIDA varía en diferentes áreas del planeta, entre el 3-6% en Europa, 6-10% en USA y entre un 10-30% en algunos países tropicales, particularmente en África central (Gross y cols., 1997).

Desde el punto de vista epidemiológico es necesario tener presente las posibles implicaciones patógenas que otras especies de criptococos pueden tener para el hombre como: *C. albidus* y *C. uniguttulatus*. Estos microorganismos han sido considerados como saprofitos y no patógenos para el hombre, habiéndose aislado a partir de diverso material humano e incluso de la piel (Howard, 1973). No obstante, se han descrito casos de criptococosis pulmonar (Krumholz, 1972), criptococosis benignas atípicas (Wieser, 1973) e incluso meningitis (Da Cunha y Lusins, 1973) debidas todas ellas a *C. albidus*, lo cual obliga a considerar esta especie como potencialmente patógena.

También, *Cryptococcus laurentii* se ha relacionado como productor directo de enfermedad en aves, y más concretamente de un estornino bronceado verde, que exhibía pérdida de plumaje en la parte trasera y en el área del pico (Decostere y cols., 2003).

Canarias es una de las Comunidades Autónomas con mayor número de palomas mensajeras de España, representando aproximadamente el 60% de la colombofilia Española, razón por la cual creímos de gran interés realizar un estudio epidemiológico centrado en la paloma.

En él pudimos comprobar que la paloma y sus excretas actúan como reservorio de un total de 21 especies levaduriformes diferentes pertenecientes a 6 géneros distintos (*Cryptococcus*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* y *Prototheca*).

Además de *Cryptococcus neoformans* resultó ser la levadura que se aislaba con mayor frecuencia, no obstante comprobamos la presencia de otras especies de criptococos con impacto en la salud pública (*Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*).

Todas las cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas en nuestra Comunidad pertenecieron al serotipo A, con excepción de una que quedó encuadrada en el AD.

Sesión SEM 4

Regulación de la expresión génica

Moderador: Victoriano Garre. Universidad de Murcia. Murcia

P37. Silenciamiento génico mediado por RNA en hongos filamentosos

Rosa M. Ruiz Vázquez

Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia

El silenciamiento génico mediado por RNA es un complejo sistema de regulación que conduce a la supresión de la expresión génica mediante la degradación del RNAm diana, el bloqueo de su traducción o la inhibición de su transcripción. Inicialmente descrito como un mecanismo de defensa molecular contra virus, transposones y transgenes, en los últimos años se ha demostrado que también participa en diversas funciones biológicas, como la regulación de la expresión de genes endógenos y la formación de heterocromatina en distintos organismos eucarióticos. El silenciamiento génico mediado por RNA se ha convertido, además, en una herramienta fundamental en el estudio de la función de los genes, permitiendo el desarrollo de nuevas disciplinas como la genómica funcional. El mecanismo de silenciamiento génico se induce en respuesta a la producción, deliberada o fortuita, de moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA), que son procesadas mediante la acción de la RNasa III Dicer en pequeñas moléculas de 21 a 26 nucleótidos. Éstas se clasifican en dos tipos según su función: los pequeños RNAs interferentes (siRNAs), que actúan en la respuesta inmune impidiendo la expresión de ácidos nucleicos exógenos (genomas virales, transposones y transgenes) y los microRNAs (miRNAs), que actúan en vías de regulación endógenas. Los pequeños RNAs generados por Dicer son incorporados en los complejos RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA), donde proteínas de la familia Argonauta utilizan la cadena antisentido de estos RNAs como guía para identificar las secuencias complementarias en el RNAm diana, provocando su degradación o impidiendo su traducción.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la existencia de un mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes en el hongo *Mucor circinelloides*. La facilidad de manipulación de este organismo y algunas características específicas de su mecanismo de silenciamiento convierten a *M. circinelloides* en un organismo modelo para estudiar aspectos del silenciamiento génico aún sin explorar. Una de las características singulares del silenciamiento génico en este organismo es su inducción por transgenes no integrativos. La introducción en la estirpe silvestre de *M. circinelloides* de plásmidos autorreplicativos portadores de copias exógenas del gen *carB*, implicado en la síntesis de carotenos coloreados y utilizado como chivato del silenciamiento, conduce a la supresión de la expresión de *carB* por degradación de su RNAm. Los transformantes silenciados acumulan moléculas de siRNAs correspondientes a secuencias del gen *carB*. Se han identificado dos clases distintas de siRNA, de 21-nt y 25-nt, que se acumulan diferencialmente durante el crecimiento vegetativo de los transformantes silenciados, lo que constituye la característica más sobresaliente del silenciamiento génico en *M. circinelloides*. Con objeto de establecer si estos dos tipos de siRNAs son producidos por dos enzimas Dicer distintas, se han desarrollado estrategias para clonar el/los genes *dicer* de *M. circinelloides*. La clonación y caracterización de dos genes homólogos a *dicer*, así como la obtención de mutantes nulos para cada uno de ellos y el análisis de su fenotipo, ha permitido establecer que ambos genes actúan en rutas distintas y que, al contrario de lo que ocurre en *Neurospora crassa*, sus funciones no son redundantes. Sólo uno de ellos está implicado en el mecanismo de silenciamiento inducido por transgenes (ruta de los siRNAs) y es responsable de la producción de los dos tipos de siRNAs. El fenotipo de los mutantes afectados en el segundo gen *dicer* de *M. circinelloides* sugiere su participación en una presumible ruta de silenciamiento génico implicada en el control de procesos celulares endógenos, aún cuando hasta el momento no se ha descrito la existencia de miRNAs en hongos. Los datos disponibles, junto con el hecho de que la mayoría de los genes esenciales en los procesos de silenciamiento (*dicer*, *argonata*, *rdp*) están duplicados en muchos de los hongos filamentosos estudiados, incluido *M. circinelloides*, apunta a la posible existencia de dos rutas distintas de silenciamiento génico en estos organismos.

P38. Análisis genómico de la respuesta transcripcional a estrés osmótico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Markus Proft

Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Valencia, España

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* responde a estrés osmótico con la activación de la ruta de MAP quinasas HOG (High Osmolarity Glycerol). La MAP quinasa Hog1 se concentra rápidamente en el núcleo después del choque osmótico y activa un programa transcripcional que involucra la estimulación de la expresión de una gran cantidad de genes de defensa. La quinasa es reclutada a los promotores de genes osmoinducibles por varios factores de transcripción como Sko1, Msn2 y 4, Hot1. Este comportamiento particular nos permite analizar la localización global de Hog1 por la tecnología ChIP-Chip (inmunoprecipitación de la cromatina en combinación con microensayos). Nuestro análisis ChIP-Chip demuestra que la MAP quinasa es reclutada a la mayoría de los promotores inducibles por estrés osmótico *in vivo*. Además Hog1 interacciona con el complejo elongador de la RNA polimerasa II y viaja con el a través del ORF inducido. Por lo tanto caracterizamos la MAP quinasa Hog1 como un factor de elongación específico para la adaptación a estrés osmótico. También aplicamos la tecnología ChIP-Chip a todos los factores de transcripción involucrados en la respuesta a estrés osmótico (Msn1, Msn2, Msn4, Hot1, Sko1, Smp1 y otros) para determinar la organización genómica de la adaptación transcripcional a estrés.

P39. Señales durante el inicio de la relación hongo-planta en endomicorrizas

Natalia Requena*, Esther Serrano y Aurora Ocón

Institute of Applied Biosciences- Fungal-Plant Interactions Group,

University of Karlsruhe, Karlsruhe, Germany. e-mail:

natalia.requena@bio.uka.de

Las raíces de las plantas liberan moléculas que activan el hongo de la micorriza arbuscular e inician el proceso de reconocimiento entre ambos simbioses. En ausencia de dichas señales, el hongo no es capaz de crecer de manera indefinida ni de completar su ciclo de vida. En esos casos el protoplasma se retrae a la espora madre. En nuestro grupo hemos aislado una nueva proteína del hongo de la micorriza arbuscular, GIN1, fundamentalmente expresada en la fase de pre-simbiosis. La proteína es modular, conteniendo dos dominios diferentes. El dominio carboxy terminal es homólogo del dominio Hint, exclusivamente presente en las proteínas animales de la familia Hedgehog y es responsable del autoprosesamiento de dichas proteínas y su unión covalente a colesterol. La unión a colesterol determina la localización y el rango de acción de la proteína Hedgehog. Nosotros propusimos que GIN1 sería capaz de sufrir una modificación parecida y ser autoprosesado por la acción de un nucleófilo. En efecto, nuestros resultados mostraron que la adición de DTT era capaz de producir el procesamiento de GIN1 *in vitro*. Para averiguar que molécula era responsable del procesamiento de GIN1 *in vivo*, ensayos de *splicing* con colesterol y extractos lipídicos de esporas, micelio externo y raíces micorrizadas fueron llevados a cabo. De manera interesante, solo los extractos lipídicos de raíces micorrizadas fueron capaces de inducir *splicing*. Ensayos con isoflavonoides puros, mostraron que las agliconas de algunos de ellos eran capaces de forma específica de inducir *splicing*, mientras que sus formas glicosiladas no lo eran. El extremo N-terminal de GIN1 posee homología con una nueva familia de GTPasas llamada IAN (*immune associated nucleotide*), conservada evolutivamente en plantas y en animales. Esta familia ha sido relacionada con el control local de la respuesta a patógenos. En experimentos con GIN1-N *in vitro*, nosotros hemos encontrado que no posee actividad GTPásica sino ATPásica. Los experimentos de localización muestran que GIN1 se encuentra en la membrana plasmática. Nuestra hipótesis es que GIN1 sufre *splicing* en la membrana en respuesta a una molécula vegetal de naturaleza esteroides, quedando covalentemente unido a ella. Esta modificación junto con la actividad ATPásica intrínseca del dominio N-terminal permitiría a GIN1-N interactuar con otras proteínas y controlar el crecimiento del hongo para iniciar el pase a la fase simbiótica.

SESIÓN DE CLAUSURA

P40. Contribución de la AEM al desarrollo de la Micología en España

Josep M. Torres-Rodríguez

Unitat de Recerca en Malalties Infeccioses i Micologia. IMIM, Universitat Autònoma de Barcelona

La Asociación Española de Micología (AEM), fue fundada en la ciudad de Reus por el Dr. Jaume Borrell en 1977 con el nombre de Asociación Española de Especialistas en Micología, cubriendo un espacio científico y profesional inexistente hasta ese momento.

Como institución autónoma, pública, sin interés de lucro y destinada a la promoción y fomento de la enseñanza y desarrollo científico de la micología en España, agrupó desde el principio profesionales de los diferentes sectores de esta especialidad: veterinarios, biólogos, farmacéuticos, médicos y agrónomos.

Durante su funcionamiento, ha organizado o dado soporte a numerosos cursos generales y monográficos de micología en sus aspectos biológicos y médicos, y ha organizado un gran número de Jornadas, Reuniones y Congresos, el último de los cuales el que se celebra en Barcelona en el 2006.

En su objetivo de contribuir de forma decisiva al desarrollo de la micología en España, desde el principio la AEM promovió encuentros con otros micólogos españoles, y extranjeros. El paso en 1990 de "Reunión Conjunta" a Congreso Nacional fue posible por el acuerdo con el Grupo Especializado en Micología de la Sociedad Española de Microbiología, que siempre ha participado y organizado activamente estos encuentros científicos. No obstante, también el Grupo de Micología de la Sociedad Española de Dermatología y colegas portugueses han participado en Reuniones y actos científicos.

Como aportaciones destacadas de la AEM, cabe señalar la organización del X Congreso de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (de la que forma parte desde 1978) y del 6º Congreso de la Confederación Europea de Micología Médica (CEMM), ambos celebrados en Barcelona en 1988 y 2000 respectivamente.

Precisamente la AEM fue una de las sociedades europeas que dieron mayor soporte a la creación de la CEMM en la que el fallecido Prof. Edouard Drouhet fue su impulsor principal.

La AEM, es conocida universalmente por la fundación en 1984 de la Revista Ibérica de Micología, que desde 1990 pasó a llamarse Revista Iberoamericana de Micología (RIAM) como muestra del deseo de la AEM de que fuera más internacional y permitiera estrechar las relaciones científicas y humanas con los micólogos latinoamericanos. La RIAM, además de ser su órgano de prensa, también lo es hoy día de la Asociación Argentina de Micología y de la Asociación Venezolana de Micología, habiéndolo sido anteriormente también de la Sociedad Brasileira de Micología.

Desde el desierto inicial hasta el florecimiento actual de muchas áreas de la micología, apenas si han pasado 30 años, y en ellos muchas personas han dedicado horas y esfuerzos para lograr estos logros. El objetivo de esta presentación será el de repasar con mayor detalle los hechos principales en los que ha sido decisiva la participación de la AEM y de rendir homenaje a aquellos que lo han hecho posible.

COMUNICACIONES

A. Antifúngicos

A1. Therapeutic association between Amphotericin B and Fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* evaluated through experimental infection in mice

Eriques Gonçalves da Silva¹, Flávio César Viani¹, Francisco de Assis Baroni², Arlete Emily Cury³, Luciana da Silva Ruiz¹, Walderez Gambale¹ & Claudete Rodrigues Paula¹
¹Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, USP, São Paulo, Brazil; ²University Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Rio de Janeiro, Brazil; ³College of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, USP, São Paulo, Brazil

To evaluate the best association of the amphotericin B with fluconazole through the experimental cryptococcosis a total of 27 BALB/c mice were infected experimentally with pattern strain ATCC 90112 of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. After 24 hours of the infection each group was treated by a period of 10 days with Amphotericin B or Fluconazole or with the association Amphotericin B plus Fluconazole. The therapy with amphotericin B or fluconazole wasn't effective and it reduced the survival of the animals, while, with relationship to the fluconazole verified that the survival of the animals increased, but the same ones didn't survive in the period in study. In that study we can observe through our results that the association of the amphotericin B plus fluconazole was more effective and that the success of that combination depends on the concentration of the fluconazole.

A2. Interacciones in vitro entre micafungina y fluconazol frente a *Candida* spp.

M^a del Mar Rodríguez¹, Carolina Serena¹, F. Javier Pastor¹, Guillermo Quindós², Alfonso Carrillo³ y Josep Guarro¹
¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus; ²Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao; ³Departamento de Microbiología, Asesoría Científica y de Investigación Aplicada, Barcelona, España

Introducción: El riesgo de infecciones por *Candida albicans* y otras especies emergentes del género ha incrementado en los últimos tiempos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. El tratamiento más comúnmente utilizado para este tipo de infecciones ha sido el fluconazol (FLC), pero el incremento de cepas resistentes a este antifúngico es un problema importante. La terapia combinada puede ser útil en casos donde la monoterapia es inefectiva. Por ello hemos evaluado la actividad in vitro de las combinaciones entre micafungina (MFG) y FLC frente a siete especies de *Candida*.

Materiales y métodos: Se ensayaron 105 cepas de origen clínico, 15 de *C. albicans*, 15 de *C. glabrata*, 15 de *C. tropicalis*, 10 de *C. lusitanae*, 20 de *C. dubliniensis*, 10 de *C. parapsilosis* y 20 de *C. krusei*. Las combinaciones de antifúngicos fueron estudiadas utilizando la técnica del tablero de ajedrez y siguiendo el método de microdilución del CLSI para levaduras (M27-A2). Los resultados fueron interpretados como sinergismo si el índice de concentración inhibitoria fraccionada (FICI) era menor que, indiferente si era >0.5 y <4.0 y antagonismo si era >4.0.

Resultados: La combinación ensayada mostró el mayor porcentaje de interacciones sinérgicas para *C. albicans* (78%), seguida de *C. tropicalis* (14%) y *C. glabrata* (7%). Para las demás especies no se observó ninguna interacción sinérgica. En ningún caso hubo antagonismo.

Conclusiones: La combinación entre MFG y FLC ha mostrado los mejores resultados para *C. albicans*, obteniendo para el resto de las especies estudiadas un porcentaje muy elevado de indiferencia.

A3. Interacciones in vitro entre micafungina e itraconazol frente a cepas clínicas de *Candida* spp.

Marçal Mariné¹, F. Javier Pastor¹, Guillermo Quindós², Alfonso Carrillo³ y Josep Guarro¹
¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus; ²Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao; ³Departamento de Microbiología, Asesoría Científica y de Investigación Aplicada, Barcelona, España

Introducción: Diferentes especies de *Candida* causan infecciones graves con elevada mortalidad en el paciente inmunocomprometido. Los tratamientos estándar hasta hace poco habían sido la anfotericina B y el itraconazol, aunque algunas especies suelen presentar una sensibilidad reducida o incluso resistencia a estos antifúngicos. Para el itraconazol (ITC), aunque no es un compuesto nuevo, existen nuevas formulaciones que permiten ampliar su campo de acción. Es de interés poder conocer las posibles interacciones de dicho fármaco con otros antifúngicos, como las equinocandinas, para poder ensayar también terapias combinadas. En el presente estudio hemos ensayado la actividad in vitro del ITC en combinación con la micafungina (MFG) frente a diferentes especies de *Candida* de interés clínico.

Materiales y métodos: Se ensayaron 110 cepas de origen clínico, 25 de *C. albicans*, 25 de *C. parapsilosis*, 20 de *C. krusei*, 20 de *C. dubliniensis*, 10 de *C. tropicalis* y 10 de *C. lusitanae*. Las combinaciones de antifúngicos fueron estudiadas utilizando la técnica del tablero de ajedrez y siguiendo el método de microdilución del CLSI para levaduras (M27-A2). La interacción fue considerada como sinérgica si el índice de concentración inhibitoria fraccionada (FICI) era < 0.5, indiferente si era >0.5 y <4.0 y antagonista si era >4.0.

Resultados: La combinación de MFG + ITC mostró el mayor porcentaje de interacciones sinérgicas para *C. albicans* (44% de las cepas), seguida de *C. lusitanae* (20%), *C. krusei* (15%) y *C. parapsilosis* (12%). No se observó ninguna interacción sinérgica frente a *C. tropicalis* ni frente a *C. dubliniensis*. En ningún caso se pudo apreciar antagonismo.

Conclusiones: Aunque sólo se ha observado un porcentaje elevado de sinergismos frente a *C. albicans* cabe destacar la ausencia de interacciones adversas frente al resto de especies. La combinación ensayada parece prometedora para el desarrollo de nuevos tratamientos. Consideramos interesante realizar ensayos en modelos animales para evaluar la posible eficacia de esta combinación.

A4. Eficacia del voriconazol en un modelo animal de meningitis criptocócica

Carolina Serena, M^a del Mar Rodríguez, Marçal Mariné, F. Javier Pastor, y Josep Guarro
¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus

Introducción: La criptococosis es una importante causa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, siendo en muchos casos de difícil resolución. La terapia de elección es la anfotericina B (ANB) sola o combinada con flucitosina durante dos semanas seguida de fluconazol a dosis altas durante un mínimo de dos meses. La mortalidad y la morbilidad es elevada aun con dicho tratamiento y por ello son necesarias nuevas alternativas terapéuticas. El voriconazol (VRC) ha demostrado buena actividad in vitro frente a *C. neoformans*, penetra bien en el tejido cerebral alcanzándose buenos niveles de en el LCR y ha sido eficaz en varios ensayos clínicos. En el presente estudio se ha evaluado la eficacia de VRC en un modelo de ratones inmunocompetentes infectados con *C. neoformans*.

Materiales y métodos: Se han utilizado ratones machos OF-1 de 12 a 14 g. Los ratones fueron anestesiados con flutano e infectados intracranalmente con aproximadamente 750 UFC de la cepa FMR 8393 de *C. neoformans*. Los ratones fueron tratados con 1.5 mg/kg/día de ANB administrados por vía intraperitoneal y con dosis de 10, 20 y 60 mg/kg/día de VRC administrados por vía oral. Todos los tratamientos empezaron 24 horas después de la infección y se prolongaron durante 10 días. Los animales fueron examinados diariamente durante 30 días. El tiempo medio de supervivencia fue estimado por el método de Kaplan-Meier. Para el estudio de recuperación fúngica en órganos, un día después de finalizar el tratamiento, se sacrificaron cinco animales de cada grupo y se les extrajo aseptícamente el cerebro y el pulmón, que fueron homogenizados y sembrados en placas de agar Sabouraud. Se calculó el número de UFC/g de tejido.

Resultados: La supervivencia fue del 100% en los animales tratados con 60 mg/kg/día de VRC; del 90% en los animales tratados con ANB; y del 40% en los animales tratados con 10 y 40 mg/kg/día de VRC. Todos los tratamientos prolongaron significativamente la supervivencia media respecto al grupo control. La dosis más alta de VRC y la ANB redujeron significativamente los recuentos fúngicos en ambos órganos con respecto al grupo control. Sólo la dosis de 60 mg/kg/día de VRC consiguió esterilizar el cerebro y el pulmón en la mayoría de los animales estudiados.

Conclusiones: Los resultados sugieren que VRC podría tener un papel importante en el tratamiento de la meningitis criptocócica.

A5. Actividad *in vitro* de BAL 4815 (un nuevo azol) frente a diferentes especies de hongos filamentosos

Martín de la Escalera C.¹, Aller A.I.¹, López-Oviedo E.¹, Martos A.I.¹, Romero A.¹, Castro C.¹, Cantón E.², Pemán J.², Carcía Martos P.³, Martín-Mazuelos E.¹

¹Servicio de Microbiología. H:U. de Valme. Sevilla; ²Hospital La Fe. Valencia, y ³Hospital Puerta del Mar, Cádiz

Objetivos: Estudiar la actividad "in vitro" de BAL 4815 (Basilea Farmacéutica Ltd), un nuevo antifúngico, frente a diferentes hongos filamentosos. BAL 4815 es el componente activo de BAL 8557 (prodroga hidrosoluble) del grupo de los azoles.

Método: Estudiamos 55 aislamientos clínicos: 20 Dematiaceos (7 *Scedosporium apioespermum*, 5 *Scedosporium prolificans*, 2 *Rhinochloidiella*, 1 *Hortae werneckii*, 1 *Phialophora* spp, 1 *Stachybotrys* spp, 1 *Curvularia* spp, 1 *Bipolaris* sp y 1 *Phoma*); 19 Hifomicetos hialinos (11 *Fusarium* spp, 2 *Scopulariopsis* spp, 2 *Acremonium* spp, 1 *Trichoderma* spp, 1 *Verticillium* spp, 1 *Paecilomyces* y 1 *Artographis*); 16 Zigomicetos (7 *Mucor* spp 6 *Rhizopus*, 1 *Absidia*, 1 *Syncephalastrum* spp y 1 *Cunninghamella bertholletiae*). Usamos la microdilución en caldo según las normas de la CLSI M-38-A. BAL 4815 se disolvió en Dimetilsulfóxido (DMSO), los rangos fueron 0.015-8 µg/ml. El inóculo se preparó tras cultivo de 5-7 días en agar dextrosa patata (Difco). El tamaño del inóculo fue de 0.5 x 10⁴ a 5x 10⁴ UFC/ml. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó visualmente como la menor concentración de antifúngico que inhibió el 80% del crecimiento tras 48 h. de incubación a 37 °C. La concentración mínima fungicida (CMF) se determinó para los aislamientos con CMI menor de 8 µg/ml, se tomó 100 µl de los pocillo sin crecimiento visible y se inocularon en placas de Saboraud dextrosa agar (SAB) (Oxoid, Basingstoke, UK) se incubaron 48 h. a 37 °C la CMF se definió como la menor concentración de antifúngico que permitió el crecimiento \approx 50 colonias. Control de calidad fueron: *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *A. flavus* ATCC 204304 and *A. fumigatus* ATCC 204305.

Resultados:

Hongos filamentosos (55)	Rango (µg/ml)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)
Dematiaceos (20)		0.5	8
- <i>S.apioespermum</i> (7)	0.06-4	-	-
- <i>S.prolificans</i> (5)	0.5->8	-	-
- Otros (8)	0.03-4	-	-
Hifomicetos hialinos (19)		1	8
- <i>Fusarium</i> (11)	0.125->8	-	-
- Otros (8)	0.06->8	-	-
Zigomicetos (16)		2	4
- <i>Mucor</i> (7)	0.5-4	-	-
- <i>Rhizopus</i> (6)	1-4	-	-
- Otros (3)	0.5->8	-	-

Las CMI fueron leídas a las 48h. excepto los Mucorales que fueron leídas a las 24h. debido al sobrecrecimiento a las 48 h.

Las CMF fueron \pm 1 dilución que las CMI, este nuevo antifúngico es considerado fungicida frente a los hongos filamentosos estudiados.

Conclusiones:

- BAL mostró mayor actividad sobre los Zigomicetos que sobre Hifomicetos y Dematiaceos
- De los Zigomicetos BAL mostró una actividad semejante con *Mucor* y *Rhizopus*.
- De los Dematiaceos tuvo mayor actividad con *S. apioespermum*
- Son necesarios estudios con mayor número de cepas que correlacionen la actividad *in vitro* *in vivo* de este nuevo antifúngico para determinar su utilidad clínica.

A6. Estudio de sensibilidad *in vitro* a posaconazol de hongos filamentosos no *Aspergillus* mediante microdilución (M 38-A)

E. López-Oviedo¹, C. Martín de la Escalera¹, A. I. Aller¹, C. Castro¹, A. I. Martos¹, A. Romero¹, J. Pemán², P. García-Martos³, E. Martín-Mazuelos¹

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

Objetivos: Posaconazol es un nuevo triazol de estructura similar a itraconazol que posee actividad fungicida sobre levaduras y hongos filamentosos. El propósito de este estudio fue evaluar la sensibilidad *in vitro* a posaconazol de hongos filamentosos no *Aspergillus* mediante el método de microdilución CLSI M38-A (MD).

Material y métodos: Hemos estudiado 44 cepas de hongos filamentosos no *Aspergillus* de diferentes muestras clínicas. Estas cepas fueron: 16 Dematiaceos [11 *Scedosporium* spp (7 *S. apioespermum*, 4 *S. prolificans*), 2 *Rhinochloidiella* spp, 1 *Curvularia* spp, 1 *Hortae werneckii*,

1 *Bipolaris* spp, 1 *Phialophora* spp y 1 *Phoma* spp], 14 Zigomicetos (7 *Rhizopus* spp, 5 *Mucor* spp, 1 *Cunninghamella bertholletiae* y 1 *Absidia*) y 14 Hifomicetos Hialinos (7 *Fusarium* spp, 2 *Acremonium* spp, 1 *Scopulariopsis* spp, 1 *Trichoderma* spp, 1 *Paecilomyces* spp, 1 *Verticillium* spp y 1 *Artographis* spp). Como control de calidad se emplearon las cepas *Candida krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* 22019. El método de MD se realizó siguiendo las directrices del documento M 38-A del CLSI con un rango de concentración desde 0,015µg/ml a 8 µg/ml. La lectura se realizó tras 48 horas de incubación a 35 °C, considerando la CMI como la menor concentración de antifúngico capaz de inhibir 100% de crecimiento. Los resultados se expresaron en Rango, CMI₅₀ y CMI₉₀ (µg/ml).

Resultados: Tabla: Rango, CMI₅₀ y CMI₉₀ de las cepas estudiadas

	RANGO (µg/ml)	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)
DEMATIACEOS (16)	\approx 0,015->8	1	1
<i>S. apioespermum</i> (7)	0,03-2	-	-
<i>S. prolificans</i> (4)	>8	-	-
Otros dematiaceos (5)	\approx 0,015-0,5	-	-
ZIGOMICETOS (14)	0,03-2	0,25	0,5
HIFOMICETOS HIALINOS (14)	0,03->8	>8	>8
<i>Fusarium</i> spp (7)	0,125-8	-	-
Otros hialinos (7)	0,03	-	-

Conclusiones:

- 1) Las cepas con menor CMI (\approx 2 µg/ml) a posaconazol fueron las de los Zigomicetos y Dematiaceos (excepto *S. prolificans*).
- 2) Las cepas con CMI altas a posaconazol fueron las del grupo de Hifomicetos Hialinos y *S. prolificans*.
- 3) El género *Scedosporium* mostró diferente sensibilidad *in vitro* dependiendo de la especie, obteniendo CMIs altas *S. prolificans* y CMIs bajas *S. apioespermum*.
- 4) Son necesarios más estudios con mayor número de cepas y datos de correlación *in vivo*.

A7. Patrón de expresión genómica en respuesta a la acción del anticuerpo monoclonal C7 en *Candida albicans*

Sonia Brena¹, M^a Dolores Moragues², M^a Jesús Sevilla³, Ángel Domínguez⁴, José Pontón¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao;

²Departamento de Enfermería I, Universidad del País Vasco, Bilbao;

³Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco, Bilbao;

⁴Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

Se estudió la actividad del anticuerpo monoclonal (AMc) C7 frente a *C. albicans* mediante el análisis por microarrays y real-time RT-PCR. Se analizó la expresión de un cultivo de células de *C. albicans* tratadas con el AMc C7 a una concentración de 12,5 µg/ml, lo que produjo una inhibición del crecimiento del 93% en comparación con un cultivo control y se realizó el análisis por microarrays. Como resultado, se observó que 52 genes se expresaron diferencialmente, de los cuales 30 se sobre-expresaban y 22 se subexpresaban. A partir de alícuotas procedentes del pool de RNA utilizado en los experimentos de microarrays, se analizó mediante real-time RT-PCR la expresión de 9 genes seleccionados por su implicación en el metabolismo del hierro y el metabolismo energético, mostrando en general una buena correlación con los datos obtenidos previamente en los experimentos de microarrays. Con el objetivo de estudiar si el AMc C7 podría ejercer su acción de manera similar a la del antifúngico ciclopirox olamina, se analizó la actividad candidicida en presencia de hierro III. A diferencia de lo que ocurre con el ciclopirox olamina, la actividad candidicida del AMc C7 no se ve contrarrestada de manera significativa por la adición de un exceso de hierro, lo que indicaría que el AMc C7 no actúa como un quelante de iones impidiendo a la célula su normal actividad, o bien que su efecto sobre las células de *C. albicans* no es reversible.

Conclusiones: Los datos obtenidos sugieren que el principal modo de acción del AMc C7 sobre *C. albicans* es la inhibición de los procesos que permiten al hongo la captación de hierro. Asimismo, se observa que dicho proceso es independiente de la concentración de hierro del medio, lo que diferencia su modo de acción del descrito para el antifúngico ciclopirox olamina.

A8. Estudio de sensibilidad a los antifúngicos de posibles nuevas especies filogenéticas de *Fusarium solani* species complex

Mónica Azor, Mery Ruiz, Josep Cano, Josepa Gené y Josep Guarro¹
¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

Fusarium solani es ampliamente conocido por su importancia como agente fitopatógeno pero también por su capacidad para producir infecciones invasivas en el hombre, especialmente en pacientes neutropénicos. Estudios moleculares recientes han demostrado que bajo el nombre de *F. solani* se incluye un elevado número de especies filogenéticas. Se desconoce si estas especies presentan diferentes características patológicas y diferente respuesta al tratamiento antifúngico.

Hemos realizado un estudio filogenético basado en el análisis de las secuencias del gen del factor de elongación (EF-1 α) de 52 cepas identificadas morfológicamente como *F. solani*, de origen mayoritariamente clínico y procedentes de diferentes zonas geográficas. El análisis de las secuencias permitió establecer diferentes grupos filogenéticos con un elevado soporte estadístico. Se estudió la sensibilidad *in vitro* de 27 cepas representativas de los principales grupos obtenidos frente a 11 antifúngicos utilizando el método de microdilución. Aunque la anfotericina B y el voriconazol fueron los más activos, las cepas estudiadas mostraron en general resistencia a todos los antifúngicos, sin diferencias significativas entre los grupos filogenéticos.

Dada la elevada resistencia observada en los estudios *in vitro*, se ensayaron combinaciones de dos (micafungina/anfotericina B, voriconazol/anfotericina B y micafungina/voriconazol) y de tres antifúngicos (micafungina/anfotericina B/ voriconazol) en un modelo de infección diseminada en ratones para determinar si estas combinaciones presentaban actividad.

A9. Acción de la Proteína Antifúngica (AFP) de *Aspergillus giganteus* en *Fusarium oxysporum*

Magdalena Martín Urdiroz¹, Ana Lilia Martínez Rocha¹,
Álvaro Martínez del Pozo² Antonio Di Pietro¹ y M. Isabel G. Roncero¹
¹Dpto. Genética, Campus Rabanales, Edif., Gregor Mendel (C-5),
Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ²Dpto. Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid

La proteína antifúngica AFP, secretada por *Aspergillus giganteus* junto a la α -sarcina (proteína citotóxica perteneciente a las ribotoxinas), es un polipéptido altamente básico de 51 aminoácidos con un alto contenido en residuos de cisteína, tirosina y lisina. Las proteínas antifúngicas, similares –en estructura, tamaño y puentes disulfuro– a las proteínas antimicrobianas denominadas defensinas, son capaces de interaccionar con los fosfolípidos aniónicos de las membranas bacterianas. Por ello, se cree que la actividad de la AFP reside en su habilidad de interaccionar con los fosfolípidos aniónicos, permeabilizar la membrana plasmática y, posteriormente, penetrar en la célula y unirse a los ácidos nucleicos. La Proteína Antifúngica secretada por *A. giganteus* inhibe el crecimiento de muchos hongos filamentosos, entre ellos *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp., pero no a bacterias, levaduras y células de mamíferos. Este rango de susceptibilidad restringido la hace buena candidata como un potente agente antifúngico contra patógenos de humanos y plantas.

En *Fusarium oxysporum* hemos examinado la acción de la Proteína Antifúngica, de *A. giganteus*, en la estirpe silvestre y en mutantes deficientes en distintos procesos biológicos, Δfmk , $\Delta pacC$, Δgas , $\Delta chsV$ y $\Delta chs7$, bien caracterizados genética, fisiológica y patotípicamente en nuestro laboratorio. Estos mutantes fueron obtenidos previamente por anulación dirigida de genes responsables, respectivamente, de una MAP kinasa que interviene en una ruta de transducción de señales implicada en patogénesis, del factor de transcripción PacC que regula la transcripción de genes dependientes de pH, de una β -1,3 glucanosil transferasa, de una sintasa de quitina que interviene en la formación y síntesis de diferentes componentes estructurales de la pared celular fúngica, y de una chaperona de sintasas de quitina. Los resultados obtenidos muestran que las estirpes estudiadas presentan grados de sensibilidad y resistencia a la AFP muy distintos entre sí y en comparación con la estirpe silvestre. Los mutantes Δfmk , $\Delta pacC$, Δgas , $\Delta chsV$ y $\Delta chs7$ y la estirpe silvestre crecidas en presencia de AFP (4 μ g/ml) presentaron un 1%, 68.7%, 85%, 2.2%, 100% y 20.4% de crecimiento, respectivamente. Por otro lado se ha determinado que, la actividad antifúngica que ejerce la AFP en todas las estirpes disminuye en presencia de Ca²⁺. Para esclarecer la base de este fenómeno, se ha analizado la unión de la Proteína Antifúngica a las paredes de las distintas estirpes, mediante análisis de hibridación western. Este análisis ha mostrado que la AFP tiene mayor afinidad hacia la pared de los mutantes con fenotipo resistente ($\Delta pacC$, Δgas y $\Delta chs7$), mientras que su afinidad es menor en los mutantes defectivos con fenotipo sensible. Los resultados de esta interacción y la posibilidad de disponer de estirpes del hongo afectadas en procesos conocidos, nos permitiría dilucidar la diana celular y el mecanismo de acción de la AFP en *F. oxysporum* y posiblemente en otras especies relacionadas.

A10. Perspectiva para un nuevo antifúngico...?

Martha G. Medvedeff¹, María Celina Vedoya¹, María Antonia Lloret²,
Mirna Alicia Espinola³, Leon Herszage³
¹Departamento Microbiología, Cátedra Micología, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Misiones; ²Departamento de Farmacia Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Misiones; ³Profesor Auxiliar Extraordinario, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

En las últimas décadas es una realidad el avance observado en los distintos aspectos que abarca la Micología. Quizás uno de los más notorios sea la búsqueda de nuevos antifúngicos eficaces, seguros y económicos. Por lo tanto, desde el punto de vista microbiológico es factible desde el laboratorio, el ensayo de mezclas con característica fungicida en base a solución saturada de sacarosa (SSS), la respuesta de la misma con el agregado de eugenol (E), y de polietilenglicol 400. A cada una de las mezclas ensayadas *in vitro*, se midió la actividad agua (a_w).

La bioactividad se evaluó con cepas productoras de micosis cutáneas, subcutáneas y profundas. Las especies ensayadas fueron: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Cladosporium carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Exophiala jeanselmei*, *Wangiella dermatitidis*, *Fusarium solani*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*.

Frente a SSS (a_w: 0,86 \pm 0,02), el rango de tiempo de muerte de los hongos levaduriformes osciló entre 32 a 53 días; entre 6 y 9 días para hongos dermatofitos; entre 2 y 6 días para hongos hialinos y dematiáceos productores de micosis subcutáneas; y entre 2 y 4 días para hongos dimórficos.

Con la incorporación de eugenol a la SSS (a_w: 0,76 \pm 0,02), el rango de tiempo de muerte de los hongos levaduriformes osciló entre 1 a 9 días, entre 26 y 46 minutos para hongos dermatofitos, entre 3 y 10 minutos para hongos hialinos y dematiáceos productores de micosis subcutáneas y entre 3 y 10 minutos para hongos dimórficos.

A la emulsión anterior se incorporó polietilenglicol 400 (a_w: 0,73 \pm 0,02), el rango de tiempo de muerte de los hongos levaduriformes osciló entre 297 a 1262 segundos, entre 42 y 276 segundos para hongos dermatofitos, entre 51 y 88 segundos para hongos hialinos y dematiáceos productores de micosis subcutáneas y entre 30 y 142 segundos para hongos dimórficos. Se observó una disminución progresiva del promedio de muerte de los diferentes grupos de hongos evaluados en las tres soluciones planteadas, el sinergismo que se produce ante la incorporación de cada uno de los componentes y el descenso paralelo de la actividad agua. Eso permite demostrar que la mezcla presenta acción fungistática/fungicida *in vitro*. Este estudio preliminar, se constituye en guía para continuar la evaluación de este fitoterápico en pos de alentar la formulación de un nuevo antifúngico.

A11. Susceptibilidad a cinco agentes antifúngicos de especies de *Candida* en pacientes transplantados

Ana Fernández-Olmos, María Mercadillo, Auxiliadora Molina,
M^a Elena Álvarez, Aurora Sánchez- Sousa, Fernando Baquero
¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal,
Madrid, España

Las infecciones fúngicas que afectan a pacientes transplantados permanecen como una amenaza para el resultado de este procedimiento. Estudiamos la susceptibilidad de cepas de *Candida* aisladas en pacientes transplantados frente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol y caspofungina. Se aislaron un total de 148 cepas de 62 pacientes transplantados: 26 de hígado (Th), 18 de pulmón (Tp), 11 de medula ósea (Tm), 5 de riñón (Tr) y 2 de intestino (Ti). Las especies aisladas fueron distintas según el tipo de trasplante. *C. albicans* fue más frecuente en Tm (85%), Tr (71%), Tp (69%), Th (67%); seguida por *C. glabrata* con Th (29%), Tm (24%), Tp (12%) y Tr (10%) y *C. parapsilosis* en Tr (15%), Th(10%), Tp (8%). Se detectó gran incidencia de *C. albicans* en muestras respiratorias, de *C. glabrata* en muestras urogenitales y de *C. parapsilosis* en muestras urogenitales y de lugares originariamente estériles. La susceptibilidad se determinó empleando el método de referencia de microdilución CLSI (documento M27-A). Para anfotericina B (100 % inhibición) la CMI modal fue 0,12 mcg/ml tanto para no-*albicans* y *C. albicans* (2,97% de CMI 0,5 mcg/ml). El valor CMI modal de fluconazol para *C. albicans* fue 0,25 mcg/ml para ambos valores de inhibición (v.i.) 50-80%, y 1 y >64 mcg/ml para no-*albicans*. 2,0% y 4,9% de *C. albicans* mostraron CMI's mayores de 4 mcg/ml a v.i.50-80%, respectivamente; siendo 29,8% y 48,9% para no-*albicans*. En el itraconazol la CMI modal fue 0,03 mcg/ml para *C. albicans* y no-*albicans* en v.i.50-80%. 2,9% y 10,9 % de *C. albicans* y 11,0 y 12,7 de no-*albicans* tuvieron CMI's por encima de 0,25 a v.i.50-80%. Para el voriconazol la CMI modal fue 0,03 mcg/ml para todas las especies de *Candida* para v.i.50-80%. 1,9% y 4,9 % de *C. albicans* y 0% y 4,2% de no-*albicans* presentaron CMI's superiores a 0,25 en v.i.50-80%. La CMI modal de cas-

profungina obtenida para *C. albicans* varía según los v.i.: 0,12 mcg/ml para 50%, 0,25 para 80% y 0,25-0,5 para 100%; para no-*albicans* la CMI modal fue en todos los casos 1 mcg/ml. 0%, 1,0% y 3,9 % de *C. albicans* ofrecieron CMIs >4 mcg/ml en v.i.50-80-100%. 2,1%, 4,2% y 4,2% de no-*albicans* mostraron CMIs para caspofungina >4 mcg/ml. En conclusión, no encontramos diferencia de los valores de susceptibilidad de *Candida* en pacientes transplantados o no transplantados. Los cambios en la proporción de cepas resistentes por encima de los valores modales se pueden utilizar para estimar la evolución de las resistencias. El análisis de las CMIs obtenidas para diferentes valores de inhibición nos indican la homogeneidad o heterogeneidad de la población fúngica respecto a su susceptibilidad a los antifúngicos, siendo anfotericina B un ejemplo de homogeneidad y caspofungina (en *C. albicans*) de respuesta heterogénea.

A12. Actividad *in vitro* de posaconazol sobre levaduras determinada por dos métodos

Emilia Cantón¹, Javier Pemán¹, Amparo Valentín², María Bosch², Miguel Gobernado²

¹Microbiología Experimental, Centro de Investigación H.U. La Fe, Valencia; ²Servicio de Microbiología, H.U. La Fe, Valencia

Introducción: El posaconazol es un nuevo triazol con un amplio espectro de actividad sobre levaduras y hongos filamentosos, incluidos los zigomicetos. El método de microdilución, estandarizado por el CLSI (documento M27-A2), para determinar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos, es muy laborioso para incluirlo en la rutina diaria de un laboratorio clínico. Sin embargo, el método de difusión en disco (M44-A), estandarizado para fluconazol y voriconazol, ofrece mayor facilidad.

Objetivo: Determinar la sensibilidad de las levaduras a posaconazol por los métodos de microdilución y difusión en disco.

Material y métodos: Se incluyeron en el estudio un total de 120 aislados de *Candida* spp.; 107 de hemocultivo (34 *C. albicans*, 24 *C. parapsilosis*, 15 *C. guilliermondii*, 13 *C. glabrata*, 11 *C. krusei*, 4 *C. tropicalis*, 2 *C. lusitaniae* y un aislado de *C. rugosa*, *C. lipolytica*, *C. kefyr* y *C. famata*), 7 aislados con sensibilidad disminuida a las equinocandinas y 7 aislados de referencia (ATCC) entre las que se incluyen cepas documentadas como resistentes a la anfotericina B y/o a los azoles. La actividad del posaconazol se determinó por dos métodos: microdilución en caldo (RPMI 1640) siguiendo las indicaciones del CLSI (documento M27-A2) y por difusión en disco (documento M44-A). La carga del disco de posaconazol fue de 5 µg/mL. La CMI se evaluó a las 24 y 48 horas de incubación. La CMI se consideró la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$. En todos los ensayos se incluyeron las cepas control de calidad ATCC 6258 y ATCC 22019. Los dos métodos se realizaron en paralelo.

Resultados: El posaconazol fue muy activo sobre todas las cepas ensayadas, incluidos los aislados con resistencia conocida a la anfotericina B y con sensibilidad disminuida a las equinocandinas. Con 0,03 µg/mL se inhibieron el 70% de los aislados y con ≈ 1 µg/mL el 95,86% de los mismos. La CMI de posaconazol pasó de ser $\approx 0,12$ µg/mL a las 24 horas a >16 µg/mL a las 48 horas en tres aislados (2 *C. albicans* y 1 *C. guilliermondii*). Los diámetros para estas cepas fueron 29,2, 25 y 24 mm, respectivamente. La cepa *C. tropicalis* ATCC 200956, resistente a los azoles, también fue resistente al posaconazol (CMI >16 µg/mL) y no produjo halo de inhibición. Las CMI para los dos aislados de *C. guilliermondii* resistentes a fluconazol fueron 1 y 0,5 µg/mL. El coeficiente de correlación R entre los resultados obtenidos por microdilución y por difusión fue 0,63.

Conclusiones: El posaconazol es muy activo sobre las levaduras ensayadas, incluyendo los aislados resistentes a fluconazol. No tiene resistencia cruzada con la anfotericina B ni con las equinocandinas. Los resultados obtenidos indican que el método de difusión puede utilizarse en la práctica diaria para ensayar el posaconazol, es más rápido y económico y detectó la única cepa resistente a posaconazol ensayada.

A13. Influencia del estado de agregación de la anfotericina B sobre su eficacia en un modelo murino de candidiasis sistémica

Raquel Espada¹, Suriñe Valdespina¹, Gloria Molero², M^ª Auxiliadora Dea³, Paloma Ballesteros¹, Juan José Torrado¹

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid; ²Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid; ³Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España

La anfotericina B (AMB) continúa siendo el fármaco de elección para el tratamiento de una gran variedad de infecciones fúngicas. La formulación convencional de AMB-desoxicolato (Fungizona®) da lugar a efectos adversos, siendo el más importante la nefrotoxicidad. En los últimos años se han desarrollado nuevas formulaciones lipídicas de AMB menos tóxicas que la Fungizona®, pero aún no está claro si son más eficaces que la Fungizona® en cualquier micosis.

Este trabajo tiene como objetivo determinar la eficacia terapéutica de la AMB en el tratamiento de la candidiasis sistémica en función del estado de agregación (poliagregado o dimerico) en el que se encuentre en la formulación y de la forma en la que se encuentre en la formulación (libre o microencapsulada). Para ello, se han realizado ensayos *in vivo* en ratones comparando la administración de tres formulaciones:

- Formulación con dímeros libres de AMB (símil de Fungizona®).
- Formulación con poliagregados libres de AMB.
- Formulación con poliagregados de AMB microencapsulados; se trata de microesferas de albúmina elaboradas mediante un proceso de atomización (1).

Para llevar a cabo este estudio se han inyectado ratones ICR (hembras) con *Candida albicans*. Los animales desarrollaron una infección sistémica letal en 10 días. Se ha realizado un estudio unidosis y un estudio multidosis; en ambos casos, las diferentes formulaciones de anfotericina B se administraron 72 horas después de la inoculación de *C. albicans*. Se han encontrado grandes diferencias en la eficacia de la anfotericina B, evaluada como porcentaje medio de supervivencia al final del ensayo, en función del estado de agregación de la anfotericina B en la formulación administrada. Así, se ha comprobado que, a igual dosis, el estado dimerico de la AMB es más eficaz que el estado poliagregado, y no se han observado diferencias significativas en la eficacia de la AMB poliagregada libre y microencapsulada. En cambio, la AMB poliagregada es menos tóxica puesto que con ella ha sido posible administrar dosis mucho más elevadas que con la AMB dimerica. La toxicidad de las formulaciones de AMB también se ha estudiado mediante la evaluación del estado de los órganos de los ratones; al final del estudio multidosis se observó que en la mayoría de los ratones tratados con el símil de Fungizona® había desaparecido uno de los riñones y, sin embargo, los ratones tratados con la formulación poliagregada libre conservaban los dos riñones.

Referencia:

Sánchez-Brunete, J.A. et al., Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(9): 3246-3252.

A14. Evaluación de dos métodos para determinar la actividad de anidulafungina

Emilia Cantón¹, Javier Pemán¹, Amparo Valentín², María Bosch², Miguel Gobernado²

¹Microbiología Experimental, Centro de Investigación y ²Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Fe, Valencia

Introducción: La anidulafungina es un derivado semisintético del núcleo de la equinocandina B. Es un antifúngico inhibidor no competitivo de la beta-1, 3 glucano sintetasa con un amplio espectro de acción incluyendo los aislados resistentes a fluconazol y anfotericina B. El documento M44-A del CLSI para determinar la sensibilidad a los antifúngicos por difusión en disco no está estandarizado para equinocandinas.

Objetivo: Determinar la actividad de anidulafungina y evaluar el método de difusión en disco.

Material y métodos: Se incluyeron en el estudio un total de 171 aislados (43 *C. albicans*, 24 *C. parapsilosis*, 26 *C. guilliermondii*, 20 *C. glabrata*, 18 *C. krusei*, 21 *C. tropicalis*, 7 *C. lusitaniae*, 6 *C. famata*, 2 *C. lipolytica* y un aislado de *C. inconspicua*, *C. lambrica*, *C. kefyr* y *C. rugosa*), entre las que se incluyeron seis cepas de *C. albicans* y una *C. krusei* con sensibilidad disminuida a caspofungina. La actividad se determinó por dos métodos: microdilución en caldo (documento M27-A2) y por difusión en disco (documento M44-A). La carga del disco fue 2,5 µg y se prepararon siguiendo las indicaciones de Odobasi, Z. y col. (*Antimicrob agents Chemother* 2003, 47:3018-20). Para cada aislado se determinó la CMI₁ ($\approx 50\%$ inhibición) y la CMI₁₀ (100% inhibición) y los halos de inhibición a las 24 y 48 horas de incubación. En todos los ensayos se incluyeron las cepas control de calidad ATCC 6258 y ATCC 22019. Los dos métodos se realizaron en paralelo. La correlación entre los métodos se determinó por el coeficiente de correlación de Pearson (R).

Resultados: La anidulafungina fue muy activa sobre todas las cepas ensayadas. En general, la CMI₁₀ fue $\approx 2 \times$ CMI₁ y apenas cambió con el tiempo de incubación, por ello solo se expresan los resultados de la CMI₁ a las 48h. La CMI₁₀ (µg/mL) y el diámetro medio (mm) medido a las 24 horas fue para: *C. albicans* 0,5 y 14,68; *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* 4 y 7,1; *C. glabrata* 0,016 y 12,6; *C. krusei* 0,12 y 10,8; y *C. tropicalis* 0,03 y 12,4. La CMI₂ para los aislados con sensibilidad disminuida a caspofungina fue $\approx 0,5$ µg/mL. Excepto *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* (CMI₁₀ $\approx 0,5$ µg/mL) para las demás especies la CMI₁₀ fue $\approx 0,12$ µg/mL. Los valores de R fueron especie-dependiente oscilando entre 0,3 para *C. parapsilosis* y 0,97 para *C. famata*. Todos los aislados con CMI₁₀ ≥ 2 µg/mL o CMI₁ $\approx 0,5$ µg/mL no dieron halo de inhibición.

Conclusiones: La anidulafungina es muy activa sobre las levaduras ensayadas incluyendo los aislados con sensibilidad disminuida a caspofungina, excepto sobre *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. famata* donde la actividad fue menor. El método de difusión detecta como resistentes todos los aislados para los que la CMI₁₀ fue ≥ 2 µg/mL o CMI₁ $\geq 0,5$ µg/mL.

A15. Actividad *in vitro* de BAL 4815 y cinco antifúngicos frente a aislamientos clínicos de *Aspergillus* spp.

Cecilia Martín de la Escalera, Ana Romero, Ana Isabel Aller, Elena López-Oviedo, María del Carmen Serrano, Carmen Castro y Estrella Martín-Mazuelos
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla

Objetivo: Comparar la actividad *in vitro* del nuevo antifúngico BAL 4815 (Basilea Pharmaceutica Ltd), que pertenece al grupo de los triazoles, con itraconazol, (Janssen pharmaceutical, USA), voriconazol (Pfizer Central Research, UK), posaconazol (Shering-Plough Research Institute, USA), anfotericina B (Sigma Chemical Co., USA) y caspofungina (Merck Research Laboratories, USA) frente a cepas de *Aspergillus* spp.

Material y métodos: Hemos estudiado 30 aislamientos clínicos de *Aspergillus* spp (12 *A. fumigatus*, 11 *A. flavus*, 3 *A. glaucus*, 2 *A. niger* y 2 *A. terreus*). El método utilizado fue el de de microdilución en caldo (documento M38-P del CLSI). El punto de corte para la lectura de las caspofungina fue la concentración mínima efectiva (CME) y para el resto de los antifúngicos se utilizó la concentración mínima inhibitoria (CMI). BAL 4815, itraconazol, voriconazol, posaconazol y anfotericina B fueron disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO) y caspofungina en agua destilada estéril. Los rangos finales de concentraciones fueron: 0.015-8 µg/ml para todos los azoles estudiados, 0.03-16 µg/ml para anfotericina B y para caspofungina. El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 48 horas en agar dextrosa patata (Difco). El tamaño del inóculo final fue de 0.5 x 10⁷ a 5 x 10⁷ UFC/ml. La CMI fue determinada visualmente como la concentración más baja de antifúngico que produjo una inhibición completa del crecimiento tras 48 h. y 72 h. de incubación (documento M38-P del CLSI). La CME fue determinada de acuerdo con las indicaciones publicadas por Arikan y cols (Antimicrob Agents Chemother. 2001;45: 327-370). Como control de calidad se incluyeron las cepas *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC, *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305.

Resultados:

*Lectura a las 48 horas

Antifúngico	CMI / CME (µg/ml)*		Range (µg/ml)*	% Total ±: 1µg/ml
	50%	90%		
BAL 4815	1	1	0.125-2	89.6
Itraconazol	0.03	0.125	0.015-0.25	100
Voriconazol	0.06	1	0.03-2	92.8
Posaconazol	0.06	0.125	0.03-0.5	100
Anfotericina B	0.25	0.5	0.06-1	100
Caspofungina	0.06	0.125	0.03-0.25	100

No apreciamos ninguna diferencia en los valores de CMI/CME para las diferentes especies de *Aspergillus* estudiadas.

Conclusiones:

1. Todos los antifúngicos ensayados presentaron excelente actividad *in vitro* frente a la mayoría de las cepas estudiadas.
2. El nuevo azol BAL 4815, presentó un menor número de cepas con valores de CMI ±: 1µg/ml, sin embargo son necesarios estudios con mayor número de cepas que correlacionen la actividad *in vitro-in vivo* de este nuevo antifúngico para poder determinar su utilidad clínica.

A16. Actividad *in vitro* de BAL 4815 y cuatro azoles frente a aislamientos clínicos de *C. neoformans*

Cecilia Martín de la Escalera, Ana Romero, Ana Isabel Aller, Rosa Claro, Elena López-Oviedo, Carmen Castro y Estrella Martín-Mazuelos
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla

Objetivo: Comparar la actividad *in vitro* del nuevo antifúngico BAL 4815 (Basilea Pharmaceutica Ltd), que pertenece al grupo de los triazoles, con Fluconazol (Pfizer Central Research, U.K.), Itraconazol, (Janssen pharmaceutical, USA), Voriconazol (Pfizer Central Research, UK) y Posaconazol (Shering-Plough Research Institute, USA) frente a cepas de *C. neoformans*.

Material y métodos: Hemos estudiado 81 aislamientos clínicos de *C. neoformans*. La CMI fue determinada usando el método de microdilución en caldo siguiendo las indicaciones del documento M27-A2 del CLSI y las modificaciones propuestas por Ghannoum (J Clin Microbiol.1992; 30:2881-86). BAL 4815, Itraconazol, Voriconazol y Posaconazol fueron disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO) y Fluconazol en agua destilada estéril. Los rangos finales de concentraciones fueron: 0.12-64 µg/ml para Fluconazol y 0.015-8 µg/ml para el resto de los antifúngicos ensayados. El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 48 horas en Sabouraud agar (Oxoid). El inóculo final fue aproximadamente de 10⁷ UFC/ml. La CMI fue determinada visualmente como la concentración más baja de antifúngico que produjo una inhibición ±: 50% respecto al crecimiento control tras 48 h. y 72 h. de incubación. Como control de calidad se

incluyeron las cepas *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. neoformans* ATCC 90112 y ATCC 90113 Como criterios de interpretación de los puntos de corte para fluconazol utilizamos los propuestos por Aller AI y cols (Antimicrob Agents Chemoter.2000; 44: 1544-48), para itraconazol los publicados en el CLSI, para voriconazol los sugeridos por Pfaller y cols (J Clin Microbiol. 2006; 44:819-26). Para posaconazol y BAL aún no hay establecidos puntos de corte.

Resultados: En la tabla 1 se resumen los resultados (µg/ml) de la actividad *in vitro* obtenidos a las 72 h. de incubación. Encontramos 4 cepas con una CMI a fluconazol ≥ 16 µg/ml. El 100% de estas cepas fueron SDD a itraconazol, el 50% fueron Resistentes voriconazol y el 100% presentaron una CMI a BAL y posaconazol ≥ 1 µg/ml.

Tabla 1

Antifúngico	Rango	CMI50	CMI90
BAL 4815	0.03-4	0.5	1
Fluconazol	0.5-32	4	8
Itraconazol	0.06-1	0.5	1
Voriconazol	0.03-4	0.25	0.5
Posaconazol	0.25-1	0.5	0.5

Conclusiones:

1. Los nuevos antifúngicos voriconazol y posaconazol, y el más reciente BAL 4815, presentaron excelente actividad frente a *C. neoformans* (CMI90 ±: 1 mg/ml).
2. Se necesitan más estudios que incluyan mayor número de cepas resistentes y que se correlacionen con la actividad *in vivo* para evaluar la utilidad clínica de este nuevo antifúngico frente a *C. Neoformans*.

A17. Actividad antifúngica *in vitro* de triazoles frente a *Malassezia*.

Carrillo-Muñoz AJ¹, Giusiano G², Quindós G³, Santos P⁴, Eraso E³, Ezkurra PA³

¹Dept. Microbiología. ACIA. Barcelona. e-mail: alfonso@aciam.com; ²Dept. Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. ³Dept. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco. Bilbao. España; ⁴Hospital de Pediatría JP Garrahan. Buenos Aires. Argentina

Se ha estudiado la sensibilidad *in vitro* de 72 aislamientos de distintas especies del género *Malassezia* a diferentes antifúngicos triazólicos que fueron voriconazol (VRZ), posaconazol (PSZ), albaconazol (ABZ) y ravuconazol (RVZ) en comparación con itraconazol (ITZ) y fluconazol (FZC). Se ha utilizado la técnica de microdilución en medio líquido basada en el método M27-A2 del CLSI empleando medio RPMI 1640 (pH 7, MOPS) al que se añadió bilis de buey. Los rangos de concentraciones utilizados estuvieron entre 0,01 y 16 µg/ml, excepto para fluconazol que fueron de 0,125-256 µg/ml. La incubación de las placas se realizó a 32°C y las lecturas a 5 días de incubación. Las concentraciones mínimas inhibitorias fueron definidas como aquellas en las que se obtuvo un descenso del 50% del crecimiento con respecto a los pocillos control. Se incluyeron las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *Malassezia furfur* CBS 7019 y *Malassezia sympodialis* CBS 7222.

Los resultados obtenidos (Tabla 1) indican una eleva actividad antifúngica *in vitro* de itraconazol, voriconazol, albaconazol, ravuconazol y posaconazol frente a *Malassezia*, sin que exista una diferencia estadísticamente significativa (*t*-student), a excepción de la obtenida con fluconazol. Para éstas sustancias triazólicas, no se obtuvieron diferencias significativas entre las distintas especies ensayadas. Tan sólo *M. sympodialis* (2,9 µg/ml) y *M. pachydermatys* (1,2 µg/ml) tuvieron una mayor sensibilidad a fluconazol.

Los derivados triazólicos, itraconazol, voriconazol, albaconazol, ravuconazol y posaconazol, con una actividad superior a la descrita para sustancias de uso tópico, podrían constituir una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones por *Malassezia*, principalmente en los casos más severos, de mayor extensión o frecuentemente recurrentes.

Tabla 1. Actividad antifúngica de fluconazol (FZL), itraconazol (ITZ), voriconazol (VRZ), albaconazol (ABZ), ravuconazol (RVZ) y posaconazol (PSZ) frente a 72 aislamientos de *Malassezia* (media geométrica en µg/ml).

	n	FLZ	ITZ	VRZ	ABZ	RVZ	PSZ
<i>Malassezia furfur</i>	16	38,05	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02
<i>M. globosa</i>	26	8,94	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01
<i>M. pachydermatys</i>	5	1,2	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
<i>M. restricta</i>	1	128	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>M. slooffiae</i>	5	5,66	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
<i>M. sympodialis</i>	14	2,9	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
<i>Malassezia</i> spp.	5	10	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Global	72	7,4	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01

A18. Actividad *in vitro* de voriconazol frente a todos los aislamientos de sangre de *Candida krusei* y *Candida glabrata* obtenidos en un periodo de 14 años (1990-2003) en el Hospital de Cruces, Barakaldo

José Luis Hernández-Almaraz¹, Elena Eraso², María Villar-Vidal¹, Miriam Alkorta¹, Alfonso Javier Carrillo-Muñoz³ y Guillermo Quindós²
¹Servicio de Microbiología, Hospital de Cruces, Barakaldo; ²Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao; ³ACIA-Microbiología, Barcelona

Antecedentes: El voriconazol es un antifúngico de gran utilidad en el tratamiento de las candidiasis invasoras en paciente críticos e inmunodeficientes.

Objetivo: Conocer la evolución de la sensibilidad *in vitro* de los aislamientos clínicos de *Candida krusei* y *Candida glabrata* a voriconazol, fluconazol, itraconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosina.

Material y métodos: Se determinaron las CMI de voriconazol, fluconazol, ketoconazol, itraconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosina mediante el método de microdilución Sensititre YeastOne (AccuMed, EE.UU.) de 15 aislamientos clínicos de *Candida krusei* y de 28 de *Candida glabrata*, obtenidos en hemocultivos en un periodo de 14 años (1990-2003) en el Servicio de Microbiología clínica del Hospital de Cruces, Barakaldo. Como cepas control se utilizaron las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258. La lectura se realizó tras incubación a 37°C durante 24 h. También se evaluó la sensibilidad a voriconazol por los métodos M44 del CLSI y Etest (AB-Biodisk, Suecia).

Resultados: Todos los aislamientos fueron sensibles a anfotericina B y 5-fluorocitosina. Dos aislamientos, de los años 1994 y 2003, de *Candida glabrata* (7'1%) fueron resistentes a voriconazol (CMI \geq 2 μ g/ml) y mostraron resistencia cruzada con fluconazol, ketoconazol e itraconazol. Además, 5 aislamientos de *Candida glabrata* (17'9%) y 3 de *Candida krusei* (20%) mostraron una sensibilidad a voriconazol dependiente de la dosis (CMI 1 μ g/ml). Sin embargo, los dos aislamientos resistentes a voriconazol por microdilución, mostraron ser sensibles a este antifúngico cuando se evaluaron por los métodos M44 y Etest. Todos los aislamientos de *Candida krusei* y 6 de *Candida glabrata* (21'4%) fueron resistentes a fluconazol; además, 17 *Candida glabrata* (60'7%) fueron sensibles dependiendo de la dosis. Dos aislamientos de *Candida krusei* (13'3%) y 17 de *Candida glabrata* (60'7%) fueron resistentes a itraconazol; las demás *Candida glabrata* (39'3%) y 11 *Candida krusei* (73'3%) fueron sensibles dependiendo de la dosis. Finalmente, 5 aislamientos de *Candida krusei* (33'3%) y 12 *Candida glabrata* (42'9%) fueron resistentes a ketoconazol.

Conclusiones: Voriconazol ha sido muy activo frente a los aislamientos de sangre de *Candida krusei* y *Candida glabrata*. Esta actividad *in vitro* fue semejante con independencia del año de cultivo de los aislamientos.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PI030662/2003 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

A19. Actividad *in vitro* de voriconazol y otros antifúngicos uso habitual frente a aislamientos de sangre e intra-abdominales de diferentes especies de *Candida* de importancia médica

Miriam Alkorta¹, José Luis Hernández-Almaraz¹, Elena Eraso² y Guillermo Quindós²

¹Servicio de Microbiología, Hospital de Cruces, Barakaldo y ²Laboratorio de Micología médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao

Antecedentes: Las infecciones fúngicas siguen siendo un importante problema de morbilidad y mortalidad. Aunque no existen indicaciones estrictas para realizar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, el conocimiento de la sensibilidad de las cepas aisladas en cada institución sanitaria y área geográfica es de un importante valor epidemiológico, sobre todo a la hora de tomar decisiones en el tratamiento empírico de las infecciones por hongos en pacientes críticos.

Objetivo: Conocer la situación de la sensibilidad *in vitro* de los aislamientos clínicos de *Candida* frente a los antifúngicos más utilizados en la práctica clínica.

Material y métodos: Se determinó la CMI mediante E-test de acuerdo con las especificaciones del fabricante (AB-Biodisk, Suecia) de 116 aislamientos clínicos de *Candida* spp. (42 *Candida parapsilosis*, 38 *Candida albicans*, 15 *Candida glabrata*, 9 *Candida krusei*, 6 *Candida tropicalis*, 4 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida lusitanae*, 1 *Candida lypolitica*), aisladas en hemocultivos y abscesos intraabdominales. Se usó medio RPMI con 2% de glucosa para la anfotericina B y 5-fluorocitosina y medio GMB para fluconazol, itraconazol y voriconazol. Como cepas control se utilizaron: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258. La lectura se realizó tras incubación a 37°C durante 48 horas.

Resultados: De las 116 cepas estudiadas, todas fueron sensibles a anfotericina B. Un 10,3% de los aislamientos fue resistente a fluconazol, que se correspondía con el 100% de las *Candida krusei* y el 20% de las *Candida glabrata*. Con respecto a los azoles, el 100% de las cepas de *Candida krusei* y el 46,6% de las cepas de *Candida glabrata* fueron resistentes a fluconazol. El 26,6% de las cepas de *Candida glabrata* eran sensibles dosis dependiente a este antifúngico. Frente al itraconazol hubo un 16,8% de resistencia en el total de las candidas, que representaban al 80% de las *Candida glabrata*, 66,6 % de las *Candida krusei* y 50% de las *Candida guilliermondii*, mientras que el 100% de las *Candida lypolitica*, el 44,4% de las *Candida krusei*, el 33,3 % de las *Candida guilliermondii*, el 16,6% de las 6 *Candida tropicalis* y el 13,3% de las *Candida glabrata* fueron sensibles dosis dependiente. El voriconazol inhibió a todas las levaduras a concentraciones menores de 1mg/ml. Hubo 7 cepas con CMI > 2 μ g/ml, 6 cepas de *Candida glabrata* (2 cepas con CMI \geq 4 μ g/ml) y una cepa de *Candida guilliermondii*, todas ellas también resistentes a fluconazol e itraconazol.

Conclusiones: Anfotericina B sigue siendo el antifúngico más activo frente a las levaduras aisladas en infecciones graves, mientras que entre los azoles, voriconazol es el que ha presentado mayor actividad. *Candida glabrata* ha sido la especie más resistente con un 13,3 % de cepas resistentes a todos los azoles estudiados (fluconazol, itraconazol y voriconazol).

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PI030662/2003 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

A20. Actividad antifúngica *in vitro* de sertaconazol frente a hongos productores de onicomicosis (método de microdilución en medio líquido CLSI-M27-A2).

Carrillo-Muñoz AJ¹, Quindós G², Guardia C⁶, del Valle O³, Santos P⁴, Giusiano G⁵, Ezkurra PA², Cárdenas CD¹

¹Dept. Microbiología. ACIA. Barcelona. España. e-mail: alfonso@aciam.com; ²Dept. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco. Bilbao. España; ³Serv. Microbiología. Hospitals Vall d'Hebrón. Barcelona. España; ⁴Hospital de Pediatría Pablo Garrahan. Buenos Aires. Argentina; ⁵Dept. Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste. Argentina; ⁶CAP Dr. Robert Barcelona. España

Se ha comparado la actividad antifúngica de sertaconazol (STZ), con la obtenida para amorolfina (AMR), ciclopiroxolamina (CPO), bifonazol (BFZ), tioconazol (TCZ), fluconazol (FLZ) y terbinafina (TRB) por medio de un método estandarizado de microdilución en medio líquido (CLSI M27-A2). Se han empleado los 100 primeros aislamientos clínicos de uñas recibidos en el laboratorio de procesado (levaduras, hongos filamentosos oportunistas y dermatofitos) entre los meses de agosto de 2004 y 2005. Todos ellos fueron identificados por medio de métodos bioquímicos y morfológicos estandarizados. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Globalmente, la actividad antifúngica de STZ (MIC=0,28 μ g/ml) fue estadísticamente superior a de BFZ (MIC=2,9 μ g/ml), FLZ (MIC=3,77 μ g/ml), AMR (MIC=0,81 μ g/ml) y CPO (MIC=1,07 μ g/ml) y superior a la de TRB (MIC 0.42 μ g/ml) (Tabla 1). El estudio detallado por grupos patógenos, reveló que la actividad de STZ era superior frente hongos dermatofitos (Tabla 1), en comparación a los otros grupos de hongos. En este caso no existió diferencia significativa frente a obtenida para TRB y AMR.

En conclusión, los patrones de sensibilidad a sertaconazol frente a hongos productores de micosis en uñas, que son dependientes de género y especie, son similares a los de derivados de las alilaminas (TRB y AMR), CPO y mejoran la actividad de derivados azólicos como BFZ y FLZ. En conclusión, Sertaconazol puede ser una buena alternativa en el tratamiento de las onicomicosis.

Tabla 1. Actividad antifúngica *in vitro* (μ g/ml) de sertaconazol (STZ), bifonazol (BFZ), fluconazol (FLZ), terbinafina (TRB), ciclopiroxolamina (CPO) y amorolfina (AMR) frente a 100 aislamientos clínicos de hongos productores de onicomicosis.

	STZ	BFZ	FLZ	TRB	CPO	AMR
	gMIC	gMIC	gMIC	gMIC	gMIC	gMIC
Levaduras (<i>Candida</i> spp.)	0.31	9.31	1.45	2.11	1.51	5.61
Hongos oportunistas	6.02	8.52	82.35	8.26	3.31	0.55
Hongos dermatofitos	0.08	0.28	6.83	0.03	0.42	0.03
TOTAL (n=100 aislamientos)	0.28	2.9	3.77	0.42	1.07	0.81

A21. Actividad antifúngica de caspofungina frente a levaduras, determinada por medio de un método de difusión en agar (CLSI M-44A)

Carrillo-Muñoz AJ¹, Quindós G², del Valle O³, Santos P⁴, Giusiano G⁵, Ezkurra PA², Estivill M.D⁶, Cárdenas CD¹

¹Dept. Microbiología. ACIA. Barcelona. España. e-mail: alfonso@aciam.com; ²Dept. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco. Bilbao. España; ³Serv. Microbiología. Hospitals Vall d'Hebrón. Barcelona. España; ⁴Hospital de Pediatría Pablo Garrahan. Buenos Aires. Argentina; ⁵Dept. Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste. Argentina; ⁶Althaia-Centre Hospitalari Manresa. España

Empleando el método de difusión en agar (NeoSensitabs®) basado en el CLSI M-44^A, se ha determinado la actividad antifúngica de caspofungina (CAS) frente a 184 aislamientos clínicos de levaduras en comparación a fluconazol (FNZ), itraconazol (ITZ) y amphotericina B (AMB). Se estudiaron: 100 *Candida albicans*; 2 *Candida famata*; 10 *Candida glabrata*, 4 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida intermedia*; 5 *Candida krusei*; 1 *Candida lusitanae*, 29 *Candida parapsilosis*, 8 *Candida tropicalis*, 1 *Cryptococcus laurentii*, 1 *Cryptococcus unigutulatus*, 1 *Cryptococcus neoformans*, 1 *Rhodotorula minuta* y 18 *Trichosporon ashaii*. Como controles de calidad se emplearon las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

El 72% de los aislamientos fueron sensibles a CAS, el 23,6% resultó sensibles dependientes de la dosis (SDD) (23/29 *C. parapsilosis* fueron SDD o resistentes) y el 4,3% restante fue resistente. Estos niveles de sensibilidad contrastan con los obtenidos para ITZ (94,6 % de sensibilidad). Los 18 aislamientos de *T. ashaii* fueron resistentes a CAS, ofreciendo niveles bajos de sensibilidad a FNZ y una alta sensibilidad a ITZ. FNZ fue especialmente activo frente a *C. albicans* (98%) del mismo modo que ITZ (99%) Se obtuvo un 9% de resistencias a AMB.

La comparación de los tamaños de halos de inhibición creados y los porcentajes de las distintas categorías confirman la diferencia de patrones de sensibilidad entre CAS y los triazoles (FNZ y ITZ). Los valores obtenidos por medio de esta técnica de difusión en agar, no difieren de los descritos para CAS por otros métodos.

Tabla 1. Sensibilidad de 184 levaduras frente a caspofungina, fluconazol, itraconazol y amphotericina B determinados por un método de difusión en agar (NeoSensitabs®). (S=sensibles; I/S-DD=intermedios o sensible dependiente de dosis; R=resistentes)

	<i>Candida</i> spp			<i>Trichosporon ashaii</i>		
	S	I/S-DD	R	S	I/S-DD	R
Caspofungin (5 µg)	71,2%	23,8%	5%	-	-	18
Fluconazole (25 µg)	90%	3,1%	6,9%	3	2	12
Itraconazole (8 µg)	94,4%	0,6%	5%	18	-	-
Amphotericina B (10 µg)	88,1%	7,5%	4,4%	15	-	3

A22. Patrón de sensibilidad a voriconazol en aislamientos clínicos de hongos dermatofitos y *Scopulariopsis brevicaulis*.

Carrillo-Muñoz AJ¹, Fernández-Torres B², Guarro J², Quindós G³, Guardia C⁴, del Valle O⁵, Giusiano G⁶, Estivill D⁷, Cárdenas CD¹

¹Dept. Microbiología. ACIA. Barcelona. España. e-mail: alfonso@aciam.com; ²Unitat de Microbiologia. Facultat de Medicina. Institut d'Estudis Avançats. Universitat Rovira i Virgili. Reus. España; ³Dept. Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco. Bilbao. España; ⁴CAP Dr. Robert. Barcelona. España; ⁵Serv. Microbiología. Hospitals Vall d'Hebrón. Barcelona. España; ⁶Dept. Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste. Argentina; ⁷Althaia-Centre Hospitalari. Manresa. España

Utilizando un método basado en el CLSI M27-2A, se ha estudiado el perfil de actividad de antifúngica del voriconazol frente a 511 aislamientos clínicos de hongos dermatofitos (22 *Epidermophyton floccosum*, 9 *Microsporium aoudouinii*, 99 *Microsporium canis*, 2 *Microsporium concentricum*, 1 *Microsporium cookei*, 4 *Microsporium ferrugineum*, 1 *Microsporium fulvum*, 1 *Microsporium gallinaceum*, 31 *Microsporium gypseum*, 1 *Microsporium nanuum*, 1 *Microsporium praecox*, 1 *Microsporium racemosum*, 19 *Trichophyton tonsurans*, 2 *Trichophyton ajelloi*, 2 *Trichophyton balcanicum*, 2 *Trichophyton concentricum*, 7 *Trichophyton erinacei*, 20 *Trichophyton interdigitale*, 123 *Trichophyton mentagrophytes*, 1 *Trichophyton phaseoli*, 139 *Trichophyton rubrum*, 3 *Trichophyton schoenleinii*, 2 *Trichophyton simii*, 1 *Trichophyton verrucosum*, 6 *Trichophyton violaceum*) y 11 *Scopulariopsis brevicaulis*

Los resultados muestran que voriconazol es activo con concentraciones inferiores 4 µg/ml frente a todas las especies de hongos dermatofitos estudiadas. Solo *S. brevicaulis* tiene una concentración inhibitoria mínima mayor. A pesar de que voriconazol no es un antifúngico diseñado para el

tratamiento de las dermatofitosis, esta podría ser una alternativa eficaz en aquellos casos de tratamientos orales prolongados.

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias de voriconazol (µg/ml) frente a 511 hongos dermatofitos y *Scopulariopsis brevicaulis*. (medias geométricas)

	gMIC		gMIC
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,042	<i>Trichophyton ajelloi</i>	0,088
<i>Microsporium aoudouinii</i>	0,071	<i>Trichophyton balcanicum</i>	0,061
<i>Microsporium canis</i>	0,028	<i>Trichophyton concentricum</i>	0,043
<i>Microsporium concentricum</i>	0,032	<i>Trichophyton erinacei</i>	0,11
<i>Microsporium cookei</i>	0,015	<i>Trichophyton interdigitale</i>	0,107
<i>Microsporium ferrugineum</i>	0,025	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,1
<i>Microsporium fulvum</i>	0,125	<i>Trichophyton phaseoli</i>	1
<i>Microsporium gallinaceum</i>	0,25	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,07
<i>Microsporium gypseum</i>	0,145	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	0,048
<i>Microsporium nanuum</i>	0,125	<i>Trichophyton simii</i>	0,5
<i>Microsporium praecox</i>	0,03	<i>Trichophyton verrucosum</i>	0,062
<i>Microsporium racemosum</i>	1	<i>Trichophyton violaceum</i>	0,054
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0,054	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	8,52

A23. TRIKENOL, un producto con actividad frente a *Malassezia* como posible agente cosmético anticaspa

Carrillo-Muñoz AJ¹, Giusiano G², Benaiges A³, Mayordomo L³, Rubio E³

¹Dept. Microbiología. ACIA. Barcelona. España e-mail: alfonso@aciam.com; ²Dept. Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste. Argentina; ³Dept. I+D. Provital S.A. Barcelona. España

Se ha estudiado la actividad antifúngica de Trikenol frente 10 aislamientos clínicos de *Malassezia* y a dos cepas de referencia (*Malassezia furfur* CBS 1878 y *Malassezia globosa* CBS 7986). Se ha empleado un método de dilución en agar de Leeming-Notman (pH 7) y diluciones dobles seriadas de Trikenol con DMSO como diluyente. Los tamaños de inóculo fueron de 5x10⁶ UFC/ml en suero fisiológico estéril con Tween 20®. Las lecturas se realizaron tras 72h de incubación (32°C). Se incluyeron controles de esterilidad y de crecimiento y además se ensayó la sensibilidad de las cepas control a ketoconazol por el mismo método para obtener valores de referencia frente a un antifúngico de uso tópico.

Los resultados obtenidos (Tabla 1) muestran una elevada actividad antifúngica frente a *Malassezia*, que además es especie dependiente al existir diferencias entre ellas. En este sentido, esa actividad antifúngica de Trikenol fue superior frente a *M. furfur* y *M. globosa*, involucradas en la dermatitis seboréica. Por otro lado, en todos los ensayos de actividad fue posible obtener una importante reducción del recuento de colonias, por lo tanto una gran inhibición, a concentraciones muy inferiores de Trikenol® respecto a las concentraciones mínimas inhibitorias (0,042 µg/ml para *M. furfur*, *M. globosa* y *M. restricta*). La sensibilidad de las dos cepas control de calidad a ketoconazol fue de 0,25 µg/ml.

Estos datos demuestran la utilidad de Trikenol como inhibidor de *Malassezia* y se completan con otros obtenidos en ensayos posteriores de actividad frente a bacterias (*Propionibacterium acnes*) frente a las que también mostró una importante actividad y que permitieron la selección del producto para ser ensayado como agente anticaspa en pacientes voluntrarios en los que también produjo una reducción de las células y de los síntomas producidos por *Malassezia*.

Tabla 1. Rango de concentraciones mínimas inhibitorias de Trikenol frente a aislamientos de *Malassezia* y cepas de referencia.

	Trikenol (µg/ml)
<i>Malassezia globosa</i> (n=2)	1,5
<i>Malassezia restricta</i> (n=2)	3,2
<i>Malassezia furfur</i> (n=6)	0,37-1,5
<i>M. globosa</i> CBS 7896	0,008-0,064
<i>M. furfur</i> CBS 1878	0,032

B. Biología Molecular

B1. Respuestas a la luz en *Mucor circinelloides*: los tres genes *white-collar 1*

Fátima Silva, Santiago Torres-Martínez y Victoriano Garre
Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología,
Campus de Espinardo. Universidad de Murcia. Murcia

La luz regula un gran número de respuestas fisiológicas y de desarrollo en muchos organismos, incluidos los hongos filamentosos. En éstos, donde se ha profundizado más en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el control de las distintas respuestas a la luz es en el ascomiceto *Neurospora crassa*, en el que se han caracterizado dos genes, *white-collar 1 (wc-1)* y *white-collar 2 (wc-2)*, que cifran proteínas esenciales para el control de la respuesta a la luz. Ambas proteínas son factores transcripcionales que forman complejos que, una vez activados por la luz, inducen la transcripción de un buen número de genes. Además, la proteína WC-1 presenta un dominio LOV, que le permite funcionar como receptor de luz azul. Genes similares a *wc-1* and *wc-2* se han identificado en otros hongos ascomicetos y basidiomicetos. Nuestro objetivo es la caracterización de los mecanismos implicados en la regulación por la luz en Zygomycetes, utilizando como modelo el hongo *Mucor circinelloides*. El micelio de este hongo muestra una síntesis de carotenos inducida por la luz (fotocarotenogénesis), una respuesta que ha sido estudiada con detalle. Por otra parte, sus esporangioforos presentan fototropismo positivo, como se describe en esta comunicación. Ambas respuestas dependen de luz azul, aunque también se observa fototropismo cuando se iluminan los esporangioforos con luz verde. Con el objetivo de identificar genes de *M. circinelloides* responsables de receptores de luz azul, se han clonado tres genes con homología a *wc-1*, que se han denominado *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*. Mediante la generación, por interrupción génica, de mutantes para cada uno de ellos, se ha analizado su posible función en la regulación de las respuestas a la luz. Los mutantes en los genes *mcwc-1a* y *mcwc-1b* muestran fenotipo silvestre para la fotocarotenogénesis, mientras que los mutantes en *mcwc-1c* muestran un claro defecto en esta respuesta. Este defecto está relacionado con una alteración en la inducción de la expresión de los genes carotenogénicos, sugiriendo que el gen *mcwc-1c* controla la inducción de la expresión de estos genes por la luz. Por otro lado, los esporangioforos de los mutantes en los genes *mcwc-1b* y *mcwc-1c* presentan un fenotipo silvestre para el fototropismo, mientras que los esporangioforos de los mutantes en el gen *mcwc-1a* son incapaces de orientarse respecto a la dirección de la luz. Estos resultados indican que la respuesta fototrópica depende del gen *mcwc-1a*, mientras que la fotocarotenogénesis depende del gen *mcwc-1c*, sugiriendo la existencia de al menos dos rutas de transducción de la señal luminosa en *M. circinelloides*. Esta es una situación más compleja que la observada en ascomicetos y basidiomicetos, donde sólo parece existir una única ruta que controla todas las respuestas a la luz azul. Ello hace de *M. circinelloides* un organismo especialmente interesante para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en estas respuestas.

B2. Aislamiento y caracterización de un gen que codifica una tiorredoxina en una cepa de biocontrol de *Trichoderma harzianum*

Eugenia Morán¹, Marta Montero¹, Rosa-Elena Cardoza^{1,2},
Santiago Gutiérrez², Enrique Monte¹ y Rosa Hermosa¹

¹Dpto de Microbiología y Genética-Centro-Hispano Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca, Pza. Doctores de la Reina, Salamanca; ²Área de Microbiología, Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud, Universidad de León, Ponferrada, España

Los organismos han desarrollado mecanismos para protegerse de la toxicidad debida a las especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) que se forman como consecuencia del metabolismo aeróbico, y también por hiperoxia, radiaciones, luz, metales y drogas activadoras del estado redox. El estrés en las células es un estado en el cual los niveles ROS exceden a las defensas antioxidantes disponibles.

El género *Trichoderma* engloba especies con interés biotecnológico (producción de enzimas) y agrícola (agentes de control biológico). Utilizando una estrategia de aproximación genómica dentro del proyecto europeo de genómica funcional *TrichoEST* (FP5, QLRT-2001-02032), se obtuvieron 8710 ESTs y 3478 secuencias únicas a partir de varias genotecas de cDNA de la cepa CECT2413. El clon L20T59P002R00614 (EST614) que mostraba alta homología con tiorredoxinas, en un análisis BLASTx, se seleccionó para su estudio.

El gen correspondiente se aisló de las cepas *T. harzianum* CECT 2413 y *T. virens* T59, por PCR, utilizando un oligo degenerado y otro oligo diseñado sobre el extremo 3' de la EST614. El oligo degenerado se diseñó sobre un alineamiento de varias tiorredoxinas depositadas en bases de datos. El gen *Thtrx* tiene un tamaño de 619 pb, está interrumpido por 3 intrones y su ORF codifica un péptido de 98 aminoácidos. Se analizó la expresión del gen en diferentes condiciones de crecimiento de la cepa

CECT2413; así como su presencia en varias cepas que representan seis genotipos diferentes del género *Trichoderma*. El tratamiento con agua oxigenada y con metales pesados aumenta los niveles del transcrito y, también, la actividad enzimática, medida como reacción con DTT y precipitación de insulina. El gen aparece como copia única en los seis genotipos analizados.

Para un análisis funcional del *Thtrx* en CECT 2413 se han obtenido varios transformantes, por sobreexpresión y por silenciamiento, del gen. Se están realizando ensayos de resistencia a diferentes estreses abióticos y de propiedades antifúngicas en algunos transformantes, previamente seleccionados por análisis PCR, Southern y Northern.

B3. Aislamiento y caracterización de una NADPH oxidasa de *Trichoderma harzianum*

Marta Montero¹, Eugenia Morán¹, Rosa Elena Cardoza²,
Santiago Gutiérrez², Rosa Hermosa¹ y Enrique Monte¹

¹Departamento de Microbiología y Genética, Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca, Salamanca;

²Departamento de Microbiología, Campus de Ponferrada, Universidad de León, Ponferrada, León, España

Las especies de *Trichoderma* son agentes de control biológico utilizadas en agricultura. Entre los mecanismos que *Trichoderma* utiliza para controlar a los patógenos se encuentra la inducción de los mecanismos de defensa en plantas. Una de las principales respuestas de las plantas frente a los patógenos es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo la NADPH oxidasa la principal productora de ROS en las primeras horas de la infección.

El clon L03T34P05R07015 generado en el proyecto TrichoEST mostró, en un análisis BLAST, alta homología con una NADPH oxidasa de *Podospira anserina*. La EST se utilizó como sonda en el escrutinio de una genoteca de DNA genómico de *T. harzianum* CECT 2413 (T34). Se aisló un fago positivo y se secuenció el gen completo y parte del promotor. El gen completo, denominado *Thnox*, tiene un tamaño de 1799 pb con un ORF de 1674 pb. El cDNA se obtuvo de fagos amplificados de la genoteca L03.

El análisis informático de la secuencia del promotor revela la presencia de numerosas zonas de unión a elementos reguladores del metabolismo del oxígeno, muy conservadas en los promotores de óxido-reductasas. La secuencia proteica está formada por 557 aminoácidos con una masa molecular de 64,3 kDa y un pI calculado de 9,21, presenta 6 dominios transmembrana y los extremos C-terminal y N-terminal se hallan en el interior celular.

Los estudios de expresión se realizaron creciendo la cepa T34 en diferentes condiciones (hambre de carbono, hambre de nitrógeno, paredes celulares de hongos patógenos, presencia de paredes de planta o de polímeros de paredes de planta), estreses abióticos y presencia de ácido salicílico. La máxima expresión se produce en presencia de ácido salicílico, pectina al 0,1%, paredes celulares de fresa al 1% y glucosa al 2%.

Para realizar el análisis funcional el gen *Thnox* se introdujo en plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizando el plásmido binario pBI121 y *Agrobacterium tumefaciens*. La tercera generación de plantas está siendo sometida a ensayos de resistencia a patógenos y a diferentes estreses abióticos. Al mismo tiempo se realizó el silenciamiento en la cepa T34 mediante la generación de "short hairpin RNA". Se están realizando ensayos de micoparasitismo y resistencia a diferentes condiciones de estrés de los transformantes silenciados.

B4. Regulación de la señalización vía MAPKs en *Saccharomyces cerevisiae* por la fosfatasa de especificidad dual Msg5

María José Marín, Marta Flández, Clara Bermejo, Eva Tapia,
Humberto Martín y María Molina

Dpto. Microbiología II. Fac. de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de reconocer estímulos extracelulares y organizar la respuesta adecuada gracias a la participación de rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs. Sin embargo, para una correcta respuesta es muy importante una regulación precisa de la duración e intensidad de activación de estas rutas. En ello están implicadas las proteínas fosfatasa, que actúan como reguladores negativos de MAPKs. Una de estas proteínas es Msg5, una fosfatasa de especificidad dual (DSP) capaz de defosforilar residuos de treonina y tirosina presentes en el dominio de activación de las MAPKs. Msg5 se produce como dos isoformas debido a comienzos de traducción alternativos y regula la actividad de varias MAPKs. Así, esta DSP está principalmente implicada en el mantenimiento de un bajo nivel de activación basal de Sit2, MAPK de la ruta de integridad celular, aunque también colabora con otras fosfatasas en la regulación de la fosforilación máxima de esta MAPK en condiciones de estimulación. Por otra parte, Msg5 actúa modulando negativamente a la MAPK Fus3, tanto en condiciones de crecimiento vegetativo como tras la estimulación de la ruta de apareamiento.

Uno de los aspectos por tanto más interesantes de la función de esta MAPK, al igual que ocurre con otras proteínas fosfatasa homólogas de eucariotas superiores, es su capacidad para regular negativamente distintas MAPKs. Sin embargo, el conocimiento actualmente disponible de los mecanismos moleculares que regulan la selectividad de actuación sobre los distintos sustratos dependiendo del contexto celular es muy escaso. Con el fin de profundizar en este aspecto, se ha llevado a cabo un estudio de la interacción entre las dos isoformas de Msg5 y las distintas MAPKs. Experimentos de copurificación revelan distintas especificidades de estas isoformas por las MAPKs Slt2, Fus3 y Kss1. Por otra parte, experimentos de RT-PCR cuantitativa sobre genes cuya expresión es regulada por Fus3 reflejan la diferencia de actividad sobre esta MAPK entre las dos isoformas de Msg5. Todo ello indicaría que la existencia de distintas isoformas de la misma fosfatasa podría suponer un mecanismo novedoso de regulación de MAPKs.

Con el fin de conocer qué mecanismos median la interacción entre Msg5 y las distintas MAPKs hemos identificado tres posibles motivos de unión de Msg5 a éstas. Estos motivos se encuentran dentro del dominio aminoterminal de esta fosfatasa, el cual media su interacción con MAPKs. Se ha procedido a la sustitución por alanina de distintos aminoácidos que serían esenciales en estos motivos y se ha ensayado la capacidad de unión a las MAPKs Slt2, Fus3 y Kss1 de las distintas versiones mutantes de Msg5, tanto mediante experimentos de copurificación como de "dos híbridos". De esta forma hemos identificado motivos específicos de interacción de esta fosfatasa con estas MAPKs.

Agradecimientos: Trabajo subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia dentro del Proyecto BIO2004-02019.

B5. Estudio de la función de Ptc1 sobre la integridad de la pared celular y morfogénesis en *Saccharomyces cerevisiae*

Lorena Palacios, César Nombela, Humberto Martín y María Molina
Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia UCM.
Madrid, España

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* existen rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs, utilizadas para reconocer señales externas y responder adecuadamente a ellas. En estas rutas existen reguladores negativos, gracias a los cuales se modula la duración e intensidad de la señal transmitida. Entre estos reguladores están las proteínas fosfatasa que controlan el nivel de activación, adaptación y recuperación de cada ruta en respuesta a diferentes estímulos. Dentro de ellas están las serin-treonin fosfatasa, las cuales a su vez se dividen en varios grupos.

Nosotros hemos centrado nuestro trabajo en las serin-treonin fosfatasa tipo 2C, llamadas PTCs en *Saccharomyces cerevisiae*, de las que se sabe que actúan como reguladores negativos en la ruta HOG en respuesta a estrés osmótico, pero no se conoce su función sobre la vía de integridad celular mediada por la MAPK Slt2. Con el fin de encontrar si alguna de estas fosfatasa ejerce su función sobre dicha ruta, analizamos el efecto de la falta de cada una de las 7 PTCs y de Nbp2, una proteína que se ha descrito que actúa como un adaptador de Ptc1 en la ruta mediada por la MAPK Hog1, sobre la activación de Slt2. Mediante ensayos de inmunodetección, observamos que únicamente la falta de Ptc1 y Nbp2 produce un aumento en la fosforilación de la MAPK Slt2, tanto en condiciones basales como tras un tratamiento con diferentes estímulos. Además, observamos que la sobreexpresión de Ptc1 conduce a una disminución de Slt2 fosforilado. Por otro lado la cantidad de Ptc1 se ve aumentada al someter a la célula a diferentes estímulos que dañan la pared celular.

El análisis fenotípico de la levadura delecionada en *PTC1* y *NBP2* muestra una sensibilidad a compuestos que alteran la integridad de la pared celular. Otra característica fenotípica que hemos encontrado es la letalidad que se observa cuando Ptc1 se sobreexpresa en una célula que está creciendo en un medio de cultivo al que hemos añadido cafeína.

Por otro lado, mutantes en *ptc1* muestran un fenotipo de multigermación cuando crecen a 37°C, lo cual sugiere un fallo en citoquinesis. Usando la septina Cdc10 fusionada a GFP observamos que el anillo de septinas permanece visible en el cuello de las diferentes yemas, lo que parece indicar que el defecto en citoquinesis pueda ser debido a un fallo en el ensamblaje del anillo.

Hemos analizando la interacción de Ptc1 y Nbp2 con componentes de la ruta de integridad celular mediante técnicas de co-purificación y estamos analizando los resultados de un rastreo mediante el sistema de "dos híbridos".

Agradecimientos: Trabajo subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia dentro del Proyecto BIO2004-02019.

B6. Análisis proteómico de determinantes antigénicos reconocidos por un anticuerpo monoclonal anti-*C. albicans* en la línea celular HT29.

Ana Abad¹, Andoni Ramirez¹, Iñaki San Segundo¹, Sonia Brena², Jose Ponton² & Fernando Luis Hernando¹.

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco, Bilbao;

²Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco, Bilbao, España.

Introducción: La reactividad cruzada de proteínas tanto entre diversos organismos como entre proteínas de diversas localizaciones celulares se ha ido viendo durante los últimos 15 años. Entre ellas, se ha descrito la reactividad entre determinantes antigénicos del género *Candida* y células tumorales humanas.

Objetivo: Describimos aquí los determinantes antigénicos reconocidos por un anticuerpo monoclonal anti-*C. albicans* en la línea celular HT29 mediante electroforesis bidimensional, western-blot, y espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

Descripción: Se usó el Ac monoclonal C7 desarrollado frente a una manoproteína de la pared celular de los tubos germinales de *C. albicans*. Esta proteína ha sido recientemente identificada como la Als3p, cuya función está relacionada con la adhesión a las células del hospedador y por tanto tanto con su capacidad invasora.

Se utilizó la línea celular HT29 de adenocarcinoma de colon. Extracciones proteicas completas se separaron mediante electroforesis bidimensional en condiciones desnaturalizantes (2D-PAGE). La reacción del anticuerpo se evaluó mediante western blot y un sistema de detección por quimioluminiscencia.

Tanto las membranas, como los geles y radiografías fueron analizados con el sistema Image Master 2D-Platinum. Aquellos péptidos que reaccionaron con el anticuerpo en al menos tres inmunodetecciones distintas fueron tomados de geles teñidos con azul Coomassie y analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Los datos de la huella de masa de péptidos obtenidos se buscaron en las bases de datos MASCOT, ALDENTE Y MS-FIT para la identificación final de los péptidos.

Resultados: La reacción del anticuerpo se centró en una zona de 35 a 65 kDa y 4 a 6 de pI. También se detectó una banda básica reactiva a 36 kDa y otra zona destacable hacia los 20kDa y de 5,5 a 7 de pI.

Se identificaron un total de 15 puntos, siendo 5 los más reactivos: tubulina α , tubulina β , reticulocalbina, citoqueratina 18 y hnRNP A2/B1.

Según su clasificación funcional la mayoría de las proteínas identificadas corresponden a proteínas del citoesqueleto y diversos enzimas, si bien también hay varias proteínas de unión a calcio y otras de unión a ácidos nucleicos, así como 2 proteínas antioxidantes y una proteína de transporte.

Bibliografía

1. Hashizume S. Hum. Antibod. Hybridomas. 1991, 2:142-147.
2. Yasumoto K. Hum. Antibod. Hybridomas. 1993, 4:186-189.
3. Kawamoto S. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 1995, 31:724-729.
4. Schneider J. Br J Cancer. 1998, 77(6):1015-1020.
5. Martínez N. Cancer Res. 1999, 1(59):5408-5411.
6. Barea P. FEMS. Immun & Med Microbiol. 1999, 23:343-354.

B7. Estudio molecular de aislamientos de *Sporothrix schenckii* obtenidos de pacientes y de la naturaleza en el estado de Puebla, México

Yolanda Romo¹, Francisca Hernández², Ana Yadira Ramírez¹, Clara Pérez¹, Alejandra Espinosa¹

¹Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México; ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México

Introducción: *Sporothrix schenckii* es un hongo dimórfico que causa esporotricosis, la micosis subcutánea más frecuente en México (1). En México existen diversos estudios epidemiológicos de la enfermedad; pero pocos sobre los aspectos moleculares del agente causal (2).

Objetivo: Diferenciar por RAPD-PCR los aislados de *S. schenckii* de pacientes y de la naturaleza.

Materiales y métodos: Se estudiaron 16 aislamientos de pacientes y 22 de la naturaleza de *S. schenckii* de nueve municipios del estado de Puebla. Se obtuvieron algunos datos epidemiológicos de pacientes con esporotricosis. *S. schenckii* fue caracterizado por morfología macroscópica y microscópica, reversión a levadura, inoculación en ratones BALB/c y obtención de retrocultivos. Se hizo un análisis genotípico mediante RAPD-PCR utilizando seis oligonucleótidos (OPBG-01, OPBG-14, OPBG-19, OPD-18, OPAA-11, OPB-07) agrupando los aislamientos por el método de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA).

Resultados: La principal forma clínica fue linfagítica (93.8%) en extremidades. La mayoría de los aislamientos presentaron morfología macro y microscópica típica; todos revirtieron a levadura (los de la naturaleza más lentamente que los de pacientes); algunos produjeron enfermedad en el ratón y de otros sólo se obtuvo retrocultivo. Los perfiles electroforéticos

mostraron un fragmento de 500 pb (con oligonucleótido OPD-18) que podría ser estudiado como marcador de la especie. Los aislamientos formaron dos grupos, el Grupo I con un 62% de similitud entre 36 aislamientos y el Grupo II con un 67% entre dos aislamientos. El Grupo I formó tres subgrupos, el Ia con 13 aislamientos de pacientes, el Ib con tres de pacientes y 11 de la naturaleza y el IIc con nueve de la naturaleza. Esta agrupación se confirmó al hacer el análisis de componentes principales y sobreponer el árbol de tendido mínimo.

Conclusiones: Los aislamientos de pacientes tienden a agrupar juntos, al igual que los de la naturaleza, y que tienen una relación geográfica que los agrupa de acuerdo a la cercanía que hay entre los municipios de donde fueron aislados. Se detectó una gran variación genética entre los aislamientos de la naturaleza.

Bibliografía

1. Espinosa-Texis A, Hernández HF, Lavalle P, Barba RJ, López MR. Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio. *Gac Méd Méx* 2001; 137:111-116.
2. Cooper CR, Breslin BJ, Dixon DM, Salkin IF. DNA typing of isolates associated with the 1988 sporotrichosis epidemic. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1631-1635.

B8. Expresión Diferencial de genes involucrados en la producción de sideróforos de *Sporothrix schenckii*

Fátima Castillo, Gerardo Castillo, Ana Yadira Ramírez, Alejandra Espinosa

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México

Sporothrix schenckii es el agente etiológico de la esporotricosis que es la micosis subcutánea más frecuente en México. *Sporothrix schenckii* en el humano encuentra los nutrientes indispensables para su crecimiento y desarrollo. Para capturar y transportar el hierro necesario para su metabolismo utiliza sideróforos que son moléculas orgánicas con gran afinidad por el hierro que facilitan el crecimiento de los microorganismos bajo condiciones limitadas de hierro. En estudios previos se obtuvieron e identificaron sideróforos producidos por *Sporothrix schenckii* en medio LIM. Estos sideróforos fueron identificados como tipo hidroxamato, con la máxima producción en la fase micelial, y mostraron un incremento en el crecimiento, sobretodo para la fase levaduriforme de este hongo.

El objetivo del presente trabajo fue detectar la expresión diferencial de genes involucrados en la producción de sideróforos de *Sporothrix schenckii*, de cepas productoras de sideróforos y cepas afectadas en la producción de estos compuestos.

Tres cepas silvestres de *Sporothrix schenckii* cuya producción de sideróforos es alta y 6 cepas mutantes con baja producción de estos compuestos fueron procesadas mediante (DDRT-PCR) Despliegue Diferencial para observar la expresión de genes involucrados en la producción de sideróforos. Para lo cual se utilizaron tres juegos de "Primers" que fueron: DD₃-OPA₁₄, DD₃-OPA₁₈ y DD₃-OPA₂₀.

Los productos de ADN se separaron en un gel de poliacrilamida, donde se detectaron bandas polimórficas que presentaron transcritos expresados diferencialmente, cuyo juego de primers con mejores resultados fue el Oligo DD₃-OPA₁₄, obteniéndose 11 bandas diferenciales 4 en 184, 4 en 208 y 3 en 400.

La técnica DDRT PCR mostró la expresión diferencial de genes involucrados en la producción de sideróforos, de cepas silvestres y mutantes afectadas en la producción de estos compuestos del hongo dimórfico *S. schenckii*.

Bibliografía:

1. Holzberg M, Artis WM. Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. *Infect Immun* 1983; 40:1134-1139.
2. Gross D, Watson K. Application of mRNA differential display to investigate gene expression in thermotolerant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998; 14:431-42.
3. Stutevant J. Applications of Differential-Display Reverse Transcription PCR to Molecular Pathogenesis and Medical Mycology. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13:408-427.

B9. Los genes AN0721.3 y AN7542.3 de *Aspergillus nidulans* participan en la síntesis de una molécula extracelular inductora de la conidiación

Oier Etxebeste¹, Aitor Garzia¹, Eduardo A. Espeso² y Unai Ugalde¹

¹Facultad de Ciencias Químicas de Donostia-San Sebastian UPV/EHU,

²www.sc.ehu.es/biochemistryII; ²Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC. Ramiro de Maeztu, 9. 28040, Madrid

Mutantes aconidiales tipo *fluffy* obtenidos mediante mutagénesis con nitrosoguanidina fueron seleccionados según su capacidad para conidir en contacto con una cepa con esporulación asexual silvestre, como inductor de la transferencia de señales extracelulares. Aparte de los ya conocidos *fluG*⁻ (1), se aislaron dos nuevas cepas mutantes capaces de donar la señal a cepas *fluG*⁻, pero requieren del contacto con la cepa silvestre para conidir.

Los genes en los que se localizan estas mutaciones han sido identificados: AN0721.3, situado en el cromosoma VIII, y AN7542.3 localizado en el cromosoma IV. Puesto que el mutante *fluG*⁻ no puede revertir el fenotipo de ausencia de conidiación de estos mutantes, se concluyó que los productos de estos genes actúan en la misma ruta y estarían situados corriente abajo del producto de *fluG*, y posiblemente ambos al mismo nivel, puesto que la sobreexpresión de AN0721.3 en el fondo genético mutante AN7542.3 no provoca su reversión fenotípica y viceversa. En resumen, los productos de AN0721.3 y AN7542.3 actuarían entre *FluG* y el regulador transcripcional que media el desarrollo del conidiforo BrIA (2).

AN0721.3 tiene una longitud de 682nt y la proteína que codifica no presenta dominio conocido alguno. AN7542.3 tiene una longitud de 1624nt. Presenta un dominio de unión al DNA similar a un "basic zipper" en una región cercana al extremo N-terminal. La presencia de este dominio indica que el producto de AN7542.3 es regulador transcripcional. Se han aislado tres alelos hipofuncionales de este gen, uno de los cuales indica que el extremo C-terminal es también indispensable para la función de este putativo regulador transcripcional de la esporulación asexual del hongo.

El trabajo futuro se centrará en el análisis de la función de estos genes que ayudará a clarificar su papel en la inducción de la conidiación.

Bibliografía:

1. Lee BN, Adams TH. The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* 1994; 8:641-651.
2. Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:35-54.

B10. Caracterización de interacciones genéticas de CRH1 y CRH2 con genes relacionados con la biogénesis de la pared celular de *S. cerevisiae*

Noelia Blanco, Cecilia Grau, Raul García, J.M. Rodríguez-Peña, César Nombela y Javier Arroyo

Dpto. Microbiología II. Fac. Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

La pared celular fúngica es una estructura que rodea la célula, la protege de las agresiones externas y es esencial para el mantenimiento de su morfología e integridad. La biogénesis de esta estructura en *S. cerevisiae* implica tanto la síntesis de sus diferentes componentes (β -1,3 glucano, β -1,6 glucano, quitina y manoproteínas), como el "crosslinking" o entrecruzamiento entre ellos para formar una estructura modular muy adaptable a las diferentes situaciones de crecimiento. Aunque se conoce poco de cómo tienen lugar estos procesos de entrecruzamiento, en nuestro laboratorio hemos caracterizado una familia de tres proteínas de *S. cerevisiae*, Crh1, Crh2 y Crr1, que parecen estar implicadas en estos procesos y más concretamente en la formación de enlaces entre quitina y glucano (Crh1 y Crh2 en ciclo vegetativo y Crr1 en esporulación).

Con el fin de buscar relaciones funcionales de estas proteínas con otras implicadas en la biogénesis de la pared celular, hemos llevado a cabo un screening de búsqueda de sintéticos letales de forma dirigida, mediante la construcción de dobles y triples mutantes de CRH2 y CRH1 con SED1, MNN9, OCH1, PST1, EXG1, MID2, PMT1, GAS1, FKS1, BGL2, CHS3, PIR3 y FKS2. La caracterización de estos mutantes en cuanto a su crecimiento tanto en ausencia como en presencia de compuestos que interfieren con la construcción de la pared celular (Rojo Congo, Zimoliasa, neomocandinas) ha permitido identificar interacciones genéticas de Crh1 y Crh2 con varios de los genes ensayados, principalmente con OCH1, MNN9, FKS1 y GAS1.

D. Diagnóstico

D1. Evaluación de una nueva técnica de PCR en tiempo real para la identificación rápida de cinco especies de *Candida*

E. Roselló, V. Rodríguez, A. Bas, A. Andreu, G. Codina
Servicio de Microbiología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España

Objetivo: Evaluar la utilidad de una nueva PCR en tiempo real en un algoritmo de identificación rápida de las especies más frecuentes del género *Candida*.

Material y métodos: Se ha implementado una técnica de PCR en tiempo real que utiliza cebadores universales fúngicos ITS3 e ITS4 que amplifican una región del gen que codifica el RNA ribosomal (parte de la región 5.8S, la ITSII y una zona de la región 28S), cinco sondas *Taqman* marcadas con diferentes fluoróforos que detectan e identifican las cinco especies de *Candida* que más frecuentemente causan patología humana: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*; y una sonda universal que detecta cualquier especie del género *Candida*. El tiempo requerido para realizar la extracción de DNA y la técnica de PCR es de 3 horas. Esta técnica se ha aplicado a las colonias levaduriformes no identificables directamente por el medio CHROMagar *Candida*, tras la siembra directa de muestras o resiembra de levaduras aisladas en otros medios. Otros sistemas de identificación (características morfológicas en *cornmeal* agar, VITEK2, API 20C AUX) han sido utilizados en los casos en que se han obtenido resultados negativos con los anteriores.

Resultados: Utilizando la técnica de PCR se han estudiado 86 cepas de levaduras en medio CHROMagar *Candida* provenientes de muestras respiratorias (61,4 %), urocultivos (10 %), hemocultivos (8,5 %), faneras (5,7 %) y otros (14,4 %). El medio cromogénico ha permitido la identificación directa del 61,6 % (47 *C. albicans* y 6 *C. tropicalis*). Durante este tiempo no se ha aislado ninguna cepa de *C. krusei*. La PCR en tiempo real, utilizando uno o varios tubos de reacción – con sondas para *C. glabrata*, *C. parapsilosis* o universal de género- en función del aspecto de la colonia, ha identificado 29 de las 33 cepas restantes (18 *C. glabrata* y 11 *C. parapsilosis*). Respecto a las otras cepas, dos fueron identificadas como *C. lipolytica* y *C. zeylanoides* por VITEK2 y una como *Saccharomyces cerevisiae* por VITEK2 y API 20C AUX. La cuarta se informó como *Candida* sp.

Conclusiones: La técnica de PCR en tiempo real evaluada, junto con el medio CHROMagar *Candida* ha permitido la identificación rápida del 95,3 % de los aislamientos de *Candida* spp. Tras las 48 horas de incubación del medio CHROMagar, la técnica de PCR permite, en 3 horas la identificación correcta de la mayoría de los aislamientos, de modo que puede ser de utilidad en un algoritmo de identificación rápida de las especies de *Candida*. Los sistemas VITEK2 y API 20C AUX, aunque requieren más tiempo, permiten la identificación de especies menos frecuentes.

D2. Detección de galactomanano: nuestra experiencia de tres años

Lourdes Roc, Marta Arias, Pilar Palacián, Antonio Rezusta, Daniel Rubio*, Elena Lomba, M^a José Revillo Pinilla
Servicio de Microbiología. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza, España

Introducción: La aspergilosis invasiva es la primera causa de infección fúngica producida por hongos filamentosos, y la segunda infección fúngica invasora. Se presenta como una complicación infecciosa frecuente y grave en los pacientes inmunodeprimidos. El diagnóstico de la aspergilosis invasiva en el enfermo neutropénico es el principal problema al que se enfrentan tanto el clínico como el microbiólogo. El antígeno del galactomanano es un polisacárido de la pared celular del *Aspergillus* que se libera durante su crecimiento, y su detección en la sección de serología permite el diagnóstico temprano de esta enfermedad.

Material y método: Durante el periodo estudiado (2003-2005) se han realizado un total de 626 determinaciones de Antígeno de galactomanano correspondientes a 219 pacientes. 150 procedían de hematología (134 adultos y 16 niños) y 69 de otras localizaciones. El sistema utilizado para la determinación del Antígeno de galactomanano es un test de ELISA de doble sandwich (Platelia *Aspergillus*®). El punto de detección es de 0,5 ng/ml. Se considera que la prueba es positiva cuando se obtienen al menos dos determinaciones consecutivas positivas. Se estudiaron los aspectos clínicos más relevantes de los pacientes con resultados compatibles de padecer aspergilosis invasiva.

Resultados: Se han obtenido 47 determinaciones positivas durante el estudio de los 3 años pertenecientes a 14 pacientes. Su procedencia eran hematología 78,58% (n=11), hematología pediátrica 14,28% (n=2) y oncología 7,14% (n=1). La edad media de los pacientes era de 46,07 años. Los diagnósticos eran LLA 28,58% (n=4), LLC 21,43% (n=3), LMA 21,43% (n=3), LH, LNH, neoplasia de pulmón y mieloma múltiple con 7,14% respectivamente (n=1). La supervivencia oscila entre los 30 días y los 14 años. En tres pacientes se ha aislado en muestras respi-

atorias el *Aspergillus* spp. En 12 de los 14 pacientes se observaron imágenes compatibles en el TAC, 11 de ellas posteriores al diagnóstico de antígeno de galactomanano positivo.

Conclusiones:

1. Las determinaciones positivas del Antígeno de galactomanano preceden a otros signos radiológicos y clínicos.
2. La mayor rentabilidad de la prueba se obtuvo en pacientes neutropénicos hematológicos.
3. En nuestro estudio, los resultados positivos no son atribuibles a falsos positivos incluso en los pacientes pediátricos.
4. Gran rentabilidad y rapidez con respecto al cultivo tradicional.
5. Necesidad de realizar determinaciones seriadas.
6. El punto de corte de 0,5 ng/ml mejora la sensibilidad sin alterar, en nuestro caso, la especificidad.

D3. Análisis de los puntos de corte del índice de galactomanano en el diagnóstico de la infección por *Aspergillus* en pacientes trasplantados en el Hospital Ramón y Cajal (2003-2005)

María Mercadillo, Ana Fernández-Olmos, Auxiliadora Molina, M^a Elena Álvarez, Aurora Sánchez- Sousa, Fernando Baquero
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. España

La determinación de galactomanano en suero se considera útil para el diagnóstico y seguimiento de la aspergilosis invasiva. El control de los niveles de galactomanano sérico es una prueba habitual en la mayoría de los protocolos de trasplantes. Establecer los puntos de corte adecuados es crítico para realizar un diagnóstico correcto.

Objetivo: La finalidad de este estudio fue determinar los puntos de corte adecuados en nuestro hospital y según las condiciones técnicas de trabajo. Se incluyeron 295 sueros de 138 pacientes trasplantados en nuestro hospital entre 2003-2005 (63 TMO, 58 trasplantes hepáticos, 13 trasplantes de pulmón, 2 trasplantes renales y 2 trasplantes intestinales). Para la cuantificación de galactomanano en suero se utilizó el test de Platelia *Aspergillus* EIA de Bio-Rad.

Resultados y discusión: El análisis de los datos nos sugirió el punto de corte a considerar. En la mayor parte de los casos se obtuvieron valores \approx a 0,5 ng/ml (moda 0,4 ng/ml) definiendo esta situación como "de muy bajo riesgo". No obstante, debe observarse que este valor corta "el brazo derecho" de una distribución aparentemente normal y, por consiguiente, unos valores ligeramente superiores a 0,5 ng/ml podrían considerarse erróneamente como positivos. Consideramos valores entre 0,5 ng/ml y 1 ng/ml como "de bajo riesgo", entre 1 ng/ml y 1,5 ng/ml como "de riesgo" (indicación para la obtención de cultivos) y $>$ de 1,5 ng/ml como "de alto riesgo". La casa Platelia afirma que sólo los valores $>$ de 1,5 ng/ml son de riesgo significativo. Nosotros creemos que los pacientes con valores 1 ng/ml-1,5 ng/ml también deben ser evaluados.

Para establecer nuestro punto de corte adecuado, se recogieron sueros de 24 pacientes sin evidencia de aspergilosis invasiva, en los cuales se detectó una variación de los niveles de galactomanano en suero. La primera determinación raramente fue $>$ 1 ng/ml (16,6%), con una moda de 0,6 ng/ml, mientras que la segunda determinación de galactomanano fue $>$ 1 ng/ml en la mayoría de los casos (79,1%) obteniéndose valores 1,1 ng/ml-3,3 ng/ml.

Estos datos sugieren que los pacientes trasplantados se encuentran expuestos, en mayor o menor medida, al antígeno de *Aspergillus*, que se refleja en el aumento de su valor en suero. Como es de suponer, la aspergilosis invasiva afecta a una minoría de este grupo de pacientes, los cuales son identificados por poseer valores de galactomanano en suero $>$ de 1 ng/ml y a los que se debe realizar un estrecho seguimiento.

El test de Platelia para determinación de galactomanano en suero es una prueba fiable para el seguimiento del paciente trasplantado. En nuestro hospital consideramos un punto de corte de 1 ng/ml para definir una situación de riesgo por exposición a antígeno de *Aspergillus*, debiendo realizar un estrecho seguimiento de estos pacientes ante la posibilidad de desarrollo de una aspergilosis invasiva.

D4. Utilidad de la detección de anticuerpos anti-enolasa en el diagnóstico de la candidiasis invasora

Ana Laín¹, M^a Dolores Moragues², Juan Carlos García Ruiz³, Joaquín Mendoza⁴, Ana Camacho⁴, Amalia del Palacio⁵, José Pontón¹
¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco, Bilbao;
²Departamento de Enfermería I. Universidad del País Vasco, Bilbao;
³Servicio de Hematología, Hospital de Cruces, Baracaldo, Vizcaya;
⁴Laboratorios Vircell SL, Granada;
⁵Servicio de Microbiología, Unidad de Micología, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid. España

La candidiasis invasora es la manifestación clínica más severa de las infecciones por *Candida* spp. Sin embargo, el diagnóstico de la candidiasis invasora resulta complicado debido fundamentalmente a la ausencia de síntomas clínicos específicos y de métodos diagnósticos definitivos

por lo que, en los últimos años, numerosas investigaciones se han centrado en este campo. La detección de anticuerpos contra diversos antígenos de *Candida* ha sido ampliamente estudiada, habiéndose desarrollado métodos basados en la detección de anticuerpos contra la fase micelial de *C. albicans* de utilidad para el diagnóstico de esta enfermedad (1). En este trabajo evaluamos la utilidad diagnóstica de una nueva técnica (*Candida* Enolasa ELISA IgG) desarrollada por Laboratorios Vircell S.L. (Santa Fe, Granada, España), basada en la detección de anticuerpos contra la enolasa de *C. albicans* (2), antígeno inmunodominante, presente en el citoplasma y la pared *C. albicans*, tanto en su fase levaduriforme como en su fase micelial. La detección de anticuerpos contra este antígeno ha sido evaluada previamente por diversos grupos como posible candidato a emplear en el serodiagnóstico de la candidiasis invasora, con resultados prometedores (3, 4).

La prueba consiste en un ensayo ELISA típico, que se desarrolló siguiendo las instrucciones del fabricante, y con los reactivos suministrados por el mismo. Se ensayaron sueros de 36 pacientes con candidiasis invasora producida por diferentes especies de *Candida* (grupo I), y sueros de 45 pacientes control, sin evidencia de infección por *Candida* (grupo II). Dentro del grupo I, 29/36 pacientes fueron positivos. Los 7 pacientes falsos negativos presentaban infección por *C. albicans* (4), *C. parapsilosis* (2) y *C. tropicalis* (1). En cuanto al grupo II o control, se obtuvieron 8/45 falsos positivos, resultando el resto de pacientes negativos. Con estos resultados se calcularon los siguientes valores para la prueba diagnóstica: Sensibilidad = 80,6 %, Especificidad = 82,2 %, Valor Predictivo Positivo = 78,4 %, Valor Predictivo Negativo = 84,1 % y Eficacia = 81,5 %. Los resultados de este estudio, indican que la detección de anticuerpos anti-enolasa de *C. albicans* por ELISA es útil para el diagnóstico serológico de la candidiasis invasora.

Referencias:

- Moragues MD et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:83-88.
- Mason AB et al. *J Bacteriol* 1993; 175:2632-2639.
- Lain A et al. The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) Paris, 2006.
- Mitsutake K et al. *J Clin Lab Anal* 1994; 8:207-210.

D5. Infecciones micóticas broncopulmonares. Diagnóstico y asociaciones

M. Celina Vedota, Martha G. Medvedeff, Beda E. Mereles, Miriam E. Chade, Ernesto Velásquez, Ana Thea¹, Luciana Muntaner
 Departamento Microbiología, Cátedra Micología. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Posadas. (3300) Misiones. Argentina

Las infecciones micóticas broncopulmonares constituyen un capítulo de la patología humana. Las mismas pueden ser causadas por hongos patógenos primarios y por hongos oportunistas. El diagnóstico diferencial de las micosis del aparato respiratorio debe hacerse con todas las broncopneumopatías y particularmente con la tuberculosis, ya que la clínica por sí sola es insuficiente para la diferenciación de estos cuadros nosológicos. El objetivo de este trabajo es determinar la frecuencia de especies fúngicas involucradas en infecciones del tracto respiratorio y valorar el grado de asociación de las micosis por éstas producidas con la tuberculosis. Para realizar los estudios micológicos de laboratorio se utilizaron procedimientos clásicos de diagnóstico microbiológico y métodos diagnósticos independientes al cultivo.

En este estudio, se incluyeron pacientes con cuadros respiratorios compatibles con tuberculosis, ambulatorios e internados, de 15 a 85 años de edad de ambos sexos; de la provincia de Misiones (Argentina) y zonas limítrofes. En el momento de la recolección de la muestra se registraron los siguientes datos epidemiológicos: edad, sexo, área endémica que visitó o habitó, enfermedad de base y otros factores de riesgo asociados a enfermedades fúngicas.

Sobre un total de 644 pacientes durante el período enero 2001-diciembre 2005, se diagnosticaron 37 casos de micosis sistémicas (22 *Paracoccidioides brasiliensis*, 9 *Aspergillus fumigatus*, 1 *Aspergillus flavus* y 5 *Histoplasma capsulatum*). Del total antes mencionado, se estudiaron 355 pacientes en forma conjunta con el laboratorio de tuberculosis del Hospital Provincial "Ramón Madariaga". En 5 casos se detectó la coexistencia de tuberculosis con aspergilosis, en 2 casos con paracoccidioidomycosis; y en 2 casos con histoplasmosis; lo que representa un 24% de asociación micosis-tuberculosis.

El diagnóstico de las micosis broncopulmonares no es posible sin las investigaciones de laboratorio. Los antecedentes del enfermo, la ocupación, el medio en que vive, el examen somático y radiológico, permiten a veces orientar un diagnóstico. De todas maneras sólo sería un diagnóstico clínico-radiológico de presunción; que debería ser confirmado por el laboratorio. Además ante las asociaciones encontradas, sería conveniente el estudio sistemático en la búsqueda de micosis y tuberculosis, en aquellos pacientes con compromiso pulmonar. El no hacerlo disminuiría la posibilidad de un diagnóstico diferencial o impediría el descubrimiento de estas asociaciones morbosas.

D6. Bichro-Dubli Fumouze® permite la identificación rápida de *Candida dubliniensis*

Ismail H. Sahand¹, Rebeca Ortiz², Javier Pemán², M^o Dolores Moragues³, Guillermo Quindós¹, José Pontón¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco, Bilbao; ²Unidad de Micología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia; ³Departamento de Enfermería I. Universidad del País Vasco, Bilbao, España

La diferenciación entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* es difícil ya que ambas especies son muy parecidas y hasta hace pocos años los aislamientos de *C. dubliniensis* se confundían con los de *C. albicans*. La diferenciación entre ambas especies es importante con fines epidemiológicos y terapéuticos. Esta diferenciación se realiza habitualmente mediante pruebas fenotípicas que incluyen la capacidad para crecer a 42-45 °C, el color de las colonias en medios cromogénicos, la producción de clamidosporas en diferentes medios, el perfil de asimilación de carbohidratos y la reactividad con un suero anti-*C. dubliniensis*. Sin embargo, las técnicas moleculares siguen siendo el método más fiable para la identificación de *C. dubliniensis*, aunque por su sofisticación, no están al alcance de todos los laboratorios.

En este trabajo se ha estudiado la utilidad de la prueba de aglutinación de partículas de látex Bichro-Dubli Fumouze® (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, France) para la identificación de 46 cepas de referencia de *C. dubliniensis* y 4 cepas de *C. albicans* cultivadas en agar glucosado de Sabouraud, así como para la identificación de *C. dubliniensis* en cultivos primarios realizados en CHROMagar *Candida*. La prueba fue positiva en 45 de las 46 cepas de *C. dubliniensis* de referencia (sensibilidad 97,8%) y negativa en las 4 cepas de *C. albicans* de referencia (especificidad 100,0%). Los cuatro genotipos de *C. dubliniensis* fueron positivos con la prueba, aunque la aglutinación de las cepas del genotipo 4 era más lenta. La prueba identificó 4 aislamientos de *C. dubliniensis* en las 135 muestras clínicas que dieron colonias verdes en CHROMagar *Candida*. Sin embargo, esta identificación no hubiera sido posible por el color de las colonias, ya que los 4 aislamientos de *C. dubliniensis*, obtenidos en un lavado broncoalveolar, un esputo y dos frotis orales, dieron lugar a colonias de color verde que eran indistinguibles de las producidas por *C. albicans*. Los resultados obtenidos son similares a los presentados en otras evaluaciones de la prueba y demuestran que Bichro-Dubli Fumouze® es una prueba sencilla que permite la diferenciación rápida entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* aisladas tanto en agar glucosado de Sabouraud como en CHROMagar *Candida*.

D7. Identificación rápida de aislamientos clínicos de *Candida guilliermondii* por PCR

Olatz Albaina, Elena Eraso y Guillermo Quindós
 Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao

Antecedentes: La identificación de *Candida guilliermondii* por métodos convencionales (morfológicos, bioquímicos y fisiológicos) es laboriosa y se pueden obtener resultados confusos, ya que su perfil bioquímico es similar al de otras especies de *Candida*, como *Candida famata*.

Objetivo: Evaluar la utilidad de la amplificación por PCR como técnica rápida para la identificación de *C. guilliermondii*.

Materiales y métodos: Se han estudiado 55 aislamientos clínicos de *C. guilliermondii* y la cepa de colección NCPF 3099. Las muestras se sembraron en el medio cromógeno *Candida* ID2 (bioMérieux, Francia) y fueron identificadas por asimilación de fuentes de carbono con galerías ID 32 C (bioMérieux) y por PCR. Para realizar la amplificación se emplearon dos iniciadores específicos para *C. guilliermondii*: CGLF41 (CCC AAA ATC ACA AAG CTC AAG T) y CGLR61 (TAC GAC TTG AAG TTG CGA ATT G) (Genotek-Bonsai Tech., España) en el gen que codifica para la topoisomerasa II. La amplificación se llevó a cabo sin extracción de ADN, por homogeneizado de una colonia en la mezcla de reacción. Después de una desnaturalización inicial (96 °C, 5 min), se realizaron 35 ciclos de 96 °C, 30 s; 58 °C, 15 s; 72 °C, 30 s, seguidos de una extensión de 5 min a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de baja EEO al 1,5% de los amplificadores obtenidos. Para la lectura se empleó el sistema Chemidoc-Quantity One (Bio-Rad, EE.UU.).

Resultados: Todos los aislamientos formaron colonias brillantes, cremosas y de color rosa claro en el medio *Candida* ID2. Por ID 32 C, tras 48 h de incubación 54 aislamientos (98,2%) fueron identificados como *C. guilliermondii* con porcentajes de confianza entre el 82,9% y 99,6%. En el 75,9% de ellos se obtuvo buena identificación, muy buena identificación de género en el 7,4%, con *C. famata* como segunda opción (porcentaje de confianza entre 10% y 16,9%) y débil discriminación en el 18,5% de los aislamientos, con *Debaryomyces polymorphus* y *C. famata* como segunda opción (porcentajes de confianza entre 3,8% y 9,8%). Sólo uno de los aislamientos (1,8%) fue identificado erróneamente como *C. famata* (85,5%) con débil discriminación y *Debaryomyces polymorphus* como segunda opción (9,8%). Por PCR se obtuvieron amplificadores de todos los aislamientos estudiados con la longitud esperada de aproxi-

madamente 205 pb. Este método de PCR permite confirmar en 3 h la identidad como *C. guilliermondii* de las colonias que desarrollan un color rosa en Candida ID2. Esta identificación molecular permite también solventar las dudas ocasionales sobre la identificación de los aislamientos con el método ID 32 C.

Conclusión: La identificación de *C. guilliermondii* mediante PCR es un método sencillo y eficaz, obteniéndose el resultado en un tiempo mucho más reducido que con las pruebas habituales de asimilación de azúcares.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PI030662/2003 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

D8. Dianas génicas para detectar *Aspergillus fumigatus*

Aitor Rementería¹, Nuria López-Molina², Fernando Lopitz-Otsoa², Alfredo Ludwig², Jonathan Cabezas-Olcoz¹, Mireia Nuñez-Zofio¹, María Jesús Sevilla¹, Joseba Bikandi², Jose Pontón³ y Javier Garaizar²
Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología, ¹F. Ciencia y Tecnología, ²F. Farmacia, ³F. Medicina, Universidad País Vasco, Leioa, España.

Introducción: *Aspergillus fumigatus* origina infecciones invasoras mortales en pacientes inmunodeprimidos. Su mortalidad se debe a su virulencia y al retraso en su diagnóstico. Dado que es un patógeno oportunista, el estudio de su virulencia y su aplicación al diagnóstico es complicado.

Objetivo: Seleccionar genes de virulencia de *A. fumigatus* útiles para su detección mediante sistemas de PCR e hibridación.

Material y métodos: Se diseñaron iniciadores para amplificar 29 genes de virulencia de *A. fumigatus* originando fragmentos específicos seleccionados mediante análisis BLAST. Se estudió la presencia de dichas secuencias génicas específicas mediante PCR y con un sistema de microarray de DNA de baja densidad. Como población de estudio se utilizó una colección de 4 cepas de *A. fumigatus* (CECT 2071, Af293, CECT 4071, cepa de colección propia) y 14 cepas de otras especies de *Aspergillus*, de otros hongos filamentosos y de levaduras.

Resultados: Todas las secuencias génicas se detectaron mediante PCR en las cepas de *A. fumigatus*. Con esta técnica, 16 de los genes no son detectados en el resto de microorganismos, salvo en *A. versicolor*. En esta especie, la técnica de PCR detecta amplificadas del mismo tamaño que el esperado en *A. fumigatus* en todos los casos. Para confirmar la presencia de los genes en las distintas especies se utilizó un microarray de baja densidad generado con los fragmentos específicos de los genes de *A. fumigatus*. Los genomas de las especies marcados con Cy5 se hibridaron de forma competitiva con el genoma de *A. fumigatus* CECT 2071 marcados con Cy3. Todos los genes se detectaron en *A. fumigatus* y se demostró que a pesar de que no se obtengan amplificadas mediante PCR, las especies de *A. flavus* y *A. niger* comparten con *A. fumigatus* una alta proporción de fragmentos: 20 y 19 genes "presentes" (+) respectivamente y algunos más "posibles" (±). En *A. versicolor*, 12 de los genes estudiados no se detectaron mediante hibridación competitiva, aunque si fueron detectados mediante PCR. *A. terreus* mostró la mayor divergencia dentro de las especies de *Aspergillus* (solo 4 genes presentes (+) y 5 posibles (±)). *Candida albicans* mostró 4 genes presentes (+) y 6 posibles (±), y otras especies mostraron mucha mayor divergencia con *A. fumigatus*. Tampoco se detectó mediante hibridación competitiva el gen *plb1* salvo en *A. flavus* aunque mediante PCR se detectó en todas las especies estudiadas excepto en *Penicillium notatum*.

Conclusiones: De los genes estudiados, 12 genes no presentes en *A. versicolor* podrían ser los candidatos en un sistema de diagnóstico mediante PCR e hibridación posterior. Este estudio preliminar indica la necesidad de seleccionar un panel mayor de genes específicos de *A. fumigatus* y un estudio en profundidad de su utilidad en la detección y diagnóstico de la infección por este hongo

D9. Nuevos candidatos para el diagnóstico, pronóstico, prevención y tratamiento de las candidiasis sistémicas

Aida Pitarch¹, Antonio Jiménez², César Nombela¹, Concha Gil¹.
¹Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid; ²Departamento de Medicina Interna II, Hospital Universitario, Salamanca, España.

El diagnóstico de las candidiasis sistémicas es extremadamente difícil debido a la falta tanto de signos y síntomas clínicos como de pruebas diagnósticas rápidas y precisas. Como resultado, el diagnóstico de estas infecciones es frecuentemente alcanzado después de un largo retraso, dando lugar a una elevada mortalidad y morbilidad. Este panorama clínico ha promovido la búsqueda de nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico, o en su lugar, de estrategias inmunoprolifáticas. Dada la privilegiada localización de las proteínas de la pared celular de *Candida* (en el punto de contacto entre el hongo y el hospedador), algunas de ellas podrían desencadenar una respuesta inmune específica y ser usadas, ellas o sus anticuerpos relacionados, para estos fines.

En este trabajo, nosotros utilizamos una aproximación proteómica acoplada a análisis bioinformáticos para decodificar la respuesta serológica

frente al inmunoma de la pared celular de *Candida* en pacientes con candidiasis sistémicas (1). Los niveles séricos de anticuerpos IgG frente a proteínas asociadas a la pared (proteínas secretadas de protoplastos en regeneración activa de la pared celular, separadas mediante electroforesis bidimensional, e identificadas mediante espectrometría de masas) se midieron mediante Western blotting en 45 pacientes con candidiasis sistémicas y 118 controles.

Análisis de conglomerados bidimensional y del componente principal de las huellas séricas de los diferentes grupos de pacientes discriminaron casos de controles con una buena precisión. Modelos de regresión logística multivariante demostraron que tanto altos niveles de anticuerpos frente a una beta-1,3-transglucosidasa (Bgl2p) como la seropositividad de anticuerpos frente a la fosfoglicerato quinasa eran los únicos indicadores independientes de candidiasis sistémicas. Análisis de la curva característica de operaciones del receptor (COR) revelaron la ausencia de diferencias entre su evaluación combinada y la medida única de los anticuerpos frente a Bgl2p. En un modelo de regresión logística ajustado a conocidos factores de mortalidad, pacientes con candidiasis sistémicas con altos niveles de anticuerpos frente a Bgl2p o un estatus seropositivo de anticuerpos frente a la enolasa de pared tuvieron un riesgo reducido de mortalidad. Después de controlar ambos marcadores entre sí, solamente la seropositividad de anticuerpos frente a la enolasa de pared fue un marcador independiente de un riesgo disminuido de fatalidad, soportando que estos anticuerpos eran los que mediaban el efecto protector.

Nosotros concluimos que anticuerpos frente a Bgl2p son un nuevo marcador de diagnóstico preciso para las candidiasis sistémicas, y que a altos niveles, pueden proporcionar protección mediante la modulación de la respuesta de anticuerpos frente a la enolasa de pared. Además, anticuerpos frente a la enolasa de pared son un nuevo indicador de pronóstico para las candidiasis sistémicas y confieren protección frente a ellas. Bgl2p y enolasa asociada a la pared celular de *Candida* podrían ser valiosos candidatos para el desarrollo de una futura vacuna y/o posibles dianas para venideras inmunoterapias.

Referencias:

1. A. Pitarch, A. Jiménez, C. Nombela and C. Gil. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. Mol. Cell Proteomics, 2006; 5: 79-96.

D10. Identificación por PCR múltiple de aislamientos clínicos de siete especies del género *Candida*

Elena Eraso¹, María Villar-Vidal¹, Ismail Sahand¹, Cristina Marcos¹, Olatz Albaina¹, Miriam Alkorta², José Luis Hernández-Almaraz² y Guillermo Quindós¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao;

²Servicio de Microbiología, Hospital de Cruces, Barakaldo

Antecedentes: Aunque la mayoría de las candidiasis están producidas por *Candida albicans*, cada vez es más frecuente el aislamiento de otras especies en las muestras clínicas. Debido a su diferente sensibilidad a los antifúngicos es necesaria la identificación de especie de estos aislamientos clínicos para la elección de un tratamiento antifúngico adecuado. La identificación con los métodos convencionales es laboriosa y, en ocasiones, se obtienen resultados confusos.

Objetivo: Evaluar la utilidad de la amplificación por PCR como técnica rápida de identificación de siete de las especies más frecuentes del género *Candida* a partir de colonias aisladas en un medio cromógeno.

Materiales y métodos: Se han estudiado 70 aislamientos clínicos de las especies *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* y *Candida dubliniensis* que habían sido aislados en el medio cromógeno Candida ID2 (bioMérieux, Francia) e identificados por métodos micológicos convencionales y asimilación de fuentes de carbono con galerías ID 32 C (bioMérieux). Para realizar la PCR múltiple se emplearon iniciadores específicos de cada especie que amplificaban los genes ITS1 e ITS2 del ARNr o el gen de la topoisomerasa II. La amplificación se llevó a cabo sin extracción de ADN, por homogeneizado de una colonia en la mezcla de reacción. Después de una desnaturalización inicial (96 °C, 5 min), se realizaron 35 ciclos de 96 °C, 30 s; 58 °C, 15 s; 72 °C, 30 s, seguidos de una extensión de 5 min a 72 °C. Se realizó una electroforesis de los amplificadas obtenidos y la lectura se realizó con el sistema Chemidoc-Quantity One (Bio-Rad, EE.UU.). Además de ello, para la identificación de *C. albicans* se ensayó la amplificación por PCR a tiempo real en el 7300 RT PCR System (Applied Biosystems, EE.UU.) con sonda TaqMan y por amplificación del gen ITS1 e ITS2 del ARNr con SYBR® Green.

Resultados: Por PCR se obtuvieron amplificadas de la longitud esperada para cada especie de todos los aislamientos clínicos. Este método permitió confirmar en 3 h la identidad de las colonias aisladas. Además, la identificación molecular permitió solventar las dudas que aparecían ocasionalmente con el método ID 32 C sobre la identificación algunos de los aislamientos. En los dos ensayos por PCR a tiempo real se obtuvo una amplificación con ADN extraído de los aislamientos de *C. albicans*, pero no a partir de la colonia directamente, con el consiguiente incremento del tiempo y del coste de la identificación.

Conclusión: La identificación de diferentes especies del género *Candida* mediante PCR es un método rápido, sencillo (ya que no necesita extracción de ADN), eficaz y reproducible.

Agradecimientos: Trabajo financiado por los proyectos PI030662/2003 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

D11. Diagnóstico molecular de Queratitis cristalina por *Candida parapsilosis*

Consuelo Ferrer¹, Francisca Colom², Jorge L. Alió¹

¹Dept. I+D+i, Vissum, Instituto Oftalmológico de Alicante; ²Dept. Micología, Facultad Medicina, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España

Introducción: El diagnóstico de la queratitis cristalina esta basada principalmente en la historia clínica del paciente, valorando si presentaba algún defecto epitelial, cirugía previa, uso de corticoesteroides tópicos y la apariencia clínica de la lesión. Sin embargo para asegurar el diagnóstico es necesario la confirmación mediante estudios microbiológicos. Esta información es útil además para poder aplicar el tratamiento adecuado. El problema reside en que la mayoría de los cultivos son negativos debido a que los microorganismos se encuentran encapsulados. Esto deja al oftalmólogo teniendo que decidir sobre la terapia basándose en la sospecha clínica. La PCR, al ser una técnica independiente del cultivo puede ayudarnos a diagnosticar la QCI y así resolver el fallo del cultivo.

Caso clínico: Un paciente varón de 63 años desarrollo una endoftalmitis fúngica por *Candida parapsilosis* en su ojo derecho después de someterse a una cirugía de cataratas. Después de 10 meses con tratamiento antifúngico (200 mg fluconazol oral /12 h) intermitente debido a varias recaídas, al paciente se le explantó la lente. Un año después del explante, apareció una lesión blanquecina periférica adyacente a la incisión corneal realizada durante la faco. El infiltrado era de color blanco crema, con opacidades sin evidencia de células inflamatorias. Se realizó una biopsia corneal mediante un flap con doble lamela y se estudió mediante cultivo, tinción y PCR. Tanto el cultivo como la tinción fueron negativos, mientras que la PCR fue positiva revelando su secuencia dos tipos de microorganismos implicados en la patología: *Candida parapsilosis* y *Staphylococcus aureus*. Fue necesaria una segunda biopsia para que tanto el cultivo como las tinciones fueran positivos. El paciente empezó el tratamiento con 1 % anfotericina B tópica cada 4 horas.

Conclusión: PCR y la secuenciación del DNA se presentan como un método muy útil para la detección y la identificación de patógenos oculares implicados en queratitis cristalina infecciosa. Este es el primer caso de queratitis cristalina tras cirugía de cataratas.

D12. Valoración de los marcadores indirectos de infección fúngica invasora pulmonar (IFI) en una enferma oncológica con aspergilosis pulmonar (AI) probada

Almudena Alhambra¹, Juan-Marcos Moreno², Angel del Palacio-Pérez-Medel³, Ilargi Miranda³, María Dolores Moragues⁴, José Pontón³, Amalia del Palacio¹
¹Servicios de ¹Micobiología, ²Unidad de Micología y ³Medicina Interna, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, España.
⁴Departamentos de ⁴Enfermería I e ³Inmunología, ¹Micobiología y ¹Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

La prueba diagnóstica patrón (*gold Standard*) para establecer de forma fehaciente el diagnóstico de IFI probada es la obtención de tejidos profundos (biopsias) en los que asiente la infección, realizando estudio combinado histológico (visión directa) y micológico (cultivo). Ocasionalmente, incluso habiendo obtenido biopsias puede interpretarse erróneamente la histología, lo que lleva a dudar del diagnóstico etiológico y de la actitud terapéutica.

El 27 de abril de 2006 recibimos en microbiología una biopsia pulmonar guiada radiológicamente de un nódulo pulmonar cavitado (lóbulo medio) y BAL de una enferma de 65 años con adenocarcinoma metastático de origen desconocido (probablemente mama) con afectación de las vértebras dorsolumbares y fractura-aplastamiento de L3 con compromiso del canal raquídeo. La enferma había ingresado en nuestro hospital en febrero 2006, padecía además *diabetes mellitus* tipo II en tratamiento con antidiabéticos orales con hiperglicemias descompensadas elevadas (en torno a 400 mg). Desde su ingreso la enferma había sido tratada con 4 mg/8 horas de dexametasona debido a la compresión medular, habiéndose realizado una reducción progresiva de los esteroides hasta alcanzar 0.5mg/12horas en la fecha en que fue remitida la biopsia a microbiología. En el BAL y en la biopsia pulmonar se cultivó *Aspergillus fumigatus* por lo que fue iniciado tratamiento con voriconazol y caspofungina intravenosos. El anatomopatólogo informó que en la biopsia pulmonar se observaban micelios tabicados (compatibles con *A. fumigatus*) y posiblemente otros micelios sin tabicar, razón por la que se cambió el tratamiento a anfotericina liposómica. Los galactomananos en sangre (GM) (uno pre-

tratamiento y otros dos extraídos a la semana y once días en el curso del tratamiento) tenían un índice negativo (0.297, 0.199 y 0.266 respectivamente). Los valores correspondientes al betaglucono (BG) fueron 461.88, >518 y >518 pg/ml respectivamente. Al conocerse el nivel del primer BG se reinstauró el tratamiento con voriconazol y caspofungina ya que el BG es un marcador panfúngico que no detecta las IFI producidas por zigomicetos ni por *Cryptococcus* spp.

La tinción con inmunohistoquímica (realizada posteriormente) de la biopsia pulmonar demostró que todos los micelios de la misma correspondían a *A. fumigatus*.

Aunque el GM ha supuesto en enfermos oncohematológicos un avance en el diagnóstico de AI, en otras poblaciones como el caso aquí presentado, su utilidad está sin definir ni validar. Es posible que el BG en poblaciones no neutropénicas sea más sensible que el GM para detectar AI aunque esta afirmación es prematura ya que con un solo caso como el discutido no se puede sustentar ni sacar afirmaciones generales. La utilización conjunta de los marcadores permite compensar las deficiencias diagnósticas de un marcador aislado.

D13. Utilidad de los marcadores serológicos en el diagnóstico de la infección fúngica invasora pulmonar (IFI) mixta en pacientes oncohematológicos adultos

Almudena Alhambra¹, Juan-Marcos Moreno², María Soledad Cuétara³, Ilargi Miranda⁴, Cruz Ortiz⁵, María Dolores Moragues⁶, José Pontón¹, Amalia del Palacio¹

¹Servicios de ¹Micobiología, ²Medicina Interna y ³Hematología, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid; ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid; ⁵Departamentos de ⁴Enfermería I e ⁴Inmunología, ¹Micobiología y ¹Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao

Las IFI mixtas (causadas por más de una especie fúngica) son comunicadas en la literatura médica con muy poca frecuencia, apoyándose en biopsias y estudios necrópsicos. En este trabajo describimos la utilidad de tres marcadores serológicos (galactomanano [GM], 1-3 β-glucono [BG] y anticuerpos anti-micelio [AcM]) en el diagnóstico de la IFI mixta en cuatro pacientes oncohematológicos adultos.

Caso nº	Edad/sexo/ E base	Riesgo ^a	Colonización	IFI
1 ^b	32/V/LLA	Alto	Intensa por <i>C. albicans</i>	AI probable
2 ^b	64/V/LLC	Alto		Zigomicosis probada
3 ^b	67/V/ Hodgkin	Inter. Alto	Intensa por <i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	AI probada
4 ^b	37/V/LLA	Alto		AI y CI probadas

^aPrentice. Br J Haematol 2000; 110: 273-284. ^bExitus

En el paciente 1 se detectaron 3 sueros con GM positivos (0.530, 0.543 y 0.626), 17 sueros con AcM >160 y 11 sueros con BG positivos. En el paciente 2 se detectó 1 suero con GM positivo (0.788), 10 sueros con AcM >160 y 4 sueros con BG positivos. En el paciente 3 se detectaron 2 sueros con GM positivo (2,831 y 1,326), 9 sueros con AcM >160 y 2 sueros con BG positivos. En el paciente 4 se demostró *A. fumigatus* y *C. albicans* en la autopsia (pulmón, hígado y bazo) y se detectaron 1 suero con GM positivo (0.543), 7 sueros con AcM >160 y 6 sueros con BG positivos. Basándonos en GM, biopsias y estudios necrópsicos la tabla refleja las IFI probables y probadas.

El hecho de tener intensa mucositis (enfermos 1 y 2) e intensa colonización por *C. albicans* (enfermo 1) y *C. tropicalis* (enfermo 3), con AcM y BG positivos nos hace pensar que también tendrían una CI asociada, siendo posible además que el paciente 2 tuviera una AI (con un GM estático debido a la intensa medicación antifúngica). En el paciente 4 la positividad del AcM se correlaciona con su CI probada.

Estos datos demuestran la complejidad del diagnóstico de IFI en el paciente neutropénico, sugiriendo que AcM puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de CI, aunque actualmente todavía no esté reconocido como criterio microbiológico por la EORTC y el MSG.

D14. Aislamiento de *Aspergillus lentulus* en un enfermo crítico con EPOC y aspergilosis invasora

Almudena Alhambra¹, Juan-Marcos Moreno², María Dolores Moragues³, Sonia Brena⁴, Guillermo Quindós⁴, José Pontón⁴, Amalia del Palacio¹
¹Servicio de Microbiología, Unidad de Micología, y ²Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid; ³Departamento de Enfermería I, y ⁴Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

Durante muchos años los micólogos clínicos han considerado que *Aspergillus fumigatus* tenía una variante fenotípicamente distinta caracterizada macroscópicamente por ser de color blanco y esporular muy lentamente en los distintos medios de cultivo. Recientemente Balajee *et al.* (Eukayot Cell 2005; 4:625-632) mediante análisis filogenético con biología molecular han demostrado que estas variantes corresponden a *Aspergillus lentulus sp. nov* que no crece a 48°C (a diferencia de *A. fumigatus*) siendo resistente *in vitro* a todos los antifúngicos.

Presentamos el aislamiento de *A. lentulus* en las secreciones bronquiales de un enfermo crítico de 67 años de edad, ex-fumador y con EPOC corticodependiente de 8 años de evolución, diabetes mellitus tipo II, osteoporosis generalizada con acúñamientos vertebrales (D11, D12, L2, L3 y L4) que había necesitado un ingreso hospitalario dos años antes por agudización de su EPOC. Ingresó en nuestro hospital en abril de 2006 por agudización de su proceso y 15 días más tarde tuvo que ser trasladado a la UCI polivalente por varios episodios de broncoespasmo grave y fibrilación auricular rápida con evolución a insuficiencia respiratoria y cardíaca graves, presentado en placa de tórax infiltrados intersticiales bilaterales con predominio en bases pulmonares.

El paciente estuvo ingresado en UCI 17 días y falleció por insuficiencia respiratoria y cardíaca graves con disfunción multiorgánica. Inicialmente en UCI fue tratado ventiloterapia mecánica no invasora seguida a los 5 días de su ingreso por instauración de ventiloterapia invasora con intubación traqueal que fue mantenida durante su estancia en UCI. En los días 13 y 16 de estancia en UCI se obtuvieron cultivos puros y masivos de *A. fumigatus* instaurándose tratamiento con voriconazol. Los sueros de los días 16 y 17 fueron negativos para GM y ambos con concentraciones elevadas para betaglucano (>518 pg/ml). En el cultivo de secreciones traqueales del día 17 de estancia en UCI se obtuvieron colonias características de *A. fumigatus* y de un hongo filamentoso de color blanco, que no crecía por encima de 45°C. La secuenciación de fragmentos de los genes β -tubulina y rodlet A y su comparación con las secuencias depositadas en el GenBank permitió su identificación como *A. lentulus*. La sensibilidad a antifúngicos del aislamiento se estudió de forma preliminar con el E-test, mostrando las siguientes MICs para caspofungina (>32 μ g/ml), AmB (>8 μ g/ml), itraconazol (>3 μ g/ml) y voriconazol (>1,5 μ g/ml). El aislamiento de *A. lentulus* en este paciente pudo haber sido seleccionado por el tratamiento antifúngico instaurado para *A. fumigatus*. La baja incidencia de las infecciones por *A. lentulus* podría deberse a su identificación como *A. fumigatus*. Sin embargo, la correcta identificación de este hongo es necesaria por su alta resistencia a los antifúngicos.

D15. Colonización pulmonar por *Neosartorya udagawae* en un paciente trasplantado de pulmón

María Dolores Moragues¹, Sonia Brena², Ilargi Miranda², Rosalía Laporta³, María Muñoz⁴, José Pontón², Amalia del Palacio⁵
¹Departamento de Enfermería I, y ²Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao; ³Servicio de Neumología, y ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Puerta de Hierro, Madrid; ⁵Servicio de Microbiología, Unidad de Micología, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, España

Existen muy pocos casos descritos de infección por *Neosartorya* spp. Dada la similitud fenotípica de las formas anamórficas de *Neosartorya* con *Aspergillus fumigatus*, es posible que las infecciones por *Neosartorya* se confundan con las producidas por *A. fumigatus*, y por tanto que la incidencia de las infecciones por *Neosartorya* spp. sea mucho mayor. En esta comunicación se describe la colonización pulmonar por *Neosartorya udagawae* en un varón de 59 años de edad sometido a trasplante pulmonar unilateral derecho por fibrosis pulmonar 12 años antes. Como antecedentes de interés, el paciente presentó hipertensión arterial, síndrome de apnea obstructiva del sueño tratada con presión positiva continua de la vía aérea, insuficiencia renal crónica, rechazo agudo a los dos meses del trasplante que precisó tratamiento con OKT3 y posteriormente rechazo crónico con bronquiolititis obliterante evolutiva. Se diagnosticaron múltiples infecciones por CMV que fueron tratadas con Ganciclovir y Foscarnet, y se observó colonización permanente por *Aspergillus* sp. que fue tratada con Abelcet i.v. y con Sporanox 400 mg/24 h, no volviéndose a aislar el hongo.

El paciente ingresó en febrero de 2006 por un proceso de infección respiratoria recurrente que mejoró tras antibioterapia. En el TAC se observaron signos de bronquiolititis en el pulmón trasplantado y de fibrosis pulmonar en el pulmón nativo sin cambios respecto a placas previas. El

control analítico y niveles de tacrolimus y nicofenolato se encontraban en el rango terapéutico. En la broncoscopia se observó un árbol bronquial normal sin secreciones y sutura en buen estado. En los cultivos del BAS y LBA se aísla un hongo filamentoso de color blanco que presenta zonas de la colonia de color verde. En la zona blanca se observa únicamente micelio tabicado y en la verde conidióforos similares a los producidos por *Aspergillus*. La observación microscópica también permitió la observación de cuerpos fructíferos y ascosporas de morfología lenticular. El hongo creció bien a 37 °C pero no creció a 45 ni a 48 °C. La secuenciación de fragmentos de los genes β -tubulina y rodlet A y la comparación de las secuencias con las depositadas en el GenBank, permitió su identificación como *Neosartorya udagawae*. La sensibilidad del aislamiento se estudió de forma preliminar con el E-test, mostrando las siguientes MICs para AmB y caspofungina (>32 μ g/ml), itraconazol (>6 μ g/ml), y al voriconazol (>3 μ g/ml), que son superiores a las mostradas por otras cepas de *N. udagawae*. Hasta el momento no se ha descrito la colonización o la infección humana por *N. udagawae*. Sin embargo, la identificación de este nuevo patógeno tiene importancia clínica ya que su sensibilidad a los antifúngicos es mucho menor que la presentada por *Aspergillus* spp.

D16. Utilidad del medio CHROM-Pal para el aislamiento primario de levaduras de la cavidad oral

Ismail H. Sahand¹, José L. Maza², José M. Aguirre², Elena Eraso¹, María D. Moragues³, Guillermo Quindós¹, José Pontón¹
¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, y ²Departamento de Estomatología, Facultad de Medicina y Odontología, y ³Departamento de Enfermería I, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

Las levaduras del género *Candida* son colonizadoras habituales de la mucosa oral que pueden producir un amplio espectro de infecciones orales. *Candida dubliniensis* es una de las especies que se aíslan en muestras orales que presenta dificultades para ser diferenciada de *Candida albicans* por su similitud fenotípica. Nuestro grupo ha desarrollado un medio de cultivo, denominado CHROM-Pal (CH-P, CHROMagar *Candida* y agar de Pal a partes iguales), que permite la diferenciación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* en base a la morfología, el color de las colonias y la producción de clamidosporas. En este trabajo se estudió la utilidad del medio CH-P para el aislamiento primario de levaduras de la cavidad oral en 150 muestras procedentes de pacientes atendidos en la Clínica Odontológica de la Universidad del País Vasco. Las muestras se tomaron con torunda de las lesiones orales o de la mucosa oral y se sembraron en medio CH-P, CHROMagar *Candida* (CAC) y *Candida* ID2 (CAID2), incubándose a 30°C en el caso de CH-P y a 37°C en el caso de CAC y CAID2. La identificación de las colonias se realizó con el API ID 32C. La diferenciación entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* se confirmó con la prueba Bichro-Dubli Fumouze y por PCR con cebadores específicos.

En el medio CH-P crecieron un total de 105 aislamientos del género *Candida* a partir de 88 muestras (58,6%). En CAC y CAID2 se cultivaron 103 aislamientos. Quince muestras dieron lugar a cultivos mixtos. *C. albicans* fue la especie aislada más frecuentemente (64 aislamientos, 60,9%) seguida por *C. parapsilosis* (11 aislamientos, 10,4%), *C. guilliermondii* (10 aislamientos, 9,5%), *C. glabrata* (6 aislamientos, 5,7%), *C. krusei* (4 aislamientos, 3,8%), *C. tropicalis* (3 aislamientos, 2,8%), *C. dubliniensis* (2 aislamientos, 1,9%) y un aislamiento (0,95%) de cada para *C. kefyr*, *C. pulcherrima*, *C. pelliculosa*, *C. famata* y *C. rugosa*. Un aislamiento de *C. parapsilosis* y otro de *C. guilliermondii* no crecieron en CAC ni en CAID2. La diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* se realizó fácilmente en medio CH-P, ya que *C. albicans* dio lugar a colonias lisas de color verde claro mientras que *C. dubliniensis* dio lugar a colonias rugosas verde azuladas. Esta diferenciación no fue posible con los medios CAC y CAID2. La sensibilidad y la especificidad para la identificación de *C. albicans* en medio CH-P fueron 98,4% y 100%, y para *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis* 100%. En conclusión, CH-P es un medio útil para el aislamiento primario de levaduras de la cavidad oral que permite el crecimiento de las especies de importancia clínica del género *Candida* y su rápida identificación, facilitando la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

D17. Utilización de antígenos recombinantes de *Aspergillus fumigatus* en el diagnóstico de la aspergilosis invasora

Ilargi Miranda¹, María Dolores Moragues², Garazi Letamendi³, Juan Carlos García Ruiz³, Iñigo Fernández de Larrinoa⁴, Amalia del Palacio⁵, José Pontón¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, y ²Departamento de Enfermería I, Universidad del País Vasco, Bilbao; ³Servicio de Hematología, Hospital de Cruces, Baracaldo, Vizcaya; ⁴Departamento de Química Aplicada, Universidad del País Vasco, San Sebastián; ⁵Servicio de Microbiología, Unidad de Micología, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, España

El diagnóstico de la aspergilosis invasora se basa en una combinación de estudios clínicos, radiológicos y microbiológicos. Uno de los mayores avances en el diagnóstico serológico de la aspergilosis invasora ha sido la detección del antígeno galactomanano en suero, que presenta una sensibilidad del 50-90%. Un aumento de la sensibilidad diagnóstica podría lograrse detectando anticuerpos, ya que se ha demostrado que hasta un 30% de los pacientes neutropénicos con aspergilosis invasora tienen anticuerpos. En este trabajo se ha estudiado la utilidad diagnóstica de la detección de anticuerpos frente a 4 antígenos recombinantes de *Aspergillus fumigatus* en pacientes neutropénicos con aspergilosis invasora.

Los genes *ENO1*, *16AF*, *MP1* y *MP2* de *A. fumigatus*, que codifican la enolasa y tres glicoproteínas de la pared celular, se clonaron y expresaron en *Escherichia coli* siguiendo protocolos estándar. Mediante immunoblotting se estudiaron un total de 42 pacientes que presentaban aspergilosis probada (12), aspergilosis probable (4), candidiasis probada (13) y pacientes con alto riesgo, pero sin evidencia de infecciones fúngicas invasoras (13).

Todos los grupos de pacientes presentaron reactividad con los antígenos recombinantes estudiados. La enolasa fue el antígeno que reaccionó con la mayor parte de los enfermos con aspergilosis invasora, aunque también mostró reactividad con 2 pacientes sin evidencia de infección fúngica invasora y con 3 pacientes con candidiasis probada. El antígeno MP1 y el 16AF fueron los que menos reaccionaron con los sueros de pacientes con aspergilosis probada, pero presentaron una alta reactividad con el suero de pacientes con candidiasis probada. El antígeno MP2 fue reconocido por los anticuerpos presentes en pacientes con aspergilosis y con candidiasis probada. En conclusión, los antígenos recombinantes de *A. fumigatus* estudiados presentan una baja especificidad para el diagnóstico de la aspergilosis invasora.

D18. Utilidad diagnóstica de dos técnicas serológicas en la candidiasis invasiva

Carmen Castro¹, Mercedes Ramírez¹, Ana I. Aller², Vicente Rubio², Maite Ruiz³, Jose C. Palomares², Javier Aznar³, Estrella Martín Mazuelos¹
¹Hospital Universitario Valme, ²Hospital SAS Jerez, ³Hospital Universitario V. del Rocío

Objetivo: Estudiar la utilidad de dos técnicas serológicas (detección del antígeno y anticuerpos frente a *Candida*) en pacientes neutropénicos ingresados en el H. S.A.S de Jerez, H. Universitario V. del Rocío y en el H. Universitario Valme.

Pacientes y Métodos: Estudiamos 108 pacientes que presentaban factores predisponentes para desarrollar una infección fúngica invasiva (IFI) durante el periodo de tiempo comprendido entre septiembre del 2004 y abril del 2006. A todos ellos se les tomaron dos muestras de suero semanales, junto a otras muestras, según criterio clínico (hemocultivos, asp. bronquiales, 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 731 sueros) fueron: la determinación del Antígeno manano (Ag Platelia Candida®, Bio-Rad) (AG) y el Anticuerpo antimanano (Ac Platelia Candida®, Bio-Rad) (AC), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Resultados: Del total de 731 sueros estudiados obtuvimos un resultado positivo para AG Candida en 18 sueros (2,46%), pertenecientes a 4 pacientes del H. SAS de Jerez y 8 pacientes del H. U. V. del Rocío. Un total de 187 sueros (25,58%) pertenecientes a 46 pacientes presentaron un título alto (>20 UI/ml) de AC antimananos. Seis pacientes presentaron ambas técnicas en sueros distintos AG y AC positivo. Un total de 4 pacientes presentaban una alta sospecha de candidiasis invasiva. Los pacientes estudiados habían recibido previamente trasplante alogénico de médula ósea.

Conclusiones:

1. En los pacientes que presentaban alta sospecha de IFI obtuvimos AG positivo y/o AC positivo en algún suero a lo largo del estudio.
2. Posiblemente el bajo número de resultados positivos puede deberse 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.

E. Epidemiología

E1. Colonización oral por *Candida* y otras levaduras de interés médico en pacientes portadores de prótesis dentales

Cristina Marcos¹, Elena Eraso¹, María Villar-Vidal¹, José López-Vicente², Asier Eguia², Anóni De-Juan², Lucila Madariaga¹, José Manuel Aguirre² y Guillermo Quindós¹

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

Antecedentes: La estomatitis protética es un proceso inflamatorio asociado a la utilización de prótesis dentales que se caracteriza por un enrojecimiento persistente del área de soporte de una prótesis removible. Es un proceso con etiología multifactorial en el que puede estar involucrada la infección por *Candida*.

Objetivo: Investigar la colonización oral por levaduras en personas portadoras de prótesis y su asociación a la estomatitis protética.

Pacientes y Métodos: Se han estudiado muestras de 76 pacientes de la Clínica Odontológica de la Universidad del País Vasco, 33 (43,4%) con diferentes tipos de estomatitis protética (16 de tipo I, 13 de tipo II y 4 de tipo III) y 43 (56,6%) sin estomatitis. Las muestras tomadas tanto de la prótesis 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). Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico con chi cuadrado, considerando como significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados: Se aislaron levaduras en 58 (76,6%) pacientes: en el 90,9% (30/33) de los pacientes con estomatitis protética y en el 65,1% (28/43) de los portadores de prótesis sin estomatitis, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Se aislaron 123 cepas de levaduras en muestras de 58 pacientes: 44 de ellas de las muestras de prótesis y 50 de la mucosa oral. La especie más frecuente fue *C. albicans* (64,8% de los aislamientos), otras especies aisladas fueron *Candida tropicalis* (13,1%), *Candida glabrata* (12,3%), *Candida guilliermondii* (6,6%), *Saccharomyces cerevisiae* (1,6%) y *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* (cada una 0,8%).

Se aisló *C. albicans* en las muestras de 28 de los 33 (84,8%) pacientes con estomatitis protética, en concreto: en los 4 pacientes con estomatitis tipo III (100%), 15 de los pacientes con estomatitis tipo II (93,8%) y en 13 de los pacientes con estomatitis tipo I (81,3%). En las muestras de pacientes sin estomatitis, se aisló *C. albicans* en las muestras de 19 de los 43 (44,2%) pacientes. Estas diferencias también resultaron significativas ($p < 0,001$).

Conclusión: Hemos encontrado una alta incidencia de colonización por levaduras del género *Candida* en personas portadoras de prótesis. El aislamiento de *C. albicans* aparece asociado a la presencia de estomatitis protética.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PI030662/2003 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

E2. Situación actual de la sensibilidad antifúngica en las candidemias aisladas en un hospital terciario

M. Bosch, E. Calabuig, E. Cantón, J. Pemán, A. Valentín, A. Viudes, M. Gobernado.

Servicio de Microbiología. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Introducción y objetivo: Una de las indicaciones para la realización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos es la vigilancia epidemiológica periódica para detectar la aparición de resistencias en cada centro hospitalario y realizar una terapia antifúngica empírica más eficaz. El objetivo del presente estudio es conocer la frecuencia de aislamientos de cada especie de *Candida* procedente de hemocultivo durante el último año y su sensibilidad a los antifúngicos sistémicos.

Material y métodos: Estudio prospectivo descriptivo en el que se incluyeron todos los aislados de *Candida* spp. en hemocultivo desde el 1 de enero al 31 de diciembre de 2005 procedentes de los diferentes servicios hospitalarios. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antifúngicos sistémicos: anfotericina B (AMB), fluconazol (FLU), itraconazol (ITR) y voriconazol (VOR), siguiendo las indicaciones del CLSI (documento M27-A2).

Resultados: Durante el periodo estudiado, se obtuvieron un total de 48 aislamientos: 22 *Candida albicans* (45,8%), 11 *C. parapsilosis* (22,9%), 8 *C. tropicalis* (16,6%), 5 *C. glabrata* (10,41%) y 2 *C. guilliermondii*

(4,16%). Los intervalos de la CMI, la CMI₅₀ y la CMI₉₀ para cada especie fueron, respectivamente: *C. albicans* AMB (0,06-0,5; 0,25; 0,5), FLU (0,12-64; 0,12; 0,25), ITR (0,008-8; 0,016; 4), VOR (0,008-4; 0,008; 4); *C. parapsilosis* AMB (0,03-0,5; 0,12; 0,25), FLU (0,06-1; 0,25; 1), ITR (0,008-0,12; 0,008; 0,03), VOR (0,008-0,03; 0,008; 0,008); *C. tropicalis* AMB (0,06-0,25; 0,12; 0,25), FLU (0,25-64; 0,5; 64), ITR (0,008-8; 1; 8), VOR (0,008-4; 0,008; 8); *C. glabrata* AMB (0,03-0,5; 0,12; 0,5), FLU (4-8; 8), ITR (0,25-1; 0,5; 1), VOR (0,008-0,06; 0,008; 0,06); *C. guilliermondii* AMB (0,12-0,25; 0,12; 0,25), FLU (0,5-8), ITR (0,008-0,5; 0,008; 0,5), VOR (0,008-0,016; 0,008; 0,016). Los resultados globales para todas las especies de *Candida* fueron: AMB (0,03-0,25; 0,25; 0,5), FZ (0,06-64; 0,25; 16), ITR (0,008-8; 0,016; 8), VOR (0,008-4; 0,06; 0,008).

Fluconazol fue activo in vitro (CMI ≈ 32 µg/mL) sobre el 93,75% de los aislamientos de *Candida* spp. estudiados.

Conclusiones: 1) En nuestro centro, las especies aisladas con mayor frecuencia son *C. albicans* (45,8%) y *C. parapsilosis* (22,9%). 2) La mayoría de los aislados de hemocultivo son sensibles a los antifúngicos sistémicos ensayados. 3) Todas las aisladas de *C. glabrata* son sensibles a voriconazol. 4) El porcentaje de resistencia global a fluconazol es bajo y similar al obtenido en otros estudios.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado con las colaboraciones de la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia (nº 2/2005/0140) y del Instituto de Salud Carlos III de Madrid (CM04/00248).

E3. Sensibilidad antifúngica en candidemias aisladas en las unidades críticas. Estudio de los últimos 5 años

E. Calabuig, M. Bosch, J. Pemán, E. Cantón, A. Valentín, A. Viudes, M. Gobernado

Servicio de Microbiología. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Objetivo: Estudiar la sensibilidad antifúngica de los aislados obtenidos en las candidemias de las unidades críticas (UCIs médicas, quirúrgicas, pediátricas y quemados) durante los últimos 5 años en nuestro hospital. **Material y métodos:** Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antifúngicos sistémicos: anfotericina B (AMB), fluconazol (FLU), itraconazol (ITR) y voriconazol (VOR), siguiendo las indicaciones del CLSI (documento M27-A2) sobre todas las *Candida* spp. aisladas en los hemocultivos procedentes de las unidades críticas desde el 1/1/2001 hasta el 31/12/2005.

Resultados: Se obtuvieron un total de 170 aislados: 77 *Candida albicans*, 68 *C. parapsilosis*, 15 *C. tropicalis*, 6 *C. glabrata*, 2 *C. guilliermondii* y 1 *C. krusei*. Los intervalos globales de la CMI, la CMI₅₀ y la CMI₉₀ para todas las especies fueron: AMB (0,03-2; 0,25; 1), FLU (0,06-64; 0,25; 4), ITR (0,03-8; 0,03; 0,5) y VOR (0,008-4; <0,008; 0,12). Por especies fueron, respectivamente, los siguientes: *C. albicans* AMB (0,03-1; 0,25; 0,5), FLU (0,06-64; 0,25; 0,5), ITR (0,03-8; 0,03; 0,06), VOR (0,008-4; 0,008; 0,06); *C. parapsilosis* AMB (0,06-4; 0,5; 2), FLU (0,06-4; 0,5; 1), ITR (0,03-0,5; 0,03; 0,25), VOR (0,008-1; 0,016; 0,06); *C. tropicalis* AMB (0,03-0,5; 0,25; 0,5), FLU (0,25-64; 0,5; 64), ITR (0,03-8; 0,5; 8), VOR (0,008-4; 0,03; 4); *C. glabrata* AMB (0,03-1; 0,06; 1), FLU (4-64; 8; 64), ITR (0,5-1; 0,5; 1), VOR (0,016-1; 0,12; 1); *C. guilliermondii* AMB (0,12-0,25; 0,12; 0,25), FLU (0,5-32), ITR (0,06-0,5; 0,06; 0,5), VOR (0,008-1; 0,008; 1); *C. krusei* AMB (0,06), FLU (64), ITR (0,12), VOR (0,25).

La resistencia global a fluconazol fue 5,29% y para *C. albicans* 2,59%.

Conclusiones:

- 1) Las especies causantes de candidemia en las Unidades de pacientes críticos en nuestro hospital son sensibles a los antifúngicos sistémicos ensayados.
- 2) En general, la resistencia a fluconazol es baja y similar a la obtenida por otros autores.
- 3) Todas las aisladas de *C. glabrata* y *C. krusei* son sensibles al voriconazol.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado con las colaboraciones del Instituto de Salud Carlos III de Madrid (CM04/00248) y de la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia (nº 2/2005/0140).

E4. Dermatofitosis en Valdivia (Chile, 1987-2001)

Luis Zoror¹, Eliud Gómez¹, María I. Moreno², Mónica Hering², Iván Salas³ y Virginia Rodríguez²

¹Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile; ²Servicio de Dermatología Hospital Base de Valdivia, Valdivia, Chile

Se realizó en Valdivia, Chile, un estudio retrospectivo de dermatofitosis en humanos, entre 1987 y el 2002. Se analizó deparadamente 1837 registros. El 52,2% de los pacientes fueron mujeres y el 47,8% hombres. Los hongos más aislados fueron *Trichophyton rubrum* 61,3%, *Trichophyton mentagrophytes* 19,7% y *Microsporum canis* 13,8%. En menor porcen-

taje, *Trichophyton interdigitale* 2,1%, *Trichophyton verrucosum* 1,9% y *Epidermophyton floccosum* 0,7%. *Trichophyton rubrum* se aisló preferentemente de uñas del pie. *Microsporum canis* se presentó, con algunas excepciones en menores de 15 años. Los casos de querion fueron producidos, todos, por *Trichophyton verrucosum*. Los dermatofitos se aislaron principalmente de uña del pie 32,1%, espacio interdigital del pie 13,6%, planta del pie 9,5%, cuero cabelludo 7,2%, zona inguinal 5,2% y uña de mano 5,1%. Se analizaron además, otras variables como distribución en el tiempo y por edad.

Agradecimientos: Trabajo con el apoyo financiero de la DID de la Universidad Austral de Chile.

E5. Microbiota fúngica nasal en sujetos alérgicos y sanos

Sellart-Altisent Maite, Torres-Rodríguez Josep M., Gómez de Ana Silvia, Alvarado-Ramírez, Eidi
Unitat de Recerca en Malalties Infeccioses i Micologia. IMIM, UDIMAS, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona

Los hongos ambientales, mohos y levaduras penetran con el aire en la cavidad nasal y pueden desencadenar alergias respiratorias en sujetos atópicos, no obstante, la flora fúngica de las fosas nasales es muy poco conocida.

En este estudio, se han cultivado muestras de la mucosa nasal de 135 sujetos de los cuales 48 alérgicos a hongos y/o ácaros y epitelios y los restantes sin antecedentes de alergia, considerándose como sanos. Todos ellos residentes en el área metropolitana de Barcelona y con una edad entre 18 y 35 años.

Los resultados obtenidos demuestran que el 41,5% de los sujetos sanos eran portadores de una o más especies fúngicas, mientras que los alérgicos que presentaron hongos fueron el 14,8% (p=0,011). El 50,4% de los aislados correspondieron a los 4 géneros: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*, los cuales se consideran elevadamente alérgicos.

Las especies fúngicas más comunes fueron: *Cladosporium herbarum* y *C. cladosporioides* (23,6%). A pesar de que casi la mitad de pacientes eran alérgicos a *Alternaria alternata*, ésta tan sólo se aisló en el 8,8% de las muestras de dicho grupo. Las levaduras se aislaron predominantemente en sujetos sanos.

No se observaron diferencias entre sexos ni por el hecho de fumar.

Destaca la menor prevalencia de hongos nasales en sujetos alérgicos, que podría ser debida a la insuficiencia nasal, rinorrea y/o mayor uso de pañuelos.

E6. Detección y control de un brote de aspergilosis invasiva durante las obras de demolición en un centro hospitalario

Pilar Escamilla¹, Federico Grünbaum¹, Lidia Romero¹, Josep Lluís Barrio², Joaquín López-Contreras², Mercè Gurgui^{2,3}, Pere Coll^{1,3}, Ferran Sanchez^{1,3}

¹Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau;

²Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau;

³Facultad de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

Introducción: Es bien conocida la relación entre brotes nosocomiales de aspergilosis invasiva en pacientes inmunocomprometidos y la coexistencia de obras de construcción, demolición o remodelación en los centros hospitalarios o cerca de estos.

En las obras, las esporas fúngicas son vehiculadas junto con el polvo que es producido durante la construcción o demolición y pueden ser inhaladas por los enfermos a través de los sistema de ventilación o durante sus traslados dentro del mismo recinto hospitalario.

Nuestro Centro se halla, desde el año 2001, en fase de deconstrucción y construcción de un nuevo edificio, por lo que se ha establecido un programa de prevención y control de la infección nosocomial que, entre otras medidas incluye, desde el año 2003, la práctica prospectiva de dos determinaciones semanales de galactomananemia a todos los pacientes neutropénicos de oncohematología con riesgo de desarrollar una aspergilosis invasiva.

Objetivo: El objetivo de este trabajo, es describir la detección y control de un brote de aspergilosis invasiva, ocurrido en la sala de oncohematología en relación a unas obras de demolición realizadas dentro del mismo recinto hospitalario.

Materiales y métodos: Entre los meses de Junio y Septiembre de 2005, tras el derribo de varios pabellones del hospital, estuvieron ingresados en el Servicio de oncohematología 31 pacientes a los que se les realizaron un total de 312 determinaciones de antígeno galactomanano en suero. Para la cuantificación del antígeno galactomanano se empleó el test comercializado de ELISA de doble sandwich Platelia *Aspergillus*[®].

Resultados: De los 312 sueros analizados, 247 correspondían al periodo de ingreso en la sala de oncohematología y el resto eran controles ambulatorios.

A partir de la primera semana de Julio se empezaron a detectar valores excesivamente elevados de galactomanano en suero, cuantificándose en poco más de un mes y medio un total de 53 sueros con índices superiores o iguales a 0,5 ($28 > 0,5$, $10 > 1$ y $15 > 1,5$). Estos sueros, correspondían a 18 pacientes, y aunque en varias ocasiones se trataba de determinaciones aisladas o separadas por índices negativos, se consideró que 5 de los enfermos cumplían los criterios clínicos y/o radiográficos necesarios para ser diagnosticados de probable aspergilosis invasiva. Sólo en dos enfermos, y con posterioridad a la detección de galactomanemias repetidamente elevadas, se consiguió el aislamiento del hongo de las muestras respiratorias (*Aspergillus flavus* en un caso y *A. flavus* + *A. fumigatus* en otro).

Solo uno de los enfermos falleció durante el periodo de estudio, evidenciándose en la necropsia la presencia de elementos hifales en el parénquima pulmonar que no pudieron ser recuperados por cultivo.

Conclusiones:

- 1) Tres semanas después de la demolición de varios pabellones del centro hospitalario se empezaron a detectar valores excesivamente elevados de galactomanano en los sueros de varios enfermos oncohematológicos.
- 2) La detección brusca y simultánea de galactomanemias anormalmente elevadas permitió la sospecha de un brote epidémico de aspergilosis invasiva de origen nosocomial.
- 3) El tratamiento específico con voriconazol, la instauración de medidas adicionales de prevención y la terapia profiláctica con itraconazol, permitieron el control del brote epidémico de aspergilosis.

E7. Aislamientos fúngicos en enfermos con Fibrosis Quística en un Hospital Terciario durante los últimos 10 años

Maria Elena Celades¹, Ana Gil-Brusola², Javier Pemán², Miguel Gobernado¹

¹Departamento de Microbiología, Hospital General de Castellón, Castellón; ²Departamento de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, España

Objetivo: Describir las especies de hongos aisladas en muestras respiratorias de enfermos con fibrosis quística (FQ) durante 10 años en nuestro hospital. Analizar su distribución por sexo, edad y ubicación de los enfermos.

Material y métodos: Estudio retrospectivo de los aislamientos de hongos en muestras respiratorias (esputo y lavado broncoalveolar) de enfermos con FQ recibidas en la Sección de Hongos del H.U. La Fe entre 1996 y 2005. Los procedimientos de cultivo e identificación fueron los habituales y los datos se obtuvieron de la base de datos del laboratorio.

Resultados: Durante el periodo de estudio se procesaron 2.856 muestras respiratorias de 260 pacientes. En el 61,9% de los cultivos se identificaron patógenos fúngicos. Los cultivos correspondieron a 207 pacientes (79,6%), de los cuales el 58% fueron varones. La edad media de los pacientes fue 22,2 años, concentrándose el mayor número de ellos entre los 10 y 29 años (76,3%). La mayoría de las muestras correspondían a pacientes de consultas externas (80,7%). Un 66,4% de los aislamientos fúngicos fueron levaduras. Las especies de *Candida* spp. representaron un 65,7% de las mismas. *C. albicans* fue la levadura más frecuentemente aislada (82%), seguida de *C. glabrata* (8,7%) y *C. tropicalis* (3,7%). Entre los hongos filamentosos, las especies de *Aspergillus* fueron las más abundantes (89,4%), seguidas de *Scedosporium* spp. (7%). *A. fumigatus* fue el hongo filamentosos más frecuentemente aislado (60,3%), seguido de *A. flavus* (15,1%) y *A. niger* y *A. candidus* (4%). *S. apiospermum* fue la especie de *Scedosporium* más frecuente (88%).

Conclusiones: Los aislamientos fúngicos en pacientes con FQ en nuestro hospital son más comunes en jóvenes varones menores de 30 años y atendidos en consultas externas. Al igual que en otros estudios, *C. albicans* (54%) es la especie fúngica más frecuentemente aislada en muestras respiratorias de pacientes con FQ, seguida de *A. fumigatus* (20,3%). *Scedosporium* spp. es el segundo hongo filamentosos no *Aspergillus* en importancia en nuestro hospital.

E8. Candidiasis urinaria durante 10 años en un Hospital Terciario (1996-2005)

Ana Gil-Brusola¹, Maria Elena Celades², Javier Pemán¹, Miguel Gobernado¹

¹Departamento de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia; ²Departamento de Microbiología, Hospital General de Castellón, Castellón, España

Objetivos: Determinar la prevalencia de *Candida* spp. en los urocultivos solicitados durante los últimos 10 años en nuestro hospital; describir las características microbiológicas de los aislamientos; y analizar su distribución por sexo, edad y ubicación de los enfermos.

Material y métodos: Estudio retrospectivo de los aislamientos de *Candida* spp. en muestras de orina recibidas en el laboratorio de Microbiología del H.U. La Fe de Valencia entre 1996 y 2005. Los urocultivos se realizaron siguiendo la metodología habitual y prolongando la incubación de los negativos hasta 48 horas. Las levaduras se identificaron por métodos convencionales. Los datos demográficos se obtuvieron de la base de datos de nuestro Servicio.

Resultados: En el periodo del estudio se procesaron 399.570 cultivos de orina de los cuales 71.331 (17,9%) fueron positivos. Se aisló *Candida* spp. en 2.741 urocultivos pertenecientes a 1.734 pacientes, lo que representó el 0,7% del total de cultivos y el 3,8% de los positivos. La edad media de los pacientes con candiduria fue 54 años, siendo el 53% mayores de 60 años y el 13% menores de 15 años. No se encontró diferencia significativa en cuanto al sexo de los pacientes con infección urinaria por *Candida* spp. Un 81% eran pacientes hospitalizados y el 27% de los mismos en unidades de cuidados críticos. En el 99,4% de los episodios de candiduria se identificó la especie, siendo *Candida albicans* la más frecuentemente aislada (54%), seguida de *C. glabrata* (16%), *C. tropicalis* (13%), *C. parapsilosis* (12%) y *C. krusei* (3%). Analizada la distribución de las especies en el periodo de estudio, no se encontró diferencia significativa en la frecuencia de aislamiento de cada especie.

Conclusiones: La candiduria es más común en pacientes mayores de 60 años, pero en nuestra área no existe el predominio del sexo femenino que se describe en otras series. *C. albicans* sigue siendo la más frecuentemente aislada. No hay diferencias en la distribución de las especies a lo largo de los 10 años estudiados.

E9. Infecciones vaginales. Agentes etiológicos, clínica y factores asociados

Miriam E. Chade¹, Beda E. Mereles¹, Celina Vedoya¹, Martha G. Medvedeff¹, Claudia V. Villalba², Gladis Bello Velásquez², Leticia Wimmer¹, Cecilia Villalba¹, Cecilia Tannuri¹, Belen Jaquet¹
¹Departamento Microbiología, Cátedra Micología, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones; ²Laboratorio de Bacteriología, Hospital Ramon Madariaga, Posadas, (3300) Misiones, Argentina

Las infecciones vaginales constituyen una de las patologías más frecuentes del tracto genital femenino. El presente estudio se realizó para conocer los agentes infecciosos involucrados en las vaginitis, sus manifestaciones clínicas y factores predisponentes.

Durante el periodo 2004-2005 se estudiaron 1.850 muestras de flujo vaginal de pacientes sexualmente activas, cuyas edades oscilaron entre 14 y 56 años con síntomas de vulvovaginitis. Las muestras fueron procesadas según métodos convencionales de diagnóstico microbiológico. El 55 % de los casos presentó compromiso microbiológico con la siguiente distribución: vaginosis bacteriana (VB) 49,5%, vulvovaginitis por levaduras (VL) 38%, vulvovaginitis por parásitos 12,5%. Los agentes comprometidos fueron: *Gardnerella vaginalis* 49,5%, *Candida* spp 35%, *Sacharomyces cerevisiae* 3%, *Trichomonas vaginalis* 12,5%. Las especies del género *Candida* identificadas fueron, *C. albicans* 80%, *C. glabrata* 13%, *C. tropicalis* 1%, *C. guilliermondi* 1%, *C. parapsilosis* 1%, *C. krusei* 1%, y *Candida* spp 3%. La vulvovaginitis candidiásica estuvo asociada a vaginosis bacteriana en 27 casos, y en ocho casos a trichomoniasis, en cuatro casos la VB se asoció a trichomoniasis. La manifestación clínica más significativa en VB fue el olor, en VL fue el prurito. Los factores predisponentes en orden de importancia fueron en VB la actividad sexual frecuente, el uso de ropa ajustada, embarazo, anemia, anticonceptivos orales, antibióticos, uso de dispositivo intrauterino, terapia antifúngica previa, y diabetes. En VL, el embarazo fue el factor más significativo, siguiéndole actividad sexual frecuente; anemia, anticonceptivos orales, antibióticos, uso de ropa ajustada, diabetes y uso de dispositivo intrauterino.

Dada la diversidad de agentes etiológicos involucrados, cobra importancia la identificación de los mismos para instaurar tratamientos quimioprácticos racionales, que evitarían la aparición de resistencias.

E10. Epidemiología de las Fungemias en un Hospital Universitario, 1995-2005

Ferran Sanchez^{1,2}, Roser Pericas¹, Marta Briz¹, Roser Sole¹, Cristina Gutierrez¹, Pere Coll^{1,2}

¹Servicio de Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau;

²Facultad de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona

Objetivo: Evaluar la epidemiología y la susceptibilidad de las levaduras implicadas en cuadros septicémicos durante el periodo de estudio.

Métodos: Se han revisado retrospectivamente todos los episodios de fungemia ocurridos, en un Hospital Universitario de tercer nivel de Barcelona, entre los años 1995 y 2005.

Durante el periodo de estudio se empleo para la detección de las septicemias el sistema automatizado BactAlert®. Las resiembras primarias se efectuaron en los medios de agar sangre, agar glucosado de Sabouraud y el medio cromogénico CHROMagar Candida®.

Las levaduras se identificaron según los métodos convencionales o empleando galerías comercializadas de asimilación de nutrientes (API 20C AUX® o ID 32C®). Para el estudio de sensibilidad se emplearon los métodos colorimétricos comercializados Fungitest® (años 1998 a 2002) o Sensititre YeastOne® (años 2003 a 2005).

Resultados: Entre Enero de 1995 y Diciembre de 2005, se diagnosticaron un total de 8227 episodios de septicemia verdadera, de las que 251 (3,05%) correspondían a fungemias por levaduras. La especie aislada con mayor frecuencia fue *Candida albicans* (44,75%), seguida de *C. parapsilosis* (17,90%), *C. tropicalis* (13,23%), *C. glabrata* (8,56%), *C. lusitanae* (1,56%) y *C. krusei* y *C. kefiri* (ambas 1,17%). En 8 de los episodios (3,11%) no se llevo a la identificación de especie, y en 19 ocasiones (7,39%) se aislaron otras levaduras diferentes de *Candida* (10 *Cryptococcus neoformans*, 5 *Blastochizomyces capitatus*, 3 *Rhodotorula* spp y 1 *Trichosporon* spp).

En 6 ocasiones (2,4%) se demostró la implicación simultanea de más de una especie de levadura: *C. albicans* + *C. glabrata* (3), *C. albicans* + *C. parapsilosis*, *C. glabrata* + *C. parapsilosis* y *C. lusitanae* + *Blastochizomyces capitatus*.

La distribución de las especies fue similar a lo largo de todo el periodo de estudio, siendo siempre *C. albicans* la especie aislada con mayor frecuencia, y ocasional la implicación de otros géneros de levaduras.

Un 10% de las cepas de *Candida* aisladas se consideraron no sensibles al Fluconazol, encontrándose 15 cepas con una MIC >8 mg/mL: *C. krusei* (2/2), *C. glabrata* (7/14), *C. tropicalis* (3/26), *C. parapsilosis* (1/37) y *C. albicans* (2/73).

Conclusiones: En las fungemias es siempre recomendable identificar correctamente el agente causal y estudiar su sensibilidad a los antifúngicos. Pues si bien *C. albicans* se ha mantenido a lo largo de todos los años como la levadura mas frecuentemente implicada en las septicemias y ha sido excepcional su resistencia al fluconazol, cerca del 50% de las fungemias han estado causadas por otras especies de *Candida*, se han detectado infecciones mixtas, se ha visto la implicación de otros géneros de levaduras, y se ha demostrado la no-sensibilidad al fluconazol en el 10% de las cepas estudiadas.

E11. Incremento de las dermatofitosis por *Trichophyton rubrum* y dermatofitos importados en Zaragoza

Antonio Rezusta, Beatriz Moles, M^a Luisa Gracia, M^a Carmen Aspiroz, Luis Torres, M^a José Revillo, M^a Carmen Rubio

Departamento, Facultad, Universidad, Ciudad, País

Introducción: En Zaragoza predominaban las dermatofitosis producidas por hongos zoófilos. A nivel mundial hay grandes diferencias de especies. Nuestro objetivo fue conocer la evolución después de la última publicación realizada en nuestro hospital (referencia o al menos años de estudio).

Material y métodos: Tiempo de estudio 1995-2005. Pacientes estudiados: 1. Muestras recogidas en el Hospital Miguel Servet de Zaragoza. 2. Cepas remitidas desde otros centros (Hospital Royo Villanova, Hospital de Alcañiz). 3. Muestras de Hospital San Jorge de Huesca.

La toma de muestra se realizó tras la limpieza con alcohol de 70% (siempre que la lesión y las circunstancias lo permitieron). Las muestras se sembraron en Agar glucosado de Sabouraud adicionado con cloranfenicol y Dermatophyte Test Medium. La identificación se realizó con métodos morfológicos, y en algún caso mediante técnicas moleculares.

Resultados: Se aislaron un total de 1.287 dermatofitos. Los años con menor número de aislados fueron 1996 y 1997 –con 62 y 61 respectivamente–, y el máximo se obtuvo durante los años 2004 y 2005 con 228 y 236 respectivamente.

Las especies más frecuentemente aisladas fueron *T. rubrum* [528 (41.0%)], *Trichophyton mentagrophytes* [359 (27,9%)], *Microsporium canis* [246 (19,1%)] y especies importadas (*Trichophyton. sudanense*, *Microsporium audouinii*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *T. rubrum* variante africana 99 (7,7%).

Discusión: En la etiología de las micosis por dermatofitos en nuestra área se observa un cambio importante respecto a los años anteriores, con un aumento de dermatofitos antropófilos (*T. rubrum*) y agentes importados.

F. Fisiopatología

F1. Actividad in vitro de lactoferrina, histatina 5 y ácido acetil salicílico sobre la producción de biopelículas por aislamientos clínicos de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*

María Villar-Vidal¹, Elena Eraso¹, Pilar A. Ezkurra¹, Jesús Delgado-Naranjo², Carlos Rodríguez-Andrés² y Guillermo Quindós¹
¹Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, y ²Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao

Antecedentes: *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* desarrollan biopelículas sobre biomateriales, como prótesis o catéteres, originando diferentes formas de candidiasis locales y diseminadas.

Objetivo: Estudiar la capacidad de desarrollo in vitro por biopelículas de diferentes aislamientos clínicos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* y la actividad inhibitoria de lactoferrina, histatina 5 y ácido acetil salicílico tanto sobre el crecimiento planctónico como sobre la formación de las biopelículas.

Métodos: Se estudiaron un total de 48 aislamientos clínicos: 26 *C. albicans* (14 orales y 12 obtenidos en hemocultivo) y 22 *C. dubliniensis* (12 orales, 2 vaginales y 8 de hemocultivo). El método de desarrollo de biopelículas empleado fue el descrito por Ramage et al. (Rev Iberoam Micol 2001) en medio RPMI tamponado con MOPS (Sigma, EEUU) en placas de microtitulación con una incubación de 24 y 48 h en un incubador biológico BioScreen C (Labsystems, Finlandia). Se determinó, en primer lugar, el crecimiento planctónico y, tras la eliminación de las células planctónicas, la biopelícula formada por cada aislamiento tras la adición de XTT. Se valoró la capacidad para disminuir en un 50% y un 80% la formación de biopelícula de diferentes concentraciones de lactoferrina (de 4 a 32 µg/ml), ácido acetil salicílico (de 4 a 32 µg/ml) e histatina 5 (de 2 a 16 µg/ml).

Resultados: Los aislamientos clínicos de *C. albicans* mostraron una capacidad mayor de producir biopelícula que los de *C. dubliniensis* (p < 0,05). Por otro lado, en ambas especies, los aislamientos de hemocultivo produjeron una mayor biopelícula que los aislamientos orales (p < 0,05).

La lactoferrina fue el compuesto más eficaz para inhibir la formación de biopelícula: concentraciones de 32 µg/ml de lactoferrina redujeron en más de un 50% la formación de biopelícula de 15 de los 22 aislamientos de *C. dubliniensis*. La histatina 5 también mostró actividad inhibitoria. Con ambos compuestos, lactoferrina e histatina 5, esta reducción de la formación de biopelícula fue estadísticamente significativa (p < 0,00001 y p < 0,05, respectivamente). En presencia de ácido acetil salicílico no se detectó inhibición.

Conclusiones: La mayor capacidad de formar biopelículas sobre biomateriales puede ser uno de los factores que contribuyen a la mayor patogenidad de esta especie. La lactoferrina y la histatina 5 son inhibidores eficaces de la formación in vitro de biopelículas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PI030662/2003 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

G. Genética

G1. Regulación de genes lipasas mediada por el factor de transcripción CTF1 en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Ana Lilia Martínez Rocha, Antonio Di Pietro, M. Isabel G. Roncero
Departamento de Genética, Campus de Rabanales, Edificio Gregor Mendel (C5), Universidad de Córdoba, Córdoba

Fusarium oxysporum es un hongo patógeno que penetra a sus plantas hospedadoras a través de la raíz. Al igual que otros patógenos *F. oxysporum* secreta enzimas líticas que le ayudan a penetrar, crecer y propagarse en el interior de los tejidos vegetales. Entre ellas se encuentran las lipasas, enzimas que hidrolizan enlaces éster de ácidos grasos, cuya regulación se desconoce en gran medida.

Para estudiar la regulación génica de las lipasas de *F. oxysporum*, en este trabajo hemos aislado un gen estructural *lip1* responsable de una lipasa extracelular. Para la caracterización molecular se ha analizado el nivel de transcripción génica durante el crecimiento del hongo en distintas fuentes de carbono. Por otro lado, se ha determinado la actividad lipasa extracelular utilizando como sustrato el p-nitrofenil palmitato. Tanto el nivel de transcritos como la actividad lipolítica se han comparado en la estirpe silvestre, en un mutante nulo (Δ *ctf1*) y en un mutante constitutivo (*ctf1^c*), ambos afectados en el gen responsable del factor de transcripción CTF1 que regula genes cutinasas.

Las colonias de la estirpe silvestre y de los mutantes *ctf1* observadas tras su crecimiento en medio sólido conteniendo 1% aceite de oliva, o 1% aceite de oliva con 0,1% sacarosa como únicas fuentes de carbono, mostraron halos indicativos de la hidrólisis del sustrato tanto en la estirpe silvestre como en el mutante constitutivo *ctf1^c*, mientras que este halo estaba ausente en el mutante deficiente en dicho gen (Δ *ctf1*).

La expresión del gen *lip1* en la estirpe silvestre y en los mutantes, analizada por hibridación *northern* con un fragmento del gen *lip1* mostró como era esperable, que el nivel de expresión del gen *lip1* disminuye considerablemente en el mutante Δ *ctf1*, mientras que el mutante *ctf1^c* presenta mayor nivel de expresión del gen que la estirpe silvestre.

La actividad lipasa se indujo tras crecimiento en medio mínimo líquido con 2% aceite de germen de trigo como fuente de carbono. El análisis comparativo de dicha actividad, mostró como era predecible, que la actividad lipolítica es superior en el mutante *ctf1^c* que la del silvestre, mientras que en el mutante Δ *ctf1* no se detecta ninguna inducción en las condiciones del ensayo.

Considerando estos resultados, podemos concluir que el gen *lip1*, está regulado por el factor de transcripción CTF1, y que la actividad lipasa parece estar controlada por este mismo factor de transcripción.

I. Inmunología

I1. Estudio de la respuesta del macrófago tras su interacción con *Candida albicans*

Laura Martínez-Solano¹, Monserrat Fernández-Gomariz², César Nombela¹, Gloria Molero¹ y Concha Gil^{1,2}

¹Dpto. de Microbiología II. Fac. de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid; ²Unidad de Proteómica, Parque Científico de Madrid

Los macrófagos son células del sistema inmunitario cuyo papel en la lucha frente a las candidiasis sistémicas es fundamental. Por un lado, actúan como célula fagocítica y por otro, secretan citoquinas que son capaces de activar a otras células y de dirigir la respuesta inmunitaria, pudiendo actuar como células presentadoras de antígenos. Con el fin de profundizar en el papel de dichas células, hemos realizado un estudio proteómico de la respuesta de una línea celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) frente a células de una cepa silvestre de *C. albicans* (SC5314) tanto vivas como inactivadas por calor, ya que se ha descrito que ejercen efectos diferentes sobre la activación de los macrófagos y sobre células epiteliales.

Se ha estudiado la fagocitosis sobre ambos tipos celulares a 45 min. Y se ha podido observar una condensación de F-actina alrededor de la levadura viva. A este mismo tiempo de interacción se ha estudiado la expresión diferencial de las proteínas del macrófago, y se han visto muchas diferencias de expresión entre las tres condiciones: macrófagos en estado basal, macrófagos enfrentados a células inactivadas por calor y enfrentados a células de *C. albicans* vivas.

Hemos podido identificar 50 proteínas, de las cuales 30 son de expresión diferencial. Estas 30 proteínas tienen funciones diversas: morfogénesis, transducción de señales, destino celular, síntesis de proteínas, metabolismo, homeostasis del hierro y un canal de cloro. Si atendemos a las funciones de estas proteínas de expresión diferencial, en conjunto, podemos decir que, tras 45 minutos de interacción, tanto las células vivas como inactivadas de *C. albicans* provocan en el macrófago un aumento de las proteínas implicadas en la reorganización del citoesqueleto y de algunas posiblemente implicadas en protección frente a la apoptosis. Sin embargo, las células vivas provocan una reacción fundamentalmente pro-inflamatoria, a diferencia de las inactivadas por calor, frente a las cuales la respuesta es fundamentalmente anti-inflamatoria. Por otro lado, estas células inactivadas por calor estimulan rutas metabólicas como la glicólisis o la ruta de los ácidos tricarbónicos.

Con el fin de profundizar en la reacción de los macrófagos frente a *C. albicans*, hemos puesto a punto la metodología para realizar el estudio de cuatro fracciones subcelulares: citosol, organela, núcleo y citoesqueleto y hemos aumentado el tiempo de interacción a 3h. El estudio de expresión diferencial de las proteínas de los diferentes subproteomas se está realizando con tecnología DIGE. Se han estudiado tres de ellas, observándose que la fracción de citoesqueleto es la que aparece más profundamente alterada a las 3h de interacción.

Este trabajo abre grandes perspectivas en el estudio de la interacción macrófago-*C. albicans*, pudiendo permitir el descubrimiento de nuevas estrategias en la terapia de las candidiasis sistémicas y de nuevos factores de virulencia de la levadura y, por tanto, de nuevas dianas antifúngicas.

I2. Efecto del deoxynivalenol (DON) sobre la respuesta vacunal en cerdos

Francesc Accensi¹, Philippe Pinton² & Isabelle Oswald²

¹Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España; ²Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie UR66, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Toulouse, Francia

El deoxynivalenol (DON) es una micotoxina producida por diversas especies del género *Fusarium*, contaminantes frecuentes de los cereales. Debido a su dieta rica en cereales, el cerdo puede hallarse expuesto a dicha micotoxina. Los efectos de la intoxicación por DON en cerdos son conocidos: dependiendo de la dosis ingerida, el animal presenta una disminución del consumo de alimento que puede llegar hasta el rechazo total, vómitos, pérdidas en la producción, diarrea y otras alteraciones gastrointestinales. Estudios recientes han demostrado, además, una alteración de la respuesta inmune. La mayoría de los estudios realizados sobre el efecto del DON sobre la respuesta inmune han sido hechos en modelo murino. No obstante, los ratones son uno de los animales más resistentes al efecto de las micotoxinas, mientras que los cerdos están entre las especies más sensibles a dichos metabolitos fúngicos.

El objetivo del presente estudio es describir el efecto de una intoxicación por consumir un alimento naturalmente contaminado con 2500 ppm de DON sobre la eficacia de la respuesta vacunal a la ovoalbúmina. Además, hemos investigado los efectos del DON en otras variables, tales como el nivel de consumo del alimento, el peso de los animales y una serie de parámetros hematológicos e inmunológicos.

Los resultados obtenidos demuestran que la dosis ensayada de DON modificó la respuesta vacunal, incrementando la respuesta humoral y celular producida por la vacunación con ovoalbúmina. Se produjo un aumento significativo de las IgA e IgG específicas antiovoalbúmina y un incremento de la proliferación linfocitaria tras estimulación específica con ovoalbúmina. Asimismo, el DON provocó una alteración en otros parámetros de la respuesta inmune de los animales, afectando las concentraciones totales de inmunoglobulinas. Se detectó un incremento significativo de los niveles totales de IgA e IgM totales, mientras que la IgG total no sufrió ninguna variación. Por otra parte, no se observó ninguna alteración en el consumo de alimento, ni en el peso de los animales así como en los parámetros hematológicos estudiados.

M. Micología Animal

M1. Evaluación del efecto sinérgico de extractos de Rutáceas y ácidos orgánicos sobre la microbiota intestinal de cerdos de engorde

M^a Angeles Calvo¹, Carlos Shiva¹, Carles Adelantado¹, María Rodríguez¹, Nuria Guiu¹, Leonardo Arosemena¹, Pere Costa-Batllo²

¹Dpt. Sanitat i Anatomia Animals. Fac. Veterinària U.A.B. Bellaterra;

²Esc. Sup. d'Agricultura de Barcelona, UPC, Barcelona. España

La adición de extractos naturales o de sus mezclas con ácidos orgánicos a los piensos, puede determinar cambios no deseables en la microbiota intestinal de los animales que consuman dichos piensos.

El objetivo fundamental de este estudio es evaluar el efecto sinérgico de extractos de Rutáceas y ácidos orgánicos sobre la microbiota intestinal de cerdos de engorde, comparando los resultados con los obtenidos frente a animales control.

El estudio se llevó a cabo a lo largo del año 2004 con 120 cerdos híbridos (Landrace, Largo White, Pietrain), repartidos en 30 corrales. Como alimentación se utilizó un pienso basal único desde el inicio del estudio. A los animales se les administró un pienso suplementado con 1.000 ppm de extractos de Rutáceas con una mezcla de ácidos orgánicos. Se realizaron 10 réplicas. Asimismo se mantuvo un grupo de animales control a los que no se les administró suplemento alguno.

La duración del estudio fue de 84 días, tomándose seis muestras rectales mediante hisopos estériles con un intervalo de 14 días. Las muestras fueron remitidas en condiciones de refrigeración al laboratorio, en el que se procedió al recuento total de hongos filamentosos y levaduras, así como a su identificación.

El medio de cultivo utilizado fue agar Sabouraud con glucosa al 2%, adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina. Las condiciones de incubación fueron de 3-5 días a 28 °C.

Los resultados obtenidos permiten señalar que la adición del extracto de Rutáceas y ácidos orgánicos favorece la presencia levaduras de forma significativa frente a los resultados obtenidos en el grupo de animales control, observándose una disminución de la presencia de hongos filamentosos.

M2. *Chaetomium* sp. posible causa de infertilidad en una yegua

Jordi Miró¹, Ester Taberner¹, Carles Adelantado², M^a. Angeles Calvo²

¹Departament de Medicina i Cirurgia Animals. ²Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), España

Se presenta un caso clínico de infertilidad en una yegua, remitido al Servicio de Reproducción Equina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autònoma de Barcelona. La yegua había presentado lesiones en la zona craneal de la vagina como consecuencia de la primera cópula. Después de su recuperación fue inseminada artificialmente en varias ocasiones, sin éxito. La exploración por ultrasonidos permitió observar un cuerpo hemorrágico en el ovario izquierdo y un útero y vagina normales. Asimismo se detectó la presencia de imágenes hipoeogénicas anómalas en la parte craneal de la vagina. Una segunda evaluación ultrasónica a los seis días, mostró un cuerpo lúteo en el ovario izquierdo y una imagen similar en la vagina. La exploración vaginoscópica puso en evidencia una vagina normal. Estas observaciones sugieren que la imagen ecográfica anormal implica sólo al cérvix. Se indujo el estro con la administración de prostaglandinas y la dinámica folicular se evaluó mediante ultrasonidos. La palpación transvaginal del cérvix evidenció fibrosis y un divertículo ventral. La citología uterina permitió visualizar neutrófilos, células bacterianas y algunas estructuras semejantes a elementos fúngicos. A partir de hisopos estériles se procedió a tomar muestras vaginales que se sembraron en medios de cultivo con el fin de favorecer el aislamiento de los posibles microorganismos presentes. Los cultivos desarrollados fueron identificados como compatibles con *Streptococcus equi* sub. *zooepidermicus* en el caso de las bacterias y con cepas de género *Chaetomium* sp. en el caso de los cultivos fúngicos, por lo que puede inferirse que la cepa de *Chaetomium* aislada puede ser la causa posible de la infertilidad. La cepa de *Chaetomium* puede tener su origen en el material que constituye la cama y el establo.

C. Micología Clínica

C1. Evolución de los niveles de 1-3 β -glucano y galactomanano en una paciente con aspergilosis invasora debida a onicomiosis subungueal

Almudena Alhambra¹, Juan-Marcos Moreno², María Soledad Cuétara³, María Dolores Moragues⁴, María Cruz Ortiz⁵, José Pontón⁶, Amalia del Palacio¹

Servicios de ¹Microbiología, Unidad de Micología, ²Medicina Interna y ³Hematología, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, España; ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid, España; Departamentos de ⁵Enfermería I e ⁶Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

La aspergilosis invasora es una infección grave en pacientes con neutropenia profunda y prolongada. Generalmente se inicia tras la inhalación de conidias que establecen un foco pulmonar. El diagnóstico serológico se basa en la detección de galactomanano (GM), pero recientemente se ha descrito que también puede beneficiarse de la detección de 1-3 β -glucano (BG). En esta comunicación se describe la evolución de los marcadores serológicos BG y GM en una paciente de 69 años que desarrolló una aspergilosis invasora durante la fase de neutropenia inducida por la quimioterapia administrada para el tratamiento de un linfoma no-Hodgkin de alto grado. El día 13 de hospitalización, la paciente desarrolló fiebre y se aisló *Staphylococcus aureus* en el hemocultivo. El día 18 se observó una inflamación en la región subungueal del dedo meñique de la mano izquierda. En el material obtenido de la lesión se observó un hongo filamentosos que se identificó por cultivo como *Aspergillus fumigatus* y mediante técnicas inmunohistoquímicas. La paciente fue tratada con voriconazol intravenoso (8 mg/kg/día) y caspofungina (70 mg el primer día y 50 mg/día los siguientes). Se detectaron niveles elevados de GM (índice 0,927) y BG (542,37 pg/ml) los días 18 y 19 de hospitalización, que descendieron los días siguientes hasta negativizarse. El escáner de alta resolución (HRCT) del pulmón no mostró cambios radiológicos durante el ingreso. Al alta, la paciente continuó tratamiento con voriconazol oral (200 mg dos veces al día) durante 10 días. El seguimiento durante cinco meses puso de manifiesto la resolución de la onicomiosis y la ausencia de aspergilosis invasora, ya que los marcadores serológicos y el HRCT pulmonar fueron negativos.

La onicomiosis por hongos no-dermatofitos puede ser la puerta de entrada de una micosis profunda en pacientes oncohematológicos, como ha sido descrito con *Fusarium solani*. En nuestra paciente, la puerta de entrada de la infección fue probablemente la onicomiosis que se produjo tras el traumatismo realizado durante la manicura realizada el día previo al acondicionamiento. La diseminación de la infección se demostró por la positividad de los dos marcadores serológicos, pero probablemente no tuvo consecuencias clínicas por la recuperación de la neutropenia y la rápida instauración del tratamiento antifúngico. Que sepamos, éste es el primer caso en el que una onicomiosis por *A. fumigatus* reúne los criterios de la EORTC/MSG para ser considerada una aspergilosis invasora, ya que en tres sueros se demostró un índice de GM >0,500. Los niveles de GM se correlacionaron muy bien con los de BG, lo que refuerza aún más la utilidad de estos marcadores en el diagnóstico de la aspergilosis invasora.

C2. Biopelículas del género *Candida* sobre catéteres. Comparación de dos métodos cuantitativos

Dolors Estivill¹, Álvaro Torres-Lana², Ángeles Arias², M^o Pilar Arévalo²
¹Althaia. Centre Hospitalari de Manresa. Barcelona; ²Medicina Preventiva. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Tenerife. España

Introducción: Los catéteres tienen un papel cada vez más importante en los cuidados médicos. La infección es una de las complicaciones más frecuentes asociada a su inserción y mantenimiento, dando lugar a incrementos en la morbilidad, mortalidad y gasto asistencial.

Objetivo: Evaluar la capacidad de formación de biopelículas del género *Candida* en la superficie de catéteres medida por dos métodos espectrofotométrico y unidades formadoras de colonias por ml.

Material y métodos: Se emplearon 79 aislados clínicos de levaduras del género *Candida*: 23 *C. albicans*, 23 *C. parapsilosis*, 17 *C. glabrata* y 16 *C. tropicalis* y el ensayo se realizó sobre catéteres de tres materiales sintéticos distintos, poliuretano, cloruro de polivinilo (PVC) y teflón. Los catéteres se cortaron en segmentos de 1 cm. y cada segmento se puso en contacto durante 90 minutos con un inóculo de cada una de las cepas, ajustado a una densidad óptica de 1.0 medido a 540 nm de longitud de onda. Después de tres lavados con PBS, para eliminar las levaduras no adheridas, los catéteres se incubaron a 35^o durante 72 horas en un medio líquido de Sabouraud enriquecido con galactosa para la producción de biopelículas. Cada catéter se resuspendió en 2 ml de PBS y se agitó con un Vortex a la máxima velocidad para desprender las levaduras adheridas.

Se retiró el catéter y a partir de esta suspensión se determinó el valor de la formación de biopelículas por dos métodos: recuento de viables expresado en ufc/ml y medida de la absorbancia mediante espectrofotómetro expresado en unidades de absorbancia. Los resultados se transformaron a logaritmo neperiano y fueron corregidos según la superficie de contacto del biomaterial.

Resultados: *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* presentaron la mayor formación de biopelículas frente a teflón. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de producción de biopelículas de las tres especies al comparar el teflón con PVC y con poliuretano, pero no se demostraron estas diferencias entre poliuretano y PVC. Con *C. glabrata*, se determinó la mayor formación de biopelículas con PVC pero sin demostrarse diferencias significativas entre los tres biomateriales.

Por ambos métodos se obtuvieron los mismos resultados en todas las especies.

Conclusión: Al comparar los valores de absorbancia y unidades formadoras de colonias/ml para evaluar la formación de biopelículas sobre catéteres se obtuvo una buena correlación entre los dos métodos para las especies de *Candida* analizadas.

C3. Colonización por *Malassezia* en catéteres intravasculares

A. Bas, E. Roselló, V. Rodríguez, I. Gasser, A.M. Planes
Servicio de Microbiología. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona. España

Objetivo: Conocer la incidencia de colonización por levaduras del género *Malassezia* de los catéteres intravasculares (CIV) recibidos para cultivo en el laboratorio de microbiología del Hospital Vall d'Hebron en el periodo comprendido entre enero de 1998 y mayo de 2006.

Material y métodos: Durante el periodo revisado se cultivaron 27.050 puntas de catéter. La técnica de cultivo empleada es la semicuantitativa de Maki (criterio de positividad >15 unidades formadoras de colonias). Los 2-5 cm distales del CIV son rodados por la superficie de una placa de agar con sangre (AS). Posteriormente se introducen en un tubo con agua de peptona, agitando 5-10 segundos. Ambos medios se incuban a 35-37 °C, las placas de AS en atmósfera del 5-10% CO₂. La lectura se realiza a las 24, 48 y 72 horas. Las microcolonias que crecen en la placa de AS a las 72 horas de incubación y que en la tinción de Gram se observa morfología levaduriforme se subcultivan en 2 medios de agar Sabouraud, uno de ellos con 3 gotas de aceite de oliva. El agua de peptona se subcultiva en AS cuando se observa turbidez y la lectura de Maki es negativa.

Resultados: De los 27.050 CIV cultivados 5.951 (22 %) fueron positivos. En 322 (5,4 %) de los positivos se aislaron levaduras, siendo el 8,4 % (27/322) de ellas *Malassezia*. En el 18,5 % (5/27) de ellos se obtuvo un cultivo mixto (estafilococo plasmocoagulasa negativa, 4; corinebacteria, 1). Todas las cepas de *Malassezia* se detectaron tras al menos 72 horas de incubación de las placas de AS, en forma de microcolonias, y en los subcultivos en Sabouraud únicamente crecieron en el medio con aceite. Las 27 cepas de *Malassezia* corresponden a 26 pacientes pediátricos. Se trató de recién nacidos ingresados en el área de cuidados intensivos de neonatología del hospital. La media de edad gestacional fue de 21 semanas, siendo en el 75 % de los casos < 30 semanas. La media del peso al nacer fue de 1.130 gramos. Todos los catéteres con cultivo positivo correspondieron a vías de perfusión de nutrición parenteral (tipo Jonathan). En el 14 % de las historias clínicas revisadas el cultivo positivo supuso un cambio en la actitud terapéutica (inicio de un antifúngico o prolongación de la duración de uno previo).

Conclusiones:

- 1) La incidencia de colonización de los CIV por *Malassezia* es del 0,45%.
- 2) Todos los pacientes fueron recién nacidos ingresados en cuidados intensivos de neonatología.
- 3) La presencia de sustancias lipídicas que provienen de la nutrición parenteral en el CIV y su efecto en el cultivo de AS permite, probablemente, el desarrollo lento de esta levadura lipofílica.
- 4) Para detectar su crecimiento es necesaria una incubación de durante un mínimo de 72 horas.

C4. Adhesión tumoral al endotelio sinusoidal hepático de ratón inducido por diferentes cepas de *Candida albicans*

Andoni Ramirez¹, Natalia Gallot², Ana Abad¹, Vanesa Huerga¹, David Ochoa¹, Lorea Mendoza², Fernando Vidal-Vanaclocha², Fernando Luis Hernando¹

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco. 48080 Bilbao; ²Dominion Pharmakine S.L. Parque Tecnológico de Bizkaia. Edificio 801. 48160 Derio. España

Candida albicans es un hongo dimórfico comensal habitual en animales de sangre caliente pero que es capaz de diseminar hematógicamente y originar serios problemas en pacientes inmunocomprometidos. El primer lugar donde se unen los microorganismos al entrar en el torrente sanguíneo son las células endoteliales, las cuales poseen entre otros un receptor de manosa encargado de eliminar agentes infecciosos y moléculas circulantes del torrente sanguíneo y de desencadenar una respuesta proinflamatoria mediada por citoquinas. También se ha descrito que la síntesis de citoquinas proinflamatorias está influenciada por las características y fisiología del microorganismo (4). La adhesión de células circulantes de cáncer a las células endoteliales capilares es un factor crucial en la retención inicial de las células cancerígenas en órganos específicos (3).

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto que cepas de *Candida albicans* con virulencia variable causaron en la adhesión y respuesta proinflamatoria de células del melanoma B16 al endotelio sinusoidal hepático (ESH) de ratón.

Para ello se utilizaron 4 cepas de *C. albicans* procedentes de diferentes aislamientos *C. albicans* UPV 1413 aislada de una candidiasis diseminada, *C. albicans* UPV 1360 de invasiva candidiasis, *C. albicans* NCPF 3153 (ser A) del National Collection of Pathogenic Fungi, y un mutante deficiente en germinación de la cepa *C. albicans* NCPF 3153 denominado CA2.

Para conocer si las variaciones fueron debidas a células vivas del hongo o a componentes celulares se ensayaron también células muertas por calor o metaperiodato sódico. Los ensayos de adhesión del melanoma B16 al ESH se llevaron a cabo usando un método cuantitativo basado en la medida de fluorescencia (5), y la concentración de TNF- α se cuantificó mediante ELISA.

Los resultados mostraron que las cepas obtenidas de aislamientos clínicos causaron un incremento significativo de la adhesión del melanoma B16 al ESH cuando se comparó con el control y la cepa de referencia. También es importante reseñar que las variaciones estuvieron relacionadas con el estado morfológico del microorganismo.

Referencias:

1. Apostolopoulos V, McKenzie FC. Current Molecular Medicine 2001; 1:469-479.
2. Blackwell TS, Christman JW. Br J Anaesth 1996; 77:110-117.
3. Nicolson GL. Cancer Metastasis Rev 1998; 7:143-188.
4. Orozco AS, Zhou X, Filler SG. Infect Immun 2000; 68:1134-1141.
5. Vidal-Vanaclocha F, Amezcaga C, Asumendi A, Kaplanski G, Dinarello CA. Cancer Res 1994; 54:2667-2672.

C5. *Malassezia globosa* es el agente etiológico principal de la foliculitis por *Malassezia*

Carmen Aspiroz¹, Antonio Rezusta², Mariano Ara³, Víctor Alcalde³, Yolanda Gilaberte⁴, Luis Charlez⁵, Miguel Toledo¹, M^a José Aldea¹

¹Servicio de Microbiología. Hospital Royo Villanova (HRV). Zaragoza; ²Hospital Miguel Servet. Zaragoza; ³Servicio de Dermatología. CME Grande Covián. Hospital Miguel Servet. Zaragoza; ⁴Hospital San Jorge. Huesca. ⁵HRV. Zaragoza

Introducción: El género *Malassezia* está compuesto por levaduras lipófilas. Principalmente cuatro especies son las que se han relacionado con patología humana: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. restricta* y *M. sympodialis*, siendo el resto más infrecuentes y con menor peso patogénico (exceptuando *M. pachydermatis* en animales). En cuanto a los procesos dermatológicos relacionados, el más relevante es la pitiriasis versicolor, cuyo agente etiológico principal es *M. globosa*. Respecto a la foliculitis por *Malassezia* (FM), la revisión de la bibliografía no aporta datos relevantes acerca de su etiología, ya que en la mayoría de los casos descritos no se realizó cultivo, o bien no se completó la identificación a nivel de especie. Es objetivo de este trabajo presentar una serie de casos de FM y analizar los resultados clínicos y microbiológicos.

Material y métodos: Se analizaron los casos compatibles con FM diagnosticados en el laboratorio de Microbiología (LM) del HRV de Zaragoza durante 5 años. Los pacientes venían remitidos por Dermatología, en cuyo servicio se sentaba el diagnóstico de foliculitis y se remitía al HRV. Se anotaban los siguientes datos: tipo y descripción de las lesiones, extensión, localización anatómica, prurito, proceso de base, tratamientos administrados y terapia administrada tras el diagnóstico de FM. La toma de muestra se realizó en el LM mediante la punción de las lesiones. El material extraído se extendía sobre un porta, para tinción de Giemsa, y en medio de Dixon modificado y tioglicolato (35°C). Este último se subcultivaba en aerobiosis y anaerobiosis. Si había más material, se realiza-

ban otras extensiones y siembras. La identificación de *M. globosa* se realizó a partir del medio de Dixon-m siguiendo criterios previamente descritos (1,2)

Resultados: Se obtuvieron 15 casos compatibles con FM. En todos ellos, la tinción de giemsa mostró reacción de leucocitos polimorfonucleares y numerosas levaduras compatibles con *M. globosa*. Las FM se detectaron en 9 mujeres y 6 varones. La localización principal fue el tronco. De todos los casos, en 12 creció *M. globosa* (en cultivo puro en nueve de ellos, mixto con flora grampositiva en tres de ellas). En tres de ellos no se obtuvo crecimiento de *Malassezia*. En 9 casos se constató la administración posterior de antifúngicos.

Discusión: *M. globosa* parece constituir el agente etiológico principal de la FM. La tinción de giemsa es eficaz en su diagnóstico microbiológico, aunque el cultivo ayuda notablemente a corroborarlo.

Referencias:

1. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. J Mycol Med 1996; 6: 103-10.
2. Aspiroz C, Moreno LA, Rezusta A, Rubio C. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on human normal skin: correspondence with *M. globosa*, *M. sympodialis* and *M. restricta*. Mycopathologia. 1999; 145: 69-74.

C6. Rentabilidad de la detección de Galactomanano y 1,3- β -D-glucano en el diagnóstico de la aspergilosis invasiva

Ramirez M.¹, Castro C.¹, Aller A.I.², Ruiz M.³, Palomares J.C.¹, Aznar J.³, Martín-Mazuelos E¹

¹Servicio de Microbiología. H.U. de Valme. Sevilla. ²Servicio de Microbiología Hospital de Jerez. ³Servicio de Microbiología H.H.U.U. Roció

Objetivo: Evaluar la eficacia de la detección de Galactomanano (GM) y 1,3- β -D glucano (G) para el diagnóstico de Aspergilosis invasiva (AI) en pacientes oncohematológicos.

Materiales y métodos: Se incluyeron en el estudio todos los pacientes ingresados en las unidades de Hematología de los Hospitales Universitarios Virgen de Valme y Virgen del Rocío y en él, desde enero de 2004 a junio 2006, que sufran algún tipo de evento de riesgo de ser colonizados por *Aspergillus* spp. y concurren en ellos factores de riesgo para desarrollar una AI. Para la clasificación de los pacientes se utilizaron los criterios de AI propuestos por el Grupo de Colaboración en Infecciones Fúngicas Invasoras (IFICG de la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC) en cooperación con los miembros del Grupo de Estudio de Micosis (MSG) del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID) del National Institute of Health. Los sueros fueron analizados prospectivamente dos veces por semana desde que ingresan en el estudio, utilizando el kit comercial de Platelia® Aspergillus EIA (Biorad) que consiste en una técnica de ELISA doble sándwich que utiliza un Ac monoclonal EBA-2. A aquellos pacientes que tuvieron un resultado positivo de GM (2 o mas muestras $\geq 0.5\text{ng/ml}$) y con alta sospecha clínica AI, se les realizó de forma retrospectiva la detección de 1,3- β -D-glucano mediante Fungitell™ Assay (Cape Cod Incorporated). Los resultados obtenidos de 1,3- β -D-glucano se categorizaron de la siguiente forma: 0-59 pg/ml negativo, 60-79 pg/ml probable positivo, y >80 pg/ml positivo. Ambas técnicas fueron realizadas siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Resultados: Se incluyeron en el estudio 866 sueros pertenecientes a 109 pacientes. La clasificación de los pacientes según la EORTC-NIAID fue de: 104 AI posibles, 4 probables y 1 probada. Obtuvimos un resultado positivo de ambas técnicas, GM y G, en 2 pacientes con AI probable siendo el G la primera en hacerse positiva en ambos casos. Los valores de GM oscilan entre 0.5/1.4 en el paciente 1, y 0.5/1.15 en el paciente 2. Las cifras de G oscilan fueron 91.19 en paciente 1, y 154.37/114.59 en paciente 2. En los 3 casos restantes solo fue positivo el G.

Conclusión: Es necesaria la conjunción de más de un parámetro microbiológico para el diagnóstico de la AI siendo en nuestro estudio más rentable la detección de 1,3- β -D-glucano. No obstante sería necesario disponer de un mayor número de pacientes con AI probada y probable.

T. Taxonomía

T1. Capacidad ocratoxígena de especies de *Aspergillus* de las secciones *Circumdati* y *Flavi*

M. Lourdes Abarca, Neus Planas, Romualdo Cabañas, M. Rosa Bragulat, F. Javier Cabañas
 Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina nefrotóxica, carcinógena, teratógena e inmunotóxica, elaborada por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En el género *Aspergillus*, la producción de OTA se asocia a *A. ochraceus* y otras especies de la sección *Circumdati* y a especies de la sección *Nigri*. Las especies ocratoxígenas *A. albertensis* y *A. alliaceus* clásicamente incluidas en la sección *Circumdati* pertenecen en la actualidad a la sección *Flavi*.

En este trabajo se ha estudiado la capacidad ocratoxígena de 80 cepas de la sección *Circumdati* y 14 de la sección *Flavi* aisladas principalmente de sustratos vegetales (cereales, piensos, café, uvas) y procedentes de colecciones de cultivo.

La capacidad productora de OTA se determinó siguiendo el método previamente descrito en nuestro laboratorio. Las cepas se sembraron en tres puntos en los medios CYA (Czapek Yeast Extract) y YES (Yeast Extract sucrose) y se incubaron a 25 °C durante 7 días. Mediante un sacabodados de vidrio de aproximadamente 3 mm de diámetro se obtuvieron tres bocados de las colonias que fueron extraídos con 500 µl de metanol. La detección y cuantificación de OTA en los extractos filtrados se realizó mediante HPLC.

Entre los resultados obtenidos destacaremos que 28 cepas (35%) de la sección *Circumdati* elaboraron OTA, perteneciendo la mayoría (20 cepas) a la especie *A. ochraceus*. Todas las cepas de la sección *Flavi* estudiadas (*A. alliaceus* y *A. albertensis*) demostraron ser ocratoxígenas. La capacidad de elaborar OTA en las especies detectadas en este estudio ha sido citada previamente por diversos autores aunque en algunos casos su consistencia ha sido cuestionada. La producción de OTA se detectó en los dos medios de cultivo ensayados, excepto en 5 cepas que únicamente elaboraron OTA en el medio YES. La concentración de micotoxina elaborada fue significativamente superior en el medio YES que en el medio CYA, por lo que el medio YES sería el medio de elección para detectar la capacidad ocratoxígena de las especies estudiadas.

T2. Aplicación de los intrones del grupo-I detectados en el gen rDNA 28S a la caracterización de aislados del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*

Marcela Márquez¹, Eugenia Morán¹, Marta Montero¹, Enrique A. Iturriaga², Enrique Quesada-Moraga³, Cándido Santiago-Álvarez³, Enrique Monte¹ y Rosa Hermosa¹
¹Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca; ²Área de Genética, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca; ³Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Universidad de Córdoba, Córdoba, España

En la producción agrícola se empieza a implantar una aplicación de organismos con actividad insecticida como una alternativa a los agroquímicos en el control de plagas, cuyos residuos tóxicos perjudican el medio ambiente y la salud, tanto del agricultor como del consumidor. El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* se está usando como agente de control biológico de insectos.

En este trabajo, hemos obtenido y analizado las secuencias de los intrones del grupo-I presentes en los genes rDNA 28S para determinar la diversidad genética existente en una colección autóctona de 26 aislados de *M. anisopliae*, previamente seleccionados como agentes de biocontrol. El extremo 3' de los genes rDNA 28S se amplificó por PCR en los 26 aislamientos estudiados. El tamaño de los productos de PCR varió desde 0,8 a 3,4 kb. La secuenciación de estos productos de PCR permitió detectar, en estos genes rDNA, 4 puntos de inserción de intrones: Ec1921, Ec2066, Ec2449 y Ec2563 (numeración referida a un clon de *Escherichia coli*). La presencia/ausencia de estos intrones distribuyó los 26 aislamientos de *Metarhizium* en 7 genotipos diferentes. Un 34,6% de los aislamientos no poseían intrones, un 15,4% tenían uno, un 11,5% tenían dos y un 38,5%, tres. En los sitios Ec1921 y Ec2449, las inserciones fueron más frecuentes. En 11 de los 26 aislamientos, se detectó inserción en el sitio Ec2563; y en 10 de ellos, el fragmento insertado era anormalmente grande (1754 pb), los intrones del grupo-I suelen tener un tamaño de unos 500 pb. El árbol NJ obtenido tras el análisis filogenético de estas secuencias mostró un cuerpo con 4 grupos principales que corresponden a los cuatro puntos de inserción de intrones. También se observó, tras el análisis, un alto polimorfismo en el punto de inserción Ec2449, apareciendo tres subgrupos filogenéticamente estables.

T3. Caracterización morfológica y fisiológica de *Penicillium expansum*

M. Rosa Bragulat, Romualdo Cabañas, F. Javier Cabañas
 Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Penicillium expansum Link (1809) es una especie conocida sobre todo por ser una de las principales causantes de patogenicidad en frutas y por su capacidad de elaborar micotoxinas, como la patulina y la citrinina. Perteneció al subgénero *Penicillium*, que a nivel taxonómico es probablemente el más complejo de este género fúngico. La taxonomía del género *Penicillium* tradicionalmente se basa en la morfología colonial en diversos medios de cultivo y en las características microscópicas. Actualmente, también se utilizan otros criterios como los fisiológicos, químicos o de metabolismo secundario, ecológicos y moleculares, para llegar a establecer nuevas especies o clarificar la identidad de otras estudiadas sólo morfológicamente.

El objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar 118 cepas de *P. expansum* aisladas de manzanas, mediante criterios morfológicos clásicos, macroscópicos y microscópicos, en diversos medios de cultivo y criterios fisiológicos, como el crecimiento con Creatina como fuente de nitrógeno y la respuesta a la reacción de Ehrlich (detección del indol o de metabolitos estructuralmente relacionados).

Para ello se sembraron las cepas en los siguientes medios de cultivo y condiciones: CYA (Agar Czapek extracto de levadura) a 15 °C, 25 °C, 30 °C y 37 °C, MEA (Agar extracto de malta al 2%), YES (Agar extracto de levadura sacarosa) y PDA (Agar patata dextrosa) a 25 °C; CREA (Agar creatina sacarosa) y CSN (Agar creatina sacarosa neutro) a 25 °C. Las lecturas se efectuaron a los 7 días de incubación y para los medios CREA y CSN también a los 14 días. La reacción de Ehrlich se ensayó a los 7 días de incubación a partir de los cultivos obtenidos en CYA a 25 °C. De los resultados obtenidos podemos destacar que los aislamientos de *P. expansum* se desarrollan bien a 15 °C en CYA y a 25 °C en los distintos medios de cultivo y con escaso o nulo crecimiento en CYA a las temperaturas de 30 y 37 °C, respectivamente. En los medios CREA y CSN, todas las cepas han presentado buen crecimiento, y con capacidad de elaborar ácido (viraje a amarillo) y base (viraje a violeta) a partir de la sacarosa y la creatina, respectivamente. En ambos medios se puede detectar a los 7 días la formación de ácido, si bien en CREA se observa una mayor producción. Respecto a la formación de base se han presentado diferencias entre ambos medios dependiendo del tiempo en el que se realiza la lectura. En CREA sólo el 29% de las cepas basicifican el medio de cultivo a los 7 días de incubación aumentando al 68% a los 14 días. En cambio en CSN todas las cepas producen, en mayor o menor proporción, metabolismo básico detectable a los 7 días de incubación. Finalmente, cabe destacar que todas las cepas estudiadas han presentado positiva la reacción de Ehrlich.

T4. Caracterización molecular de especies ocratoxígenas de *Aspergillus* sección *Nigri*

Alexandre Esteban, M. Lourdes Abarca, M. Rosa Bragulat, F. Javier Cabañas
 Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Los miembros de *Aspergillus* sección *Nigri* se consideran hongos responsables del deterioro de gran variedad de alimentos. *Aspergillus niger* se utiliza como fuente de enzimas extracelulares y ácidos orgánicos. Estos productos poseen la categoría GRAS (*Generally Recognized as Safe*) de la FDA y, por lo tanto, son utilizados ampliamente en la industria alimentaria. Sin embargo, dentro de esta sección algunas especies del agregado *A. niger* y *A. carbonarius* se han descrito como productoras de ocratoxina A (OTA), una micotoxina nefrotóxica que supone un riesgo potencial para el hombre y los animales. Actualmente la taxonomía de esta sección presenta ciertos interrogantes, especialmente el número de taxones que componen el agregado *A. niger*. Las especies de este agregado son indistinguibles mediante criterios morfológicos y algunos autores han dividido este grupo en dos o más especies siguiendo diferentes criterios moleculares. El análisis de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de la región ITS-5,8S rDNA permite la división de los miembros del agregado *A. niger* en dos patrones (N y T). Con posterioridad múltiples trabajos han puesto de manifiesto que las cepas estudiadas productoras de OTA presentan un patrón de RFLP tipo N.

Para aportar un mayor conocimiento de las especies ocratoxígenas de la sección *Nigri*, el objetivo del presente trabajo ha sido llevar a cabo la caracterización molecular de cepas del agregado *A. niger* y *A. carbonarius*, productoras y no productoras de OTA y de diferentes orígenes, mediante RFLP, RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) y secuenciación de DNA ribosomal.

En este trabajo todas las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* en las que se había descrito producción de OTA presentaban un patrón N, mientras que ninguna con patrón de RFLP T era capaz de producir OTA. Mediante el análisis de la secuenciación de las regiones ITS-5,8S rDNA

y D1/D2 del 28S rDNA y mediante RAPD las cepas se diferenciaron en dos grupos que se correspondían con los dos tipos de patrón de RFLP establecidos previamente en nuestro laboratorio (N y T). Esta diferenciación en ambos patrones marcaría una división molecular sólida en el agregado *A. niger*. El grupo que contenía las cepas con patrón N presentaba una gran variabilidad pero no se pudieron diferenciar cepas productoras y no productoras de OTA. En ningún caso se observó una relación entre la distribución genotípica de estas cepas mediante las técnicas estudiadas y su origen de aislamiento.

Todas las cepas de *A. carbonarius* estudiadas, excepto una cepa (A-1082), se mostraron coespecíficas mediante el análisis la región ITS-5,8S rDNA. La cepa A-1082 se diferenció nuevamente del resto de cepas estudiadas mediante RAPD. Esta cepa no presentaba producción de OTA y pertenecería a una nueva especie propuesta en la sección *Nigri*, denominada "*A. ibericus*".

T5. Efecto de la actividad de agua en la producción de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* y el agregado *Aspergillus niger*

Alexandre Esteban, M. Lourdes Abarca, M. Rosa Bragulat, F. Javier Cabañas

Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina nefrotóxica aislada naturalmente de una gran variedad de alimentos. Algunas especies pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* se han descrito como productoras de OTA y además representan la principal fuente de contaminación por OTA de diversos alimentos, tales como uva, uvas pasas y vino. Sin embargo, muy pocos estudios se han llevado a cabo para valorar la influencia que pueden ejercer los factores abióticos sobre la producción de esta micotoxina. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la influencia de diferentes valores de actividad de agua (a_w) sobre el crecimiento y la producción de OTA de 5 cepas pertenecientes al agregado *Aspergillus niger* y 4 de *A. carbonarius* productoras de OTA y aisladas de diferentes sustratos. La producción de OTA se determinó en dos medios de cultivo (CYA y YES) en un rango de a_w entre 0,78 y 0,99. Las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* se incubaron a 25 °C y las de *A. carbonarius* a 15 °C y 30 °C. La producción de micotoxina se determinó y cuantificó a los 5, 10, 15, 20, y 30 días de incubación siguiendo un método previamente descrito en nuestro laboratorio en el que se realiza la detección y cuantificación de la micotoxina mediante HPLC.

En todos los casos la producción de OTA se observó en un margen más estrecho que el de crecimiento. Las cepas del agregado *A. niger* se desarrollaron entre 0,86 y 0,99 a_w mientras que la producción de OTA se detectó en el margen 0,90-0,99 a_w . Las cepas de *A. carbonarius* a 30°C se desarrollaron entre 0,82 y 0,99 a_w y se detectó micotoxina entre 0,86 y 0,99 a_w . Cuando la incubación se realizó a 15°C todas las cepas crecieron y elaboraron OTA entre 0,94 y 0,99 a_w en ambos medios de cultivo.

El medio de cultivo ejerció un importante papel en la cantidad de OTA producida. Las cepas de *A. carbonarius* elaboraron niveles de OTA más elevados en el medio CYA y las cepas del agregado *A. niger* en el medio YES, independientemente del valor de a_w estudiado. En relación a la temperatura de incubación, en general, las cepas de *A. carbonarius* produjeron niveles más altos de OTA a 15 °C que a 30 °C.

La producción máxima de OTA en el caso de las cepas del agregado *A. niger* se obtuvo en el rango 0,96-0,99 a_w en el medio YES a los 5-10 días de incubación. Las cepas de *A. carbonarius* produjeron los niveles más altos de OTA a 0,98-0,99 en el medio CYA a 15 °C.

Los resultados de este trabajo muestran, por lo tanto, que estas especies pueden crecer y producir OTA en un amplio margen de a_w . Este hecho confirmaría su contribución en la contaminación por OTA de diferentes alimentos debido a la existencia de condiciones ambientales que permitirían la producción de la micotoxina.

T6. Estudio del efecto del pH en la producción de ocratoxina A por especies ocratoxígenas de *Aspergillus* sección *Nigri*

Alexandre Esteban, M. Lourdes Abarca, M. Rosa Bragulat, F. Javier Cabañas

Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

La contaminación por micotoxinas supone un importante riesgo sanitario para el hombre y los animales. La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina que se halla presente en una gran variedad de alimentos. Es nefrotóxica además de presentar efectos mutagénicos, teratógenos e inmunotóxicos tanto en el hombre como en los animales.

Desde la descripción de algunas especies de *Aspergillus* sección *Nigri* como productoras de OTA, éstas han adquirido una mayor importancia como especies productoras de micotoxinas. Además las especies inclui-

das en el agregado *A. niger* y *A. carbonarius* se han descrito como la principal fuente de contaminación por OTA en uva, uvas pasas y vino. El conocimiento de los parámetros ambientales que influyen en la producción de OTA puede contribuir a la prevención de la contaminación por esta micotoxina en diversos alimentos. Sin embargo, actualmente existen muy pocos estudios centrados en el estudio de estos factores abióticos. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el efecto del pH sobre la producción de OTA en 6 cepas pertenecientes al agregado *A. niger* y 4 a *A. carbonarius* productoras de OTA y con diferentes orígenes de aislamiento.

La producción de OTA se determinó en dos medios de cultivo (CYA y YES) en un rango de pH entre 2 y 10. Las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* se incubaron a 25 °C y las de *A. carbonarius* a 15 °C y 30 °C. La producción de micotoxina se determinó y cuantificó a los 5, 10, 15, 20, y 30 días de incubación mediante HPLC siguiendo un método de cuantificación descrito en nuestro laboratorio.

Las cepas del agregado *A. niger* y *A. carbonarius* fueron capaces de desarrollarse y producir OTA desde pH 2 a pH 10. Se observaron diferencias en cuanto a la producción de OTA en los dos medios de cultivo utilizados. Mientras que las cepas de *A. carbonarius* elaboraron niveles de OTA más elevados en el medio CYA, las cepas del agregado *A. niger* lo hicieron en el medio YES, independientemente del valor de pH estudiado. En el caso de las cepas del agregado *A. niger* La máxima producción de OTA se detectó en el medio YES entre pH 5 y pH 10, después de 5-10 días de incubación. Las cepas de *A. carbonarius* mostraron diferencias entre las dos temperaturas ensayadas (15 y 30 °C). Aunque se apreciaron ciertas diferencias respecto a la cepa estudiada, a 30°C la producción máxima de OTA se detectó a pH 2, 5 ó 7, mientras que a 15 °C las concentraciones máximas se detectaron en general a valores de pH más elevados (pH 5-7) que a 30 °C.

Estos resultados muestran que estas cepas son capaces de desarrollarse y producir OTA a un amplio rango de valores de pH, por lo que se confirma la contribución de estas especies en la contaminación por OTA en diferentes sustratos donde pueden aislarse de forma habitual.

T7. Estudio de la capacidad micotoxígena de cepas de *Penicillium verrucosum* aisladas de cereales

Romualdo Cabañas, M. Rosa Bragulat, F. Javier Cabañas

Grup de Micologia Veterinària, Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Penicillium verrucosum Dierckx es un hongo filamentos, contaminante de alimentos de consumo humano y animal, entre los cuales predominan los cereales. Su incidencia es mucho mayor en países de clima frío o templado y su importancia ha ido aumentando en los últimos años debido a su elevada capacidad productora de micotoxinas, entre las cuales destacan la ocratoxina A (OA) y la citrinina (CIT). Estas dos micotoxinas son de elevada importancia debido a sus efectos nefrotóxicos y porque pueden ser producidas también por varias especies del género *Aspergillus*. En España, hasta el momento, muy pocos estudios han conseguido aislar *Penicillium verrucosum* de productos alimenticios, y en ningún caso se ha demostrado su presencia en cereales.

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar la capacidad de producción de las micotoxinas ocratoxina A y citrinina, de un total de 81 cepas de *P. verrucosum* aisladas de cereales cultivados en nuestro país, principalmente trigo y cebada.

Para ello se sembraron todas las cepas en los medios de cultivo CYA (Agar Czapek extracto de levadura) y YES (Agar extracto de levadura sacarosa). A los 7 días de incubación a 25 °C se procedió a la extracción de las micotoxinas mediante una técnica descrita en nuestro laboratorio. Los extractos obtenidos se analizaron posteriormente mediante HPLC para la OA y TLC tanto para la CIT como para la OA.

De los resultados obtenidos podemos destacar que en el 94% de los aislamientos cultivados en medio YES se detectó CIT al ser analizados por TLC, frente al 85% en medio CYA. En el caso de la OA, mediante la técnica de TLC la presencia de la micotoxina se detectó en el 68% de los extractos obtenidos a partir del medio YES frente al 63% en CYA. Cuando el método utilizado para la detección de OA era HPLC, los porcentajes aumentaban, de manera que el 88% de los aislamientos en YES mostraban presencia de OA, mientras que en CYA se detectó en el 86% de los casos. Por último, cabe destacar que el rango de concentración de OA fue bastante amplio, de forma que en CYA la producción varió entre 0,44 - 50,83 µg/g según el aislamiento, mientras que en YES el rango de concentración se situó entre 0,62 - 91,13 µg/g.

O. Otros

O1. Estadísticas de uso de la web www.RevIberoamMicol.com (2000-2006)

Bikandi J, Ezkurra PA, San Millán R, Quindós G.

Revista Iberoamericana de Micología, Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Apdo. 699, E-48080 Bilbao

La versión electrónica de la Revista Iberoamericana de Micología está disponible en Internet desde junio de 2000 y permite acceder a todos los artículos publicados desde 1997 (volumen 14). Los suscriptores de la Revista pueden obtener todos los artículos en formato PDF libremente mediante el empleo de una contraseña. Además, todos los artículos son de libre acceso pasado un año desde su publicación.

En esta comunicación presentamos la evolución del número de usuarios que han visitado esta página electrónica y que muestra una marcada línea ascendente. En mayo de 2006 se llegaron a recibir 32.496 visitas de 25.917 usuarios diferentes. La duración del 84,2 % de las visitas es inferior a los 30 segundos, mientras que el 0,4 % supera la hora. El 75,1 % de los usuarios llega a nuestra página electrónica a través de buscadores (principalmente Google) y el 17,1 % tienen el sitio Web en su lista de favoritos o escribe la dirección completa. El resto del tráfico de visitantes proviene de enlaces presentes en otras páginas. En mayo, el buscador de artículos se utilizó 1.008 veces, a lo que hay que añadir los 2.136 ficheros PDF a los que se ha accedido a través de las búsquedas realizadas en PubMed por medio del servicio LinkOut. El origen geográfico de los visitantes es muy diverso: un 42 % proveniente de Estados Unidos, y el 31 % de países de habla hispana, destacando entre estos últimos el 8,9 % de México y el 8,8 % de España. Muchas de las visitas incluyen la descarga de alguno de los 460 artículos que están disponibles en formato PDF. El número de solicitudes de ficheros en formato PDF ha alcanzado los 39.063 mensuales. Los PDFs más solicitados se muestran en el póster. Existen cuatro libros editados por la Asociación Española de Micología, que son de libre acceso a través de la página electrónica de la Revista Iberoamericana de Micología. Los datos estadísticos correspondientes dichas publicaciones son tratados de forma separada al resto del sitio Web. Para cada uno de ellos, el número de visitantes diferentes durante el mes de mayo de 2006 ha sido el siguiente: "Guía de Bolsillo de la Aspergilosis Invasora", 454; "Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi", 751; "Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica", 4.953; "Hongos y Actinomicetos Alergénicos", 7.635. Estos datos nos hacen considerar que la versión electrónica de la Revista Iberoamericana de Micología es una herramienta ampliamente utilizada por los micólogos y otros científicos latinoamericanos interesados en la Micología y, especialmente, en la Micología Médica.

O2. Identificación de especies de *Candida* mediante la prueba molecular "Amplificación aleatoria de DNA polimórfico-Reacción en Cadena de la polimerasa" (RAPD-PCR), en una población mexicana

Laura Baires-Varguez¹, Luis Octavio Sánchez-Vargas^{2,3}, y Guillermo Quindós²

¹Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México;

²Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez,

Chihuahua, México; ³Laboratorio de Micología médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

Antecedentes: Se han desarrollado numerosos métodos para identificar aislamientos clínicos de *Candida* basados en propiedades fenotípicas. Habitualmente estos métodos son laboriosos y requieren entre 24 y 72 horas para identificar correctamente a los aislamientos.

Objetivo: Evaluar un método de amplificación aleatoria de ADN (RAPD-PCR) como una herramienta fácil y segura para la identificación de aislamientos clínicos de *Candida*.

Material y métodos: Un total de 92 aislamientos clínicos fueron estudiados: 20 *Candida albicans*, 14 *Candida glabrata*, 15 *Candida tropicalis*, 11 *Candida lusitanae*, 10 *Candida guilliermondii*, 5 *Candida parapsilosis*, 7 *Candida krusei*, 1 *Candida pelliculosa*, 2 *Candida rugosa* y 7 *Candida kefyr*. Además, se incluyeron 7 cepas de referencia que incluían *Candida dubliniensis*, *Candida rugosa* y *Candida colliculosa*. Se compararon la prueba bioquímica ID 32C con la prueba molecular mediante RAPD-PCR con el cebador OPE-18 (5'-GGACTGCAGA-3') (Gibco BRL, USA). Se determinaron la sensibilidad y especificidad, los valores predictivos positivos y negativos y se calculó el área bajo la curva ROC de la prueba molecular.

Resultados: Los patrones obtenidos con la prueba molecular y el iniciador OPE-18 para la identificación de aislamientos clínicos, fueron consistentes y los diferentes ensayos independientes revelaron reproducibilidad de las bandas. De acuerdo con nuestros resultados (se anexa tabla), el empleo del RAPD-PCR en la identificación de especies del género

Candida es de relevancia médica, ya que en comparación con el sistema ID 32C el RAPD es sensible y específico para muchas de las especies de importancia médica.

Tabla. Valores diagnósticos (en porcentaje) con el iniciador OPE-18.

Especie	S	E	VP	VP-	ROC
<i>C. albicans</i>	100	96	85	100	98
<i>C. dubliniensis</i>	0	100	0	97 ⁸	NA
<i>C. glabrata</i>	100	100	100.00	100	100
<i>C. guilliermondii</i>	100	100	100.00	100	100
<i>C. kefyr</i>	87	100	100.00	98 ⁸	93 ⁸
<i>C. krusei</i>	100	98 ⁸	85.71	100	99 ⁴
<i>C. lusitanae</i>	100	97 ⁶	81.82	100	98 ⁸
<i>C. parapsilosis</i>	62 ⁵	100	100	96 ⁶	81 ³
<i>C. tropicalis</i>	100	100	100	100	100
<i>C. rugosa</i>	100	98 ⁹	50	100	NA
<i>C. pelliculosa</i>	100	98 ⁹	50	100	NA
<i>C. colliculosa</i>	100	98 ⁹	50	100	NA

S = Sensibilidad, E = Especificidad, VP+ = Valor predictivo positivo, VP- = Valor predictivo negativo, ROC = Área bajo la curva ROC; NA = No aplicable

Conclusiones: La prueba molecular RAPD-PCR con el primer OPE-18 es un método rápido, específico y sensible para la identificación de especies de *Candida* patógenas como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida pelliculosa*, *Candida rugosa* y *Candida kefyr*

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PI030662/2003 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

O3. Producción de biopelículas por aislamientos orales de *Candida* de pacientes mexicanos con y sin infección por el VIH

Luis Octavio Sánchez-Vargas^{1,2}, María Villar-Vidal², Pilar A. Ezkurra², Elena Eraso² y Guillermo Quindós²

¹Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez,

Chihuahua, México; ²Laboratorio de Micología médica,

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

Antecedentes: La producción de biopelículas puede ser un factor de virulencia de algunas especies de *Candida* y estar asociado a diferentes cuadros clínicos de candidiasis oral y diseminada.

Objetivo: Comparar la capacidad de producción in vitro de biopelículas por diferentes aislamientos orales de *Candida* y su potencial asociación a las características clínicas de la infección o colonización por *Candida* en personas con y sin infección por el VIH.

Material y métodos: Se incluyeron 180 aislamientos de *Candida* de 172 pacientes: 38 aislamientos de adultos con infección por VIH/Sida (32 *Candida albicans*, 3 *Candida glabrata* y 3 de otras especies), 36 aislamientos de 35 niños con infección por VIH+/Sida (32 *Candida albicans*, 2 *Candida tropicalis*, 1 *Candida parapsilosis*, 1 *Candida glabrata* y 3 de otras especies), 70 aislamientos de 63 adultos sin infección por VIH (38 *Candida albicans*, 5 *Candida tropicalis* y 27 *Candida glabrata*) y 36 aislamientos de 36 niños sin infección por VIH (30 *Candida albicans*, 4 *Candida tropicalis* y 2 *Candida glabrata*). Los aislamientos fueron identificados por métodos micológicos convencionales y crecidos en RPMI 1640 suplementado con glucosa para inducir la formación de biopelículas. La producción de biopelículas fue determinada midiendo la actividad metabólica de las células que forman la biopelícula utilizando un método colorimétrico basado en la reducción de un derivado del formazán (XTT), en el aparato BiosScreen C (Labsystems, Finlandia). Los aislamientos se clasificaron según la producción de biopelícula en: I, no productores (densidad óptica \approx 0'10); II, poco productores (densidad óptica 0'11-0'40); III, productores moderados (densidad óptica 0'41-0'77); y IV fuertes productores (densidad óptica \approx 0'78).

Resultados: Un 97⁸% de los aislamientos orales formaron biopelícula. El 78⁸% de los aislamientos de *Candida albicans* eran productores fuertes o moderados en comparación con los aislamientos de especies no-*Candida albicans* (56⁸% de los aislamientos eran productores moderados de biopelículas y el 21⁹% fuertes productores). La producción de biopelículas por aislamientos de otras especies fue variable: en *Candida glabrata*, 57⁵% y 18²% (productores moderados y fuertes, respectivamente) y en *Candida tropicalis*, 36⁴% y 63⁶% (productores moderados y fuertes, respectivamente). La mayor frecuencia de aislamientos que producían biopelículas más abundantes se observó en *Candida tropicalis* (7 de 11 aislamientos), sobre todo en aislamientos de adultos sin infección por VIH con estomatitis protéica.

Conclusiones: Los aislamientos orales de *Candida tropicalis* mostraron una alta capacidad de producir biopelículas que se relaciona con la presencia de estomatitis protéica.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos PI030662/2003 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

04. Análisis proteómico de “lipid rafts” de *Candida albicans*

María Insenser, César Nombela, Gloria Molero y Concha Gil
Dpto. Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

El estudio de las proteínas presentes en la superficie celular de *C. albicans* puede ser de gran interés para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y de posibles candidatos para diagnóstico y vacunación. Los “lipid rafts” son microdominios de membrana ricos en esfingolípidos y ergosterol. En eucariotas superiores, los “lipid rafts” están relacionados con importantes funciones biológicas como señalización celular, citoquinesis o respuesta a estímulos. En levaduras, los “lipid rafts” han sido implicados en el destino celular de las proteínas de superficie.

Estos microdominios son resistentes a detergentes no aniónicos y por esta característica se denominan “membranas resistentes a detergentes” (DRMs). En este trabajo se han obtenido las proteínas presentes en la fracción enriquecida en DRMs de *C. albicans*. Las muestras fueron separadas mediante ultracentrifugación en un gradiente de densidad y analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se han identificado 29 proteínas entre las que se encuentran marcadores de “lipid rafts” como son Pma1p y una proteína perteneciente a la familia Phr, Ecm33p, proteína de unión a GPI (Glicosfosfatidil inositol). También se han identificado proteínas relacionadas con la glicosilación, como las manosiltransferasas Mnn7p, Pmt2p y Mnt1p; con el metabolismo de lípidos, como Erg11p y Scs7p; y proteínas de choque térmico, como Ssa1p y Hsp90p. La mayoría de las proteínas identificadas en esta fracción se localizan membrana ya sea plasmática, mitocondrial, del aparato de Golgi o del retículo endoplásmico.

Muchas de las proteínas que se encuentran en membranas son muy hidrofóbicas y de alto peso molecular, y por ello, difíciles de analizar utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida. La muestra enriquecida en DRMs se está analizando mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Utilizando la técnica de iTRAQ (stable isotope method for relative protein quantification), se han comparado los patrones proteicos de DRMs de levaduras e hifas de *C. albicans*. El estudio de la expresión proteica diferencial entre ambas muestras puede aportar interesantes datos en el análisis de la transición dimórfica. Aprovechando que la técnica de iTRAQ nos permite cuantificar de forma relativa la presencia de una determinada proteína en 4 muestras diferentes simultáneamente, hemos tratado levaduras e hifas con metil- β -ciclodextrina, un agente desorganizador del colesterol, y, por tanto, de los “lipid rafts”. Aquellas proteínas que aparecen asociadas a esta fracción de DRMs deben disminuir su presencia en las muestras tratadas con respecto a las muestras sin tratar, indicando con ello su asociación con “lipid rafts”.

Resultados preliminares nos han permitido identificar alrededor de 100 proteínas en las diferentes muestras. Algunos de los marcadores típicos de “lipid rafts” disminuyen claramente en las muestras tratadas, y hemos identificado proteínas de expresión diferencial entre levaduras e hifas con funciones muy diferentes, como transporte de electrones y energía, destino celular, citoesqueleto y biogénesis de pared.

05. Queratitis por *Phoma glomerata*

Zoraida del Campo¹, Jaume Crespi¹, Patricia Miquel¹, Montserrat Español², Ferran Sánchez^{2,3}
Servicios de ¹Oftalmología y ²Microbiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; ³Facultad de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

Objetivos: Presentar el caso de una queratitis por *Phoma glomerata* en un varón de 50 años, diabético no insulinodependiente bien controlado con dieta, portador de lentes de contacto blandas.

Caso clínico: Inicialmente, el paciente consultó por un cuadro de queratitis en el ojo izquierdo que se orientó clínicamente de origen bacteriano. Se tomaron 2 muestras de raspado corneal para cultivos, que fueron negativos y se instauró empíricamente tratamiento con antibióticos tópicos reforzados con vancomicina y ceftazidima. Durante el primer mes de seguimiento se objetivó una progresiva remisión del infiltrado corneal, con permanencia de una opacificación corneal anterior, y se decidió añadir tratamiento tópico con acetato de prednisolona a dosis decrecientes. A las 3 semanas el paciente consultó nuevamente por empeoramiento del cuadro clínico, objetivándose biomicroscópicamente un nuevo infiltrado corneal de características fúngicas. Se tomaron nuevas muestras de raspado corneal para cultivo y se instauró tratamiento tópico con colirio de anfotericina B.

Resultados: El examen directo del raspado corneal demostró la presencia de bastantes hifas septadas, y en los cultivos realizados en medios de agar sangre y agar glucosado de Sabouraud crecieron, a los 10 días de incubación a 30 °C, abundantes colonias marrón grisáceas, formadas por elementos hifales dematiáceos no esporulados. Tras prolongar la incubación 2 semanas, se observó la presencia de abundantes clamidosporas muriformes agrupadas en cadenas y picnidios esféricos ostiolados de color marrón oscuro que contenían un gran número de conidios hialinos, elipsoidales y ligeramente curvados.

La identificación a nivel de género se realizó en base a la morfología macroscópica de las colonias y su características microscópicas. La secuenciación de 210 pb del gen que codifica la subunidad 28S y 469 pb de una región que incluye los espaciadores internos ITS1 y ITS2, demostró una homología superior al 99% con *Phoma glomerata* (ATCC 36804), y si bien esta homología también era compartida por otras especies estas eran morfológicamente incompatibles con la cepa aislada.

La cepa se mostró sensible *in vitro* (Etest[®]) a la anfotericina B (1 µg/mL), al itraconazol (0,094 µg/mL) y al voriconazol (0,064 µg/mL). El paciente continuó el tratamiento con anfotericina B con excelente respuesta clínica y resolución de la queratitis a los 2 meses de tratamiento. Actualmente el paciente se encuentra asintomático, sin tratamiento y con discreta afectación de la agudeza visual por la existencia de la opacidad corneal anterior.

06. *Inocutis jamaicensis*: un basidiomiceto productor de cáncros en *Eucalyptus globulus*

Mariela Speranza^{1,3}, Lina Bettucci², Javier Romero¹, Ángel Martínez³ y María Jesús Martínez²

¹Dirección de Investigación y Tecnología, ENCE, Pontevedra, España;

²Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-Ingeniería,

Universidad de la República, Montevideo, Uruguay;

³Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, España (mjmartinez@cib.csic.es)

Los hongos basidiomicetos son los principales responsables de la producción de podredumbre en los árboles en pie. En América del Sur, patógenos nativos y cosmopolitas, como el basidiomiceto *Inocutis jamaicensis*, comenzaron a infectar las plantaciones de eucalipto introducidas para diferentes usos comerciales. El síntoma producido por el hongo aparece en estados avanzados de la colonización y consiste en el achatamiento unilateral del tronco con lesiones en la corteza. La colonización es rápida y produce columnas de podredumbre que en pocos años alcanzan un alto porcentaje del fuste. Esto provoca un debilitamiento del árbol que conduce a su ruptura y caída. A pesar del impacto económico de este hongo, que afecta un 8-15 % de los individuos en las plantaciones jóvenes en algunas zonas del país, son pocos los estudios sobre la biología de esta especie y su mecanismo de colonización y degradación. En el presente trabajo se ha estudiado la degradación natural e inducida mediante inoculaciones artificiales de *I. jamaicensis* en árboles de *Eucalyptus globulus* de tres orígenes, dos procedencias australianas y el clon 334-1-AR (seleccionado en el sur de España). Los análisis mediante microscopía electrónica de baja temperatura y ambiental, revelaron que la podredumbre blanca de la madera producida por *I. jamaicensis* es de tipo simultánea extensiva, observándose degradación de la lignina y los polisacáridos de la pared celular. Las hifas asociadas a este tipo de degradación producen una vaina de material mucilaginoso que las envuelve y se adhiere al lumen y las paredes celulares durante la degradación. Sin embargo, en zonas limitadas del duramen pudo observarse un patrón de degradación selectiva de la lignina (detectado utilizando la tinción de Hertzberg e iluminación ultravioleta). Las líneas oscuras de zonación observadas en la madera degradada en campo, corresponden a placas de pseudoesclerocios formadas por agregados de hifas pigmentadas y gruesas presentes en el lumen de los vasos que en ocasiones separan los dos tipos de degradación. En las inoculaciones artificiales sólo el clon 334-1-AR desarrolló una delimitación efectiva del ataque fúngico, mediante la producción de zonas de reacción con tilosas y deposición de fenoles. La acumulación de cationes de calcio y manganeso fue observada en la albura y el duramen durante la degradación fúngica natural e inducida. La presencia de hierro en cristales de oxalato asociados a las hifas podría indicar la participación de este metal en la generación de radicales, a través de la reacción de Fenton, proceso muy importante en las primeras etapas de la degradación fúngica de la madera. Algunas de las características del huésped, como su anatomía y composición química, pueden estar relacionadas con los mecanismos de defensa y la diferente susceptibilidad observada en campo entre las variedades analizadas.



VIII Congreso Nacional
MICOLOGÍA
Barcelona 2006

Asociación Española de Micología

Grupo Especializado de Hongos Filamentosos y Levaduras
de la Sociedad Española de Micología

Índice de Autores

Abad Díaz de Cerio, Ana	B6;C4	Charlez, Luis	C5
Abarca Salat, M ^a Lourdes	T1;T4;T5;T6;P35	Claro, Rosa	A16
Accensi, Francesc	I2	Codina Grau, Gema	D1
Acosta Hernández, Begoña	P36	Coll Figa, Pere	E6;E10
Adelantado Faura, Carles	M1;M2	Colom Valiente, María Francisca	D11;P32
Aguirre, José Manuel	D16;E1	Corrochano, Luis M.	P24
Albaina, Olatz	D7;D10	Costa-batlloiri, Pere	M1
Alcalde, Víctor	C5	Crespi Vilimeles, Jaume	O5
Aldea, M ^o José	C5	Cuenca-Estrella, Manuel	P5
Alhambra, Almudena	C1;D12;D13;D14;P29	Cury, Arlete Emily	A1
Alio Sanz, Jorge L.	D11	Cuétara García, M ^a Soledad	C1;D13;P21;P29
Alkorta, Miriam	A18;A19;D10		
Aller García, Ana Isabel	A5;A6;A15;A16;C6;D18	Da Silva Ruiz, Luciana	A1
Almirante, Benito	P2	De Juan, Andoni	E1
Alonso Monge, Rebeca	P19	De Miquel Reinoso, Patricia	O5
Alvarado-Ramírez, Eidi	E5	Dea, M ^a Auxiliadora	A13
Álvarez, M ^a Elena	A11;D3	Del Campo Carrasco, Zoraida	O5
Andreu Domingo, Antonia	D1	Del Palacio Herranz, Amalia	C1;D4;D12;D13;D14; D15;D17;P29
Ara, Mariano	C5	Del Palacio-Pérez-Medel, Angel	D12
Arana, David	P19	Del Valle, Oscar	A20;A21;A22
Arias Rodríguez, Ángeles	C2	Delgado Naranjo, Jesús	F1
Arias Temprano, Marta	D2	Delgado Naranjo, Jesús	F1
Arosemena Angulo, Leonardo	M1	Di Pietro, Antonio	A9;G1
Arroyo, Javier	B10	Domínguez, Angel	A7
Arévalo Morales, M ^a del Pilar	C2	Duran, Angel	P12
Aspiroz, M ^a Carmen	C5;E11;P22		
Ayté, José	P20	Eguia, Asier	E1
Aznar, Javier	D18;C6	Eraso, Elena	A17;A18;A19;D7;D10;D16;E1;F1;O3
Azor Heras, Mónica	A8;P33	Escamilla Llano, Pilar	E6
		Espada, Raquel	A13
Baires-Varguez, Laura	O2	Español, Montserrat	O5
Ballesteros, Paloma	A13	Espeso Fernández, Eduardo Antonio	B9
Baquero, Fernando	D3	Espinol-Ingroff, Ana	P6
Baroni, Francisco De Assis	A1	Espinola, Mirna Alicia	A10
Barrio Medrano, Josep Lluís	E6	Espinosa Taxis, Alejandra	B7;B8
Bas Vilda, Albert	C3;D1	Esteban, Alexandre	T4;T5;T6
Bello Velazquez, Gladis	E9	Estivill Navarrete, M ^a Dolors	A21;A22;C2
Benaiges, Aurora	A23	Etxebeste Juárez, Oier	B9
Bermejo, Clara	B4	Ezkurra, Pilar Ariadna	A17;A20;A21;F1;O1;O3
Bettucci, Lina	O6		
Bikandi, Joseba	D8;O1	Fernando, Baquero	A11
Blanco, Noelia	B10	Fernández De Larrinoa, Iñigo	D17
Boekhout, Teun	P34	Fernández-Olmos, Ana	A11;D3
Bosch, María	A12;A14;E2;E3	Fernández-Torres, Belkys	A22
Bragulat, M. Rosa	T1;T3;T4;T5;T6;T7	Ferrer Rodríguez, Consuelo	D11
Brena, Sonia	A7;B6;D14;D15	Fischer, Reinhard	P14
Briz Figueras, Marta	E10	Flández, Marta	B4
		Flor-Parra, Ignacio	P13
Cabañas, Romualdo	T1;T3;T7	Fortún Abete, Jesús	P10
Cabañas Saenz, F. Javier	T1;T3;T4;T5;T6;T7;P35		
Cabezas-olcoz, Jonathan	D8	Gallot, Natalia	C4
Calabuig, Eva	E2;E3	Gambale, Wladerez	A1
Calero, Fernando	P18	Garaizar, Javier	D8
Calvo Torras, M ^a Angeles	M1;M2	García Martos, Pedro	A5;A6
Camacho, Ana	D4	García Ruiz, Juan Carlos	D4;D17
Cano Lira, Josep	A8;P33	García, Raul	B10
Cantón, Emilia	A5;A12;A14;E2;E3;E7;E8;P7	García-Estrada, Carlos	P25
Cárdenes, Délia	A20;A21;A22	García-Salcedo, Raúl	P18
Cardoza, Rosa Elena	B2;B3	Garre Mula, Victoriano	B1
Carratalà Fernández, Jordi	P3	Garzia Agirrezabala, Aitor	B9
Carrillo-Muñoz, Alfonso Javier	A2;A3;A18;A17;A20; A21;A22;A23	Gasser Laguna, Isabel	C3
Castellá Gomez, Gemma	P35	Gavaldà, Joan	P11
Castillo Galicia, Fátima	B8	Gené, Josepa	A8;P33
Castillo Sosa, Gerardo	B8	Gil García, Concha	P1
Castillo, Esther A.	P20	Gil, Concha	D9;I1;O4
Castillo-Lluva, Sonia	P13	Gil-Brusola, Ana	E7;E8
Castro Méndez, Carmen	A6;A15;A16;C6;D18	Gilaberte, Yolanda	C5
Castán, Pablo	P19	Gilgado, Felix	P33
Celades, María Elena	E7;E8	Giusiano, Gustavo	A17;A20;A21;A22;A23
Chade, Miriam Estela	D5;E9	Gobernado, Miguel	A12;A14;E2;E3;E7;E8
		Gola, Susanne	P19

Gómez, Alberto	P12	Mercadillo, María	A11;D3
Gómez, Eliud	E4	Mereles Rodriguez, Beda Elizabeth	D5;E9
Gómez De Ana, Silvia	E5	Miranda, Alberto	P19
Gonçalves Da Silva, Eriques	A1	Miranda, Ilargi	D12;D13;D15;D17
González Roncero, M ^a Isabel	A9;G1	Miro, Jordi	M2
Gracia, M ^a Luisa	E11	Molero, Gloria	A13;I1;O4
Grau, Cecilia	B10	Moles, Beatriz	E11
Grünbaum Blanch, Federico	E6	Molina, Auxiliadora	A11;D3
Guardia, Célia	A20;A22	Molina, María	B4;B5
Guarro Artigas, Josep	A2;A3;A4;A8;A22;P33	Monte Vázquez, Enrique	B2;B3;T2
Guiu Comadevall, Nuria	M1	Montero Barrientos, Marta	B2;B3;T2
Gurgui Ferrer, Mercè	E6	Montiel, Vera	P18
Gutierrez Villalta, Cristina	E10	Moragues, M ^a Dolores	A7;C1;D4;D6;D12;D13; D14;D15;D16;D17
Gutiérrez, Santiago	B2;B3		C1;D12;D13;D14
<hr/>			
Hering, Mónica	E4	Moreno, Juan-Marcos	E4
Hermosa Prieto, Rosa	B2;B3;T2	Moreno, María I.	B2;B3;T2
Hernandez Hernandez, Francisca	B7	Morán Dez, Eugenia	D5
Hernando Echevarría, Fernando Luis	B6;C4	Muntaner, Luciana	D15
Hernández-Almaraz, José Luis	A18;A19;D10	Muñoz, María	P14
Herszage, Leon	A10	Muñoz, Patricia	P14
Hidalgo Hernando, Elena	P20	<hr/>	
Hidalgo Perez, Jose Alberto	P28	Navarrete, Clara	P18
Huerga, Vanesa	C4	Nombela, César	B5;B10;D9;I1;O4
<hr/>			
Insenser, María	O4	Nuñez-Zofio, Mireia	D8
Iturriaga, Enrique Alejandro	T2	<hr/>	
<hr/>			
Jaquet, Belen	E9	Ochoa, David	C4
Jara, Mónica	P20	Ocón, Aurora	P39
Jimenez, Cristina	P12	Ortiz, M ^a Cruz	C1;D13
Jiménez, Antonio	D9	Ortiz, Rebeca	D6
<hr/>			
Laporta, Rosalía	D15	Oswald, Isabelle	I2
Lain, Ana	D4	<hr/>	
Lecha Carralero, Mario	P23	Palacian Ruiz, Pilar	D2
Letamendi, Garazi	D17	Palacios, Lorena	B5
Lloret, Maria Antonia	A10	Palomares Folía, José Carlos	C6;D18;P31
Lomba Fuentes, Elena	D2	Pastor, Francisco Javier	A2;A3;A4
Lopitz-Otsoa, Fernando	D8	Pemán García, Javier	A5;A6;A12;A14;D6; E2;E3;E7;E8;P9
Ludwig, Alfredo	D8	Pericas Pagés, Roser	E10
López Oviedo, Elena	A5;A6;A15;A16	Pinton, Philippe	I2
López-Contreras González, Joaquín	E6	Pitarch, Aida	D9
López-Molina, Nuria	D8	Pla, Jesús	P19
López-Vicente, José	E1	Planas, Neus	T1
<hr/>			
Madariaga, Lucila	E1	Planes Reig, Ana M ^a	C3
Marcos, Cristina	D10;E1	Pontón, José	A7;B6;C1;D4;D6;D8;D12; D13;D14;D15;D16;D17
Marimon, Rita	P33	Proft, Markus	P38
Mariné, Marçal	A3;A4	Pérez Munive, Clara	B7
Márquez López, Marcela	T2	Pérez-Martín, José	P13
Martín, Humberto	B4;B5	<hr/>	
Martín, Juan Francisco	P25	Quesada Moraga, Enrique	T2
Martín De La Escalera, Cecilia	A5;A6;A15;A16	Quindós, Guillermo	A2;A3;A17;A18;A19;A20;A21; A22;D6;D7;D10;D14;D16; E1;F1;O1;O2;O3;P27
Martín Mazuelos, Estrella	A5;A6;A15;A16;C6;D18;P8	<hr/>	
Martín Urdíroz, Magdalena	A9	Ramírez García, Andoni	B6;C4
Martos, Antonia Isabel	A5	Ramos Ruiz Vázquez, José	P18
Martínez Del Pozo, Álvaro	A9	Ramírez Arcos, Mercedes	C6;D18
Martínez Rocha, Ana Lilia	A9;G1	Ramírez Gaona, Ana Yadira	B7;B8
Martínez, María Jesús	O6	Rementeria, Aitor	D8
Martínez, Ángel	O6	Requena, Natalia	P39
Martínez-Gomáriz, Montserrat	I1	Revillo Pinilla, M ^a José	D2;E11;P22
Martínez-Solano, Laura	I1	Reyes, Abigail	P12
Marín, María José	B4	Rezusta López, Antonio	C5;D2;E11;P22
Matos, Marcia	P12	Roc Alfaro, Lourdes	D2
Mayayo Artal, Emilio	P30	Rodrigues Paula, Claudete	A1
Mayordomo, Lourdes	A23	Rodríguez Andrés, Carlos	F1
Maza, José L.	D16	Rodríguez González, María	M1
Medvedeff, Martha Gladys	A10;D5;E9	Rodríguez-Peña, J. Manuel	B10
Mendoza, Joaquín	D4	Rodríguez Garrido, Virginia	C3;D1
Mendoza, Lorea	C4	Rodríguez, M ^a del Mar	A2;A4
		Rodríguez, Virginia	E4

Romero Roman, Lidia	E6	Taberner, Ester	M2
Romero, Ana	A6;A15;A16	Tannuri, Cecilia	E9
Romero, Javier	O6	Tapia, Eva	B4
Romo Lozano, Yolanda	B7	Thea, Ana	D5
Román, Elvira	P19	Toledo, Miguel	C5
Roncero, César	P12	Torrado, Juan José	A13
Roselló Mayans, Eva M ^a	C3;D1	Torres Martínez, Santiago	B1
Rovira Tarrats., Montserrat	P16	Torres, Luis	E11
Rubio Félix, Daniel	D2	Torres-Lana, Álvaro	C2
Rubio, Emilio	A23	Torres-Rodríguez, Josep M.	E5;P40
Rubio, M ^a Carmen	E11;P22		
Rubio, Vicente	D18	Ugalde Martínez, Unai	B9;P26
Ruiz Camps, M ^a Isabel	P15	Urrialde, Verónica	P19
Ruiz Cendoya, Mery	A8		
Ruiz Pipaon, Maite	C6;D18	Valdespina, Suriñe	A13
Ruiz Vázquez, Rosa M.	P37	Valentín, Amparo	A12;A14;E2;E3
		Vedoya, Maria Celina	A10;D5;E9
Sahand, Ismail H.	D6;D10;D16	Velázquez, Ernesto	D5
Salas, Iván	E4	Viani, Flavio César	A1
Salavert Lletí, Miguel	P17	Vidal-Vanaclocha, Fernando	C4
San Millán, Rosario	O1	Villalba, Cecilia	E9
San Segundo Val, Inaki	B6	Villalba, Claudia Viviana	E9
Sánchez Reus, Ferran	E6;E10;O5	Villar-Vidal, María	A18;D10;E1;F1;O3
Santiago Álvarez, Cándido	T2	Viudes, Ángel	E2;E3
Santos, Patricia	A17;A20;A21	Vivancos, Ana P.	P20
Sellart-Altisent, Maite	E5		
Serena, Carolina	A2;A4	Wimmer, Leticia	E9
Serrano, Esther	P39		
Serrano, María del Carmen	A15	Zaror, Luis	E4
Sevilla, María Jesús	A7;D8		
Shiva Ramayoni, Carlos	M1		
Silva Franco, Fátima	B1		
Sole Martínez, Roser	E10		
Speranza, Mariela	O6		
Steinberg, Gero	P13		
Sánchez-Sousa, Aurora	A11;D3		
Sánchez-Vargas, Luis Octavio	O2;O3		

VIII Congreso Nacional MICOLOGIA Barcelona 2006

*El comité organizador
agradece el apoyo de las siguientes
empresas e instituciones*

Empresas patrocinadoras



Empresas expositoras



Empresas colaboradoras

Izasa, S.A.
Laboratorios del Dr. Esteve, S.A.
Bio-Rad Laboratories, S.A.

Con el soporte de

