

COMUNICACIONES LIBRES

Eficacia de los tratamientos recomendados frente a *Candida krusei* en un modelo animal de candidiasis diseminada

Marçal Mariné, Mery Ruiz, Carolina Serena, Francisco Javier Pastor y Josep Guarro
Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

Introducción. Las infecciones diseminadas debidas a *Candida* se han convertido en una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales en las últimas décadas. Los tratamientos de elección hasta hace poco habían sido la anfotericina B y el fluconazol, aunque algunas especies suelen presentar una sensibilidad reducida, o incluso resistencia, a estos antifúngicos. Especies tales como *Candida krusei* tienen una resistencia innata a fluconazol, tanto in vitro como clínicamente, mientras que en el caso de la anfotericina B, en cuyo caso la aparición de resistencias es mucho menos frecuente, su toxicidad supone un riesgo en el tratamiento de pacientes en estado grave. Actualmente los tratamientos recomendados para las infecciones diseminadas causadas por *C. krusei*, incluyen la anfotericina B, especialmente en sus formulaciones lipídicas, las equinocandinas y, como alternativa, el voriconazol. En el presente estudio hemos comparado la eficacia de los tratamientos recomendados, además de la del posaconazol, un nuevo triazol de amplio espectro, en un modelo murino de infección diseminada por *C. krusei*.

Materiales y métodos. Se utilizaron dos cepas de *C. krusei*, 357568 y 03-271 provenientes de hemocultivos. Los animales elegidos fueron ratones OF1 machos, que fueron inmunosuprimidos el mismo día de la infección con ciclofosfamida y fluorouracilo. El inóculo fúngico utilizado fue de $2,5 \cdot 10^8$ ufc/ml para las pruebas de supervivencia y de $2,5 \cdot 10^7$ ufc/ml para los estudios de carga fúngica en órganos. Se establecieron grupos de diez animales para las pruebas de supervivencia y grupos de cinco animales para el recuento en órganos para cada tratamiento, además de un grupo control que no recibió tratamiento. Los animales recibieron los siguientes tratamientos: caspofungina (1,5 y 3 mg/kg/día), voriconazol (10 y 20 mg/kg/día) y anfotericina B liposomal (10 mg/kg/día) por vía intravenosa; posaconazol (50 y 100 mg/kg/día) por vía oral y anfotericina B desoxicolato (1,5 mg/kg/día) intraperitoneal. Los tratamientos fueron administrados durante cinco días empezando el día siguiente a la infección. Los estudios de supervivencia tuvieron una duración de 15 días. Para los estudios de carga fúngica, los animales fueron sacrificados el día siguiente de la finalización de los tratamientos. Los órganos extraídos (riñón y bazo) fueron homogeneizados, diluidos y sembrados en placas de Sabouraud.

Resultados. Todos los tratamientos, excepto la anfotericina B liposomal en una de las dos cepas, prolongaron la supervivencia de los animales respecto al grupo control, aunque no mostraron diferencias significativas entre ellos. Las dos formulaciones de anfotericina B lograron disminuir la carga fúngica en ambos órganos respecto al control. Ambas dosis de posaconazol consiguieron reducir la carga fúngica en riñón, aunque solo lo lograron en bazo para una de las dos cepas estudiadas. Ni el voriconazol ni la caspofungina lograron reducir la carga fúngica en bazo pero sí en riñón.
Conclusiones. Todos los tratamientos mostraron cierto grado de eficacia en nuestro modelo de infección diseminada por *C. krusei*, sin que ninguno de ellos se mostrara claramente superior a los demás. En un futuro sería interesante realizar estudios de tratamientos combinados con estos antifúngicos, usando el mismo modelo experimental, con el objetivo de mejorar las terapias actuales.

Endoftalmitis producida por *Pseudallescheria boydii* en un paciente inmunocompetente

Natalia Loaiza, Eva Roselló, Oscar del Valle y Virginia Rodríguez
Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona

Varón de 74 años, con antecedente de bronquitis crónica de larga evolución tratada con corticoides inhalados, que acude a urgencias por dolor súbito acompañado de pérdida de la visión en ojo derecho. Ingresa con la orientación diagnóstica de infección herpética por lo que se inicia tratamiento antiviral. Dos días después presenta cefalea hemicraneal derecha. Tras confirmarse por exploración ocular un aumento de la vítreo-retinitis se toma una muestra de humor vítreo para estudio microbiológico, observándose la presencia de hifas mediante examen directo (blanco de calcofluor) por lo que se aplica anfotericina B intravítrea. El décimo día de hospitalización se aísla en cultivo un hongo filamentosos que se identifica por el aspecto macroscópico de la colonia y por sus características microscópicas (contraste con azul de lactofenol) como *Pseudallescheria boydii*; se decide, entonces, suspender el tratamiento antiviral e iniciar tratamiento antifúngico empírico con voriconazol por vía intravenosa (4 mg/kg/12 h) e intravítrea.

El paciente es interrogado nuevamente y confirma haber trabajado en un huerto hasta el día de su consulta a urgencias, pero niega la presencia de cuerpo extraño, lesión ocular o cirugía oftálmica previa. Sin otro antecedente de interés, con TAC de tórax y senos paranasales normales, y sin afectación de la cámara anterior del ojo derecho, se sugiere una diseminación hematogena del microorganismo con afectación ocular como única sintomatología.

Tras seis días de tratamiento endovenoso, el paciente es dado de alta con tratamiento antifúngico oral, corticoides sistémicos y colirio ciclopléjico. A los tres días se le visita en consultas externas, donde la exploración oftalmológica revela la presencia de masa fúngica, desprendimiento de retina y protrusión del vítreo en ojo derecho por lo que se decide tratamiento quirúrgico (vitrectomía) y fotocoagulación.

Se trata de un caso de infección ocular fúngica con mala evolución en un paciente inmunocompetente.

Absceso cerebral por *Cladophialophora bantiana*

Concepción Mediavilla¹, Severina Durán¹, Ana Fernández¹, Juan Manuel Hernández Molina¹ y Andrés Sanz²

¹Microbiología, ²Anatomía Patológica, Hospital Carlos Haya, Málaga

Se presenta el caso de un varón de 29 años, ex ADVP y bebedor ocasional, sin otros factores de riesgo de interés. El paciente fue diagnosticado de un absceso cerebral en su hospital y es remitido a nuestro centro para realizar una biopsia estereotáxica, volviendo a su hospital para tratamiento. Cinco días después, el paciente reingresa en nuestro centro por presentar un cuadro de descenso importante del nivel de conciencia, acompañado de hemiparesia izquierda severa. En el TAC craneal se aprecia un aumento de la lesión previa con edema e importante efecto masa. Se confirma con RMN. Se decide realizar cirugía urgente, efectuando craneotomía frontal derecha, evacuándose una gran lesión semisólida sin paredes definidas. En los exámenes del material extraído, remitidos a anatomía patológica y a microbiología, se observaron hifas micóticas septadas. En los cultivos se aisló un hongo filamentosos identificado como *Cladophialophora bantiana*. En el postoperatorio se utilizó terapia antifúngica de amplio espectro, anfotericina B y voriconazol, produciéndose mejoría clínica.

Posteriormente, pese a la terapia antifúngica, el paciente sufrió una recaída, confirmándose en la RMN nuevo crecimiento del absceso craneal. Se realizó una nueva evacuación, sin mejoría, falleciendo el paciente.

Producción de fosfolipasa y proteinasa por aislamientos orales de *Candida* en pacientes portadores de prótesis dentales

Cristina Marcos-Arias¹, Elena Eraso¹, José López-Vicente², Asier Eguía², Andoni De-Juan², Lucila Madariaga¹, José Manuel Aguirre² y Guillermo Quindós¹

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

²Departamento de Estomatología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao

Se ha investigado la actividad fosfolipasa y proteinasa de 62 aislamientos de *Candida* (46 *Candida albicans*, 72,6%; nueve *Candida tropicalis*, 14,5%; cuatro *Candida glabrata*, 6,5%; dos *Candida guilliermondii*, 3,2%; y un aislamiento de *Candida dubliniensis*, 1,6%) procedentes de la prótesis o mucosa de 33 pacientes portadores de prótesis dental, de los cuales 17 no presentaban ningún tipo de estomatitis protética (51,5%) y los 16 restantes (48,5%) sí la presentaban.

La producción de fosfolipasa de los aislamientos de *Candida* fue determinada mediante cultivo en placas de agar Sabouraud-Dextrosa suplementado con yema de huevo. La actividad fosfolipasa se interpretaba como positiva cuando era visible una zona de precipitación alrededor del crecimiento. La actividad fosfolipasa (expresada por el valor Pz) fue determinada mediante el ratio del diámetro de la colonia entre el diámetro total incluyendo la zona de precipitación, siendo aislamientos muy productores aquellos cuyo valor de Pz está entre 0,5 y 0,35; y aislamientos de producción moderada cuando el valor de Pz está entre 0,51 y 0,74. Para la detección de la actividad proteinasa se utilizaron placas de medio sólido con seroalbúmina bovina. La proteólisis se medía como la presencia o ausencia de una zona de clarificación alrededor del crecimiento, siendo negativa (-) cuando no hay lisis; positiva (+) cuando el halo mide 1-2 mm, y muy positiva (++) cuando el diámetro del halo es superior a 2 mm.

La producción de fosfolipasa y proteinasa de cada aislamiento fue ensayada por triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante seis días, con lecturas en los días 2, 3 y 6.

El 97,8% de los aislamientos de *C. albicans* presentó actividad fosfolipasa en diferentes grados, mientras que el resto de los aislamientos de otras especies no presentó actividad fosfolipasa detectable. Sin embargo, el único aislamiento de *C. dubliniensis* mostró actividad fosfolipasa moderada. La mayoría de los aislamientos de *C. albicans* eran muy productores de fosfolipasa (32 aislamientos; 71,1%), mientras que 12 aislamientos

exhibían actividad fosfolipasa moderada (26,7%), y un solo aislamiento no presentó actividad fosfolipasa (2,2%).

Los resultados para la proteinasa fueron más variables, siendo positivos 20 aislamientos (32,3%), de los cuales 13 correspondían a la especie *C. albicans* (65%), cuatro a *C. tropicalis* (20%), dos a *C. glabrata* (10%), y uno de ellos a *C. dubliniensis* (5%). Ocho aislamientos (40%) resultaron muy productores de proteinasa, de los cuales cinco fueron *C. albicans*, dos *C. tropicalis*, y uno *C. glabrata*, mientras que los doce aislamientos restantes (60%) exhibieron una actividad proteinasa moderada. *Candida albicans* fue productora de ambos factores de patogenicidad, aunque la producción de proteinasa sólo se observó en menos del 30% de los aislamientos. La producción de fosfolipasa era casi exclusiva de *Candida albicans* y ninguno de los factores de virulencia estuvo asociado a la presencia de estomatitis protética.

Paecilomyces lilacinus, un patógeno emergente

María Victoria Castelli, Alicia Gómez-López, Leticia Bernal-Martínez, Laura Alcazar-Fuoli, Ana Alastruey-Izquierdo, Manuel Cuenca-Estrella y Juan Luis Rodríguez-Tudela

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra Majadahonda-Pozuelo Km 2 (28220), Madrid

Paecilomyces lilacinus es un hongo filamentoso saprofito de distribución mundial que puede causar infecciones diseminadas graves, infecciones oculares y micosis cutáneas de difícil tratamiento. Este hongo es un saprofito oportunista, aunque en los últimos años se ha observado un aumento en la frecuencia de estas infecciones en pacientes inmunocompetentes o sin factores predisponentes conocidos. El objetivo de este estudio fue revisar el perfil de sensibilidad a los antifúngicos de las cepas clínicas recibidas en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología durante los años 2000 a 2007. El 65% (13/20) de las cepas estudiadas procedieron de muestras cutáneas, el 20% (4/20) de muestras respiratorias, el 10% (2/20) de exudados conjuntivales y el 5% (1/20) de hemocultivos. El patrón de susceptibilidad a los antifúngicos fue determinado de acuerdo a la metodología descrita por EUCAST para hongos filamentosos. Los antifúngicos empleados fueron anfotericina B (AMB), itraconazol (ITR), voriconazol (VOR), ravuconazol (RVZ), posaconazol (POS) y terbinafina (TRB). La anfotericina B y el itraconazol mostraron valores de CMI elevados frente a los aislamientos estudiados. El 90% de las cepas (18/20) mostró valores de CMI >2 mg/l para la anfotericina B. Por otro lado, los valores de CMI para el itraconazol fueron ≥ 8 mg/l para el 80% (16/20) de los aislamientos. *P. lilacinus* mostró mayor sensibilidad al voriconazol, ravuconazol, posaconazol y terbinafina, como demuestran los valores de medias geométricas (MG) y CMI₅₀ respectivamente: VOR 0,42 y 0,25 mg/l; RVZ 0,60 y 0,50 mg/l; POS 0,20 y 0,25 mg/l; TRB 0,51 y 0,5 mg/l. Se observó el mismo patrón de sensibilidad a los antifúngicos para los distintos aislamientos clínicos, independientemente de su origen. Los nuevos triazoles y la terbinafina constituyen las alternativas más prometedoras para el tratamiento de estas infecciones.

Queratitis fúngica por una nueva especie de *Pyrenochaeta*

Consuelo Ferrer¹, Juan José Pérez-Santonja¹, Alejandra Eliana Rodríguez², Josep Guarro³, Jorge Alió¹ y María Francisca Colom²

¹Departamento de I+D+i, Instituto Oftalmológico de Alicante-Vissum, Alicante; ²Laboratorio de Micología, Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández, Sant Joan d'Alacant, Alicante; ³Unitat de Micologia, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona

Se presenta el caso de una paciente diabética de 77 años de edad que acude a nuestro centro oftalmológico (Vissum) con una queratitis infecciosa en ojo izquierdo (OI). La paciente refiere llevar 3 meses con problemas en el OI, y haber sido diagnosticada de queratitis bacteriana. Tras varios tratamientos, y sin observar mejoría, decide acudir a nuestro centro para una segunda opinión. El cuadro clínico presenta hiperemia conjuntival, pannus corneal periférico, edema corneal y úlcera con infiltrado blanquecino. La paciente es diagnosticada de queratopatía bullosa y queratitis infecciosa. Se toma una muestra de raspado corneal en la que se aísla *Streptococcus viridans*, pero en la tinción de Gram de la misma, se detecta la presencia de filamentos sugestivos de hifas fúngicas. La amplificación por PCR de dianas universales del ADN ribosómico fue positiva para hongos, presentando una homología del 80% con el género *Leptosphaeria* en las bases de datos EMBL y GeneBank. Ante estos resultados se instauró terapia tópica con anfotericina B y fluconazol oral, además de cefazolina tópica y ofloxacina. Tras una semana de terapia la paciente empeora (aumenta el tamaño de la úlcera y aparece hipópion), por lo que se retira el tratamiento para tomar una segunda muestra. Se realizó una biopsia corneal de 3 mm de la región ulcerada de la córnea y se cambió el tratamiento a natamicina tópica 5% y fluconazol oral. La visualización de la muestra con calcofluor mostró una gran invasión fúngica. De nuevo la amplificación de secuencias de la región ITS de los genes ribosómicos,

fue positiva y la comparación de la secuencia en la base de datos mostró, como mayor homología, un 80% con *Leptosphaeria*. Tras seis días de incubación, apareció crecimiento de un hongo filamentoso en la siembra realizada en agar chocolate. El hongo fue sometido a amplificación por PCR, mostrando una homología del 100% con la secuencia obtenida del raspado y de la biopsia corneal. Se subcultivó en diferentes medios (agar de Sabouraud, agar maíz, agar patata-dextrosa, agar extracto de malta) obteniéndose en la mayoría de ellos desarrollo fúngico a partir de los cinco días de incubación a 30 °C.

La observación morfológica macroscópica y microscópica del desarrollo fúngico, no permitió la identificación del mismo, por lo que fue remitido al laboratorio de micología de la Universitat Rovira i Virgili. Desde allí se decidió remitirlo al CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) donde se concluyó que se trata de una nueva especie de *Pyrenochaeta*. El estudio y descripción de la nueva especie se encuentra actualmente en proceso.

Tras 15 días de tratamiento con natamicina tópica y fluconazol oral se observó gran mejoría, y la paciente quedó preparada para un trasplante de córnea. Ante el elevado coste de dicha cirugía, decidió pasar a ser atendida en un hospital público.

Aspergilosis producidas por *Aspergillus* atípicos

Laura Alcazar-Fuoli, Emilia Mellado, Ana Alastruey-Izquierdo, Manuel Cuenca-Estrella y Juan Luis Rodríguez-Tudela

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid

Durante los tres últimos años se han recibido en el Servicio de Micología 32 muestras clínicas que inicialmente fueron identificadas como cepas atípicas de *Aspergillus fumigatus*. Estos hongos se caracterizan por tener una morfología pleomórfica, son de color blanco, y tienen crecimiento y esporulación lentos que dificulta su identificación por los métodos habituales.

Utilizando métodos moleculares de identificación, las 32 muestras se clasificaron como variedades de *A. fumigatus* pertenecientes al grupo de *Aspergillus* sección *Fumigati* con la siguiente distribución: seis aislamientos de *Neosartorya hiratsukae*, cuatro de *Neosartorya pseudofischeri*, uno de *Neosartorya udagawae*, dos de *Aspergillus viridinutans*, quince de *Aspergillus lentulus*, tres de *Aspergillus fumigati* y uno de *Aspergillus fumisynnematus*. El 35% de los aislamientos procedieron de muestras superficiales (64% de piel, 9% de exudado corneal, 27% de exudados nasofaríngeos), donde las lesiones estaban producidas mayoritariamente por las especies *N. hiratsukae*, *A. viridinutans* y *N. udagawae*. Sin embargo, las especies *N. pseudofischeri*, *A. lentulus*, *A. fumigati* y *A. fumisynnematus* se aislaron en mayor número de muestras respiratorias (72% de esputos y 19% de lavado broncoalveolares).

Con respecto a su perfil de sensibilidad in vitro, la mayoría de las cepas de *A. lentulus* y *A. fumigati* presentaron altos valores de CMI a la anfotericina B y a los azoles (anfotericina B MG [media geométrica] ≥ 7 µg/ml, itraconazol MG ≥ 6 µg/ml voriconazol MG ≥ 4 µg/ml y ravuconazol MG $\geq 3,5$ µg/ml). *N. pseudofischeri* y *A. viridinutans* presentaron valores altos de CMI únicamente a los azoles (itraconazol MG ≥ 8 µg/ml, voriconazol MG ≥ 4 µg/ml y ravuconazol MG ≥ 2 µg/ml), y *N. hiratsukae*, *N. udagawae* y *A. fumisynnematus* fueron sensibles a todos los antifúngicos testados.

Dado el perfil de sensibilidad de estas especies, que puede tener trascendencia terapéutica, se debería realizar un estudio epidemiológico para conocer su prevalencia real en nuestro medio.

Actividades proteinasa y fosfolipasa de *Candida dubliniensis*

Ismail Hamad Sahand¹, Tiziana Cannizzo^{1,2}, Alicia Arechavala^{1,3}, María Dolores Moragues⁴, Guillermo Quindós¹ y José Pontón¹

¹Departamentos de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, y ⁴Enfermería I, Universidad del País Vasco, Bilbao, España; ²Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino, Torino, Italia; ³Unidad Micología, Hospital FJ Muñiz, Buenos Aires, Argentina

Las actividades proteinasa y fosfolipasa son consideradas factores importantes de virulencia en la candidiasis. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar las actividades proteinasa y fosfolipasa de 107 aislamientos de *Candida dubliniensis* y 20 aislamientos de *Candida albicans*. El medio para el estudio de la actividad proteinasa contenía 1,17% de base de carbono de levadura; 0,01% de extracto de levadura y 0,2% de seroalbúmina bovina disueltos en 200 ml de agua destilada. La actividad enzimática se midió como la zona de clarificación visible alrededor de la zona de crecimiento y se reflejó como inexistente (-) cuando no se observó lisis, positiva (+) cuando el diámetro del halo fue de 1-2 mm, y muy positiva (++) cuando el diámetro del halo fue >2 mm. Los resultados se anotaron a los seis días de incubación. El medio para el estudio de la actividad fosfolipasa contenía 22,5 g de agar malta; 29,2 g de NaCl; 0,28 g de CaCl₂; 2% de emulsión estéril de yema de huevo y 1 l de agua destilada.

La actividad fosfolipasa de los aislamientos se interpretó como positiva cuando se observó una zona de precipitación alrededor de las colonias. Los resultados se anotaron a los seis días de incubación. Se observó una fuerte actividad proteinasa (++) en 10 aislamientos (9,3%) de *C. dubliniensis* y en 14 aislamientos (70%) de *C. albicans*. Se observó una actividad moderada (+) en 61 aislamientos (57%) de *C. dubliniensis* y en cinco aislamientos (25%) de *C. albicans*. La mayoría de los aislamientos de *C. dubliniensis* (71 aislamientos; 66,3%) estudiados no mostraron actividad fosfolipasa. Por el contrario, la mayoría de los aislamientos de *C. albicans* (15 aislamientos; 75%) fueron productores de fosfolipasa. Siete aislamientos (35%) presentaron una alta producción (Pz: 0,35-0,5) y ocho aislamientos (40%) mostraron una actividad fosfolipasa moderada (0,51-0,74). No se observó relación entre la producción de proteinasa y fosfolipasa con los genotipos o el origen anatómico de los aislamientos. En conclusión, los aislamientos de *C. dubliniensis* estudiados son menos productores de proteinasa y fosfolipasa que los de *C. albicans*, lo que podría sugerir una menor virulencia de *C. dubliniensis* respecto a *C. albicans*.

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos PI030662 y PI061895 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 y GIU06/56 de la Universidad del País Vasco.

Sepsis por *Stephanoascus ciferrii* en un paciente pediátrico de alto riesgo

Patricia Santos¹, Constanza Macadám¹, Javier Pemán², Emilia Cantón³ y Amparo Valentín³

¹Servicio de Microbiología, Hospital de Pediatría Dr. J.P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina; ²Servicio de Microbiología y ³Unidad de Microbiología, Centro Investigación, Hospital La Fe, Valencia

Describimos el caso de un paciente de 12 años con diagnóstico de linfoma no Hodgking que ingresa con fiebre, neutropenia, celulitis de cara y mucositis, en etapa inicial de tratamiento citostático.

Se realizó hemocultivo diferencial de catéter implantable y de hemocultivo periférico. De ambas muestras se aisló un hongo levaduriforme que posteriormente fue identificado como *Stephanoascus ciferrii*.

El recuento de levaduras en la sangre proveniente de catéter fue 10 veces mayor que en la de hemocultivo periférico, lo que se constató como fungemia asociada a catéter.

El paciente fue tratado con anfotericina B desoxicolato, con una dosis inicial de 0,1 mg/kg que fue aumentada progresivamente. El paciente recibió una dosis total de 17,5 mg y evolucionó satisfactoriamente. Se determinó la sensibilidad in vitro del aislamiento según el documento M27-A2 del CLSI. Las CMI fueron: anfotericina B, 1 mg/l, fluconazol 32 mg/l, itraconazol 0,5 mg/l, voriconazol 0,25 mg/l, caspofungina 8 mg/l y micafungina 8 mg/l. El interés de este caso reside en la excepcionalidad del aislamiento de esta levadura en humanos, que muestra un peculiar patrón de crecimiento y sensibilidad como nuevo patógeno emergente causante de sepsis en un paciente pediátrico inmunodeprimido.

Lesión cutánea de evolución tórpida en paciente trasplantada de médula ósea

Elia Samaniego, Elisabeth Gómez, Javier del Boz, Trinidad Martín, Vicente Crespo, Leandro Martínez y Andrés Sanz¹
Servicios de Dermatología y Anatomía Patológica¹, H.G.U. Carlos Haya, Málaga

Se presenta el caso de una mujer de 16 años diagnosticada en 2001 de LLAB. Recibió trasplante de médula ósea alogénico en 2005, siguiendo posterior tratamiento con fármacos inmunosupresores. Ingresó de nuevo en 2006 en el servicio de hematología por un cuadro de hematuria por virus Bk y anemia. Durante su ingreso se observó una lesión en forma de placa de base eritematosa-marrónácea y superficie ulcerocostrosa, asintomática, en zona pretibial derecha. No había antecedentes de traumatismo previo. Se tomó una biopsia cutánea de la lesión. Tras los hallazgos histológicos que sugirieron una infección micótica, se extrajo una muestra para cultivo, aislándose el agente etiológico *Alternaria alternata*. Se llegó, pues, al diagnóstico de alternariosis cutánea.

Tras el tratamiento con itraconazol y voriconazol (suspendido este último por toxicidad hepática), se confirmó histológicamente la curación de la lesión cuatro meses después. Tan sólo se observa actualmente una lesión cicatricial de pequeño tamaño.

Discusión. *Alternaria* es un hongo de distribución universal, patógeno para las plantas pero raramente para los humanos. Afecta sobre todo a pacientes inmunodeprimidos: receptores de trasplantes, pacientes con tratamientos prolongados con corticoides, neoplasias hematológicas, etc. Existen más 90 casos descritos, muchos de ellos producidos por la especie *Alternaria alternata*.

Se han descrito dos tipos de alternariosis cutánea: la superficial o epidérmica y la dérmica. Es frecuente un traumatismo previo y la aparición en zonas expuestas. Clínicamente puede presentarse como pápulas, placas, pústulas y costras o nódulos de coloración violácea.

Para el diagnóstico son necesarios el estudio histológico y cultivo de la

muestra. En el primero se observan polimorf nucleares e histiocitos formando granulomas más o menos definidos en dermis. El hongo se observa por la presencia de hifas, o aparecen los característicos cuerpos redondos. Tras el cultivo pueden observarse colonias de color marrón oscuro, casi negro. Microscópicamente se ven dictiocnidias de forma ovoide, con septos longitudinales y transversales y una prolongación apical: rostrum. En la especie *A. alternata* suelen disponerse en cadenas largas, a veces ramificadas.

El tratamiento consiste en disminuir en lo posible el tratamiento inmunosupresor, además de proceder a la extirpación quirúrgica de la lesión o la instauración de antifúngicos sistémicos (itraconazol).

Conclusión. Es importante incluir esta patología, cada vez más frecuente, dentro de las sospechas diagnósticas en una lesión cutánea clínicamente compatible en un paciente inmunodeprimido.

Cuantificación con PCR cuantitativa de la expresión de ALS3 en biopelículas de *Candida albicans* tratadas con anidulafungina, micafungina y voriconazol

María Villar, Elena Éraso, José Pontón y Guillermo Quindós
Laboratorio de Micología médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, España

La adhesión de *Candida* a las superficies plásticas constituye una etapa inicial fundamental en el desarrollo de biopelículas asociadas a la utilización de implantes médicos, como catéteres, válvulas cardíacas o prótesis dentales. ALS3 es una adhesina de la familia ALS (*Agglutinin Like Sequence*) implicada en los procesos de adhesión de *Candida albicans*. El método de desarrollo de biopelículas de *C. albicans* en placas de poliestireno, durante 24 y 48 h a 37 °C en un incubador biológico BioScreen C (LabSystems, Finlandia), se ha basado en el descrito por Ramage et al. (Rev Iberoam Micol 2001). Las biopelículas se trataron con diferentes concentraciones de anidulafungina, micafungina y voriconazol. De las células planctónicas y sésiles tratadas y sin tratar, se realizó la extracción de ARN total y, posteriormente, una reacción de retrotranscripción. Utilizando ADNc como molde, se cuantificaron los niveles de expresión génica del ALS3 mediante PCR cuantitativa en un termociclador ABI Prism 7300 (PE Applied Biosystems).

ALS3 tuvo una mayor expresión en las células sésiles de las biopelículas que en las células planctónicas de *C. albicans*. Las concentraciones de ALS3 se expresaban menos, en ambas fases celulares, después del tratamiento de las células con voriconazol, micafungina y anidulafungina. La micafungina fue el antifúngico con mayor efecto inhibitorio sobre la expresión de ALS3 en las células planctónicas y el voriconazol en las células sésiles.

Los tres antifúngicos estudiados, anidulafungina, micafungina y voriconazol, ejercen un efecto inhibitorio sobre la expresión de ALS3 y debe valorarse su potencial implicación terapéutica en las candidiasis asociadas a catéteres.

Trabajo financiado por los proyectos PI061895/2006 (del Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad) y GIU05/05 (de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea).

Sensibilidad in vitro de *Aspergillus* spp. a micafungina mediante difusión en disco

Antonia Isabel Martos, Trinidad González, Ana Romero, Auxiliadora González, Cecilia Martín-Martín de la Escalera, Elena López-Oviedo, Mercedes Ramírez y Estrella Martín-Mazuelos
Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme, Sevilla

Introducción y objetivos. Ante el aumento de la incidencia de infecciones invasivas por *Aspergillus* spp., entre otros hongos filamentosos, y la alta morbi-mortalidad con la que se presenta en pacientes inmunodeprimidos; se hace necesario un tratamiento precoz y eficaz para contribuir a la supervivencia de estos pacientes. La micafungina es un antifúngico perteneciente al grupo de las equinocandinas que actúa inhibiendo la síntesis de 1,3-β-D-glucano a nivel de la pared fúngica. Nos planteamos la posibilidad de determinar la sensibilidad in vitro de *Aspergillus* a la micafungina mediante difusión en disco, pues es un método más rápido en la obtención de resultados, además de económico y sencillo de preparar, que el aceptado hasta el momento por el CLSI como método de referencia para hongos filamentosos (microdilución en caldo).

Material y métodos. Estudiamos la actividad in vitro de 67 cepas de *Aspergillus* spp. (29 *Aspergillus fumigatus*, 18 *Aspergillus flavus*, 17 *Aspergillus terreus*, 2 *Aspergillus niger*, 1 *Aspergillus glaucus*) aisladas de muestras clínicas. Para el método de difusión en disco (DD) utilizamos discos preparados por nosotros (siguiendo el documento M44-A del CLSI). Inoculamos los discos en blanco (Becton Dickinson) con 20 µl de una solución de micafungina (concentración 50 µg/ml), resultando una concentración final de 1 µg/disco (S. Arikan y col., AAC, agosto 2003; 2641). Utilizamos como medio de cultivo agar Mueller Hinton (Difco) (A. Espinel-Ingroff y col., JCM, abril 2007), e incubamos a 35 °C

haciendo lecturas a las 24 y 48 horas de los diámetros de inhibición en la zona de marcado decrecimiento de densidad fúngica (IZ-2). Para el método de microdilución en caldo (MD) seguimos las normas del documento M38-A del CLSI para los hongos filamentosos. Preparamos los inóculos a partir de las conidias de un cultivo de siete días de las cepas de *Aspergillus* en solución salina a una concentración de alrededor del 80% de transmitancia. La concentración final de los inóculos fue aproximadamente de 10^8 UFC/ml. Para el método MD se leyó la mínima concentración efectiva (MEC) a las 48 horas. Incluimos en cada estudio, para asegurar la calidad y reproducibilidad de los mismos, las cepas control *A. fumigatus* ATCC 204305, *A. flavus* ATCC 204304, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258.

Resultados. Expresamos los resultados obtenidos (para el número de aislamientos de las especies señaladas) como rango (media geométrica) de la MEC para MD en $\mu\text{g/ml}$, y rango (media aritmética) de IZ-2 en mm para DD 24/48 h.

A. fumigatus (29): MD $\leq 0,015-0,03$ (0,023); DD 14-34 (19,9)/14-32 (18,9).
A. flavus (18): MD $\leq 0,015-0,03$ (0,021); DD 17-22 (19,6)/17-22 (18,6).
A. terreus (17): MD $\leq 0,015-0,03$ (0,028); DD 16-40 (25,8)/16-34 (24,11) (una cepa no creció a las 24 horas en DD).

A. niger (2): MD 0,03; DD 18-30 /18-29 (resultados individuales no media geométrica o aritmética).

A. glaucus (1) MD 0,03; DD 15/13 (resultados individuales no media geométrica o aritmética).

Conclusiones. 1) La MEC a las 48 horas de todas las cepas ensayadas de *Aspergillus* fue $\leq 0,03$ $\mu\text{g/ml}$ y sus halos de inhibición a las 24 horas en Mueller Hinton ≥ 14 mm. 2) Los halos de inhibición para la mayoría de cepas fueron similares a las 24 y 48 horas. La lectura del método de difusión en disco puede realizarse a las 24 horas de incubación.

Combinación de voriconazol con anfotericina B en el tratamiento de fusariosis murina

Mery Ruíz-Cendoya, Marçal Mariné y Josep Guarro

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona

Introducción. Las infecciones fúngicas constituyen un problema clínico de creciente importancia. Varias especies de *Fusarium* son responsables de infecciones fúngicas invasivas, principalmente en pacientes con neoplasias hematológicas subyacentes o trasplante de células madre hematopoyéticas. La especie implicada con mayor frecuencia es *Fusarium solani*. La terapia de primera elección para el tratamiento de fusariosis es la anfotericina B o sus formulaciones lipídicas, y los azoles, como el voriconazol (VRC). Hemos evaluado la eficacia de las combinaciones AMB+VRC, AMB+micafungina (MFG) y VRC+MFG en un modelo murino con animales inmunosuprimidos.

Materiales y métodos. Se utilizaron dos cepas de origen clínico de *F. solani*, FMR 7995 y FMR 4391 en ratones machos OF1. Se realizó la inmunosupresión de los ratones mediante 200 mg/kg de ciclofosfamida administrada intraperitonealmente y 150 mg/kg de 5-fluorouracilo por vía intravenosa. Los inóculos fúngicos utilizados fueron 5×10^5 y $6,6 \times 10^4$ UFC/ml, respectivamente. Para estudios de supervivencia se utilizaron diez ratones y para estudios de recuperación fúngica, cinco ratones. Los tratamientos fueron AMB a dosis de 3 mg/kg por vía intraperitoneal, MFG a 10 mg/kg por vía subcutánea y VRC a 60 mg/kg vía oral. Los tratamientos se administraron durante 10 días, iniciándose un día después de la infección. Los ratones fueron observados durante 30 días. Para los estudios de recuperación fúngica se estudiaron el bazo y los riñones, expresando los resultados en UFC por gramo de tejido. La media del tiempo de supervivencia (MST) fue estimado por el método de Kaplan-Meier. Los estudios de recuperación fúngica se analizaron con la U de Mann-Whitney utilizando SPSS.

Resultados. A pesar de que algunos de los diferentes tratamientos utilizados fueron capaces de prolongar significativamente la supervivencia de los animales infectados por una u otra cepa, sólo la combinación AMB+VRC prolongó la supervivencia de los animales infectados con cada una de las dos cepas. Sólo la AMB fue capaz de reducir significativamente la carga fúngica en el riñón para la cepa FMR 7995, y la combinación AMB + VRC en riñón y bazo para la cepa FMR 4391.

Conclusión. La combinación VRC+AMB mostró cierto grado de eficacia en este modelo murino.

Eficacia del posaconazol y de su combinación con la anfotericina B en una infección experimental diseminada por *Rhizopus oryzae*

M^a del Mar Rodríguez, Carolina Serena, Marçal Mariné,

F. Javier Pastor, y Josep Guarro

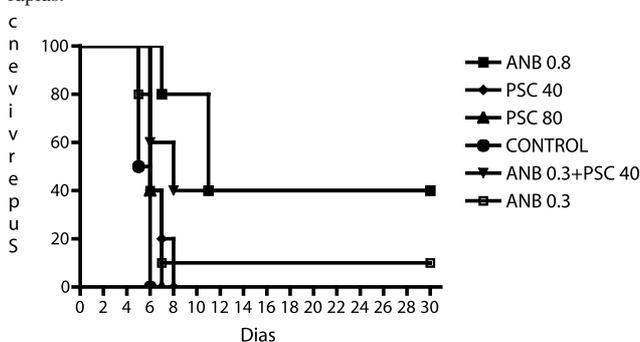
Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona

Introducción. *Rhizopus oryzae* es la especie que se aísla con mayor frecuencia en los pacientes con zigosporosis. La administración de la anfotericina B (ANB) o de sus formulaciones lipídicas junto a una amplia resección de los tejidos implicados es el tratamiento de elección en estos

casos. La elevada mortalidad a pesar de dicho tratamiento induce a la investigación acerca de nuevas alternativas terapéuticas. En el presente estudio se ha evaluado la eficacia del posaconazol (PSC) y de su combinación con la ANB en un modelo de infección diseminada por *R. oryzae* en el ratón inmunodeprimido.

Materiales y métodos. Para este estudio se han utilizado ratones machos OF-1 de 30-32 g. Los ratones fueron inmunosuprimidos con ciclofosfamida intraperitoneal (i.p.) y 5-fluorouracilo intravenoso (i.v.) el día antes de la infección. Los animales fueron infectados con 1×10^5 ufc/ml de la cepa FMR 8542 de *R. oryzae*. Los tratamientos utilizados fueron: ANB administrada a dosis de 0,3 o 0,8 mg/kg/día por vía i.v.; PSC administrado a dosis de 40 o 80 mg/kg/día por vía oral, y la combinación de ANB a dosis de 0,3 mg/kg/día con PSC a dosis de 40 mg/kg/día. Todos los tratamientos se iniciaron 24 horas después de la infección y se prolongaron durante siete 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, al quinto día de tratamiento, se sacrificaron cinco animales de cada grupo y se les extrajo asepticamente el cerebro y riñón, que fueron homogenizados y sembrados en placas de agar Sabouraud. Se calculó el número de ufc/g de tejido.

Resultados. Todos los tratamientos prolongaron significativamente la supervivencia respecto al control. La ANB a dosis de 0,8 mg/kg/día y la combinación de ANB y PSC prolongaron significativamente la supervivencia respecto al resto de terapias. La dosis más alta de ANB y la combinación de ANB Y PSC redujeron significativamente los recuentos fúngicos en ambos órganos con respecto al grupo control y a las monoterapias.



Conclusión. La combinación de ANB 0,3 mg/kg/día + PSC 40 mg/kg/día ha resultado tan eficaz como la ANB a dosis de 0,8 mg/kg/día en la prolongación de la supervivencia y en la reducción de la recuperación fúngica en riñón y cerebro. Dicha combinación permite la utilización de dosis bajas de ANB con la consiguiente disminución de la toxicidad del tratamiento sin disminuir su eficacia.

Perfil de actividad antifúngica in vitro de posaconazol. Método de difusión en agar (NeoSensitabs) basado en el documento M44-A frente a levaduras

Alfonso-Javier Carrillo-Muñoz¹, Juan-Manuel Hernández-Molina², Delia Cárdenes³, Gustavo Giusiano³, Patricia Santos⁴, Elena Erasó⁵, Dolors Estivil⁶, Oscar del Valle⁷ y Guillermo Quindós⁵

¹Dpto. Microbiología, ACIA, Barcelona, España; ²Serv. Microbiología, Hospital Carlos Haya, Málaga, España; ³Dpto. Micología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Argentina; ⁴Hospital de Pediatría J. Garrahan, Buenos Aires, Argentina; ⁵Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco, España; ⁶Althaia-Centre Hospitalari, Manresa, España; ⁷Serv. Microbiología, Hospitals Vall d'Hebron, Barcelona, España

Se presenta el perfil de actividad antifúngica del posaconazol (PSZ) frente a 314 levaduras aisladas de productos patológicos y 11 cepas de referencia. Las levaduras de interés clínico fueron aisladas entre los años 1998 y 2007 en diversos hospitales y centros de atención primaria de España y Argentina, correspondiendo 300 a trece especies de *Candida* y el resto a los géneros *Rhodotorula*, *Diploascus*, *Cryptococcus*, y *Trichosporon*. La sensibilidad al posaconazol, de forma comparativa al fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ) y anfotericina B (AMB), se determinó por medio de un método de difusión en agar con tabletas Neosensitabs (Rosco Diagnostica, Taastrup, Dinamarca) basado en el documento M44-P del CLSI. La obtención de los halos de inhibición permitió la clasificación de los aislamientos en sensibles, resistentes o de sensibilidad dosis dependiente. Los resultados (Tabla) mostraron una elevada actividad antifúngica de PSZ, con un 91,5% (CMI ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$) de aislamientos sensibles frente al 96,5% de AMB (CMI ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$), 85,3% de FLZ (CMI ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$) y el 49,5% de ITZ (CMI $\leq 0,125$ $\mu\text{g/ml}$). El 5,4% fue clasificado como resistente a PSZ. La especie con una menor sensibilidad a PSZ fue *C. gla-*

brata. Si exceptuamos a esta especie, el perfil de actividad de PSZ es similar al obtenido con AMB, siendo más favorable que el de FLZ e ITZ por medio de esta técnica de estudio de sensibilidad a los antifúngicos. Tabla. Actividad antifúngica de posaconazol (PSZ), anfotericina B (AMB), fluconazol (FLZ) e itraconazol (ITZ) frente a 285 aislamientos (resumen de especies).

	PSZ			AMB			FLZ			ITZ		
	S	I	R	S	I	R	S	SDD	R	S	I	R
<i>C. albicans</i> (n=124)	117	1	6	117	5	2	113	7	4	62	60	2
<i>C. dubliniensis</i> (n=25)	24	-	1	25	-	-	24	-	-	13	12	-
<i>C. famata</i> (n=10)	10	-	-	10	-	-	8	2	-	3	7	-
<i>C. glabrata</i> (n=57)	46	5	6	57	-	-	40	9	8	27	21	9
<i>C. lusitanae</i> (n=10)	10	-	-	10	-	-	8	2	-	8	2	-
<i>C. parapsilosis</i> (n=10)	10	-	-	9	1	-	9	-	1	6	4	-
<i>C. tropicalis</i> (n=30)	30	-	-	30	-	-	29	1	-	20	9	1
<i>C. krusei</i> (n=5)	4	1	-	5	-	-	3	-	2	1	2	2
<i>Diploascus</i> spp. (n=1)	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Cryptococcus</i> spp. (n=7)	7	-	-	5	-	2	7	-	-	3	3	1
<i>Rhodotorula</i> spp. (n=4)	4	-	-	3	1	-	2	-	2	4	-	-
<i>Trichosporon</i> spp. (n=2)	1	-	1	2	-	-	1	-	1	2	-	-

Los valores corresponden a número de aislamientos.

Estudio comparativo de la prevalencia de vaginitis por *Candida albicans* y otras especies del género *Candida* durante los últimos cinco años en el área hospitalaria de Valme y el Centro de Enfermedades de Transmisión Sexual, Sevilla

Auxiliadora González, Ana Romero, Samuel Bernal, Isabel Pueyo¹, Antonia Isabel Martos, Trinidad González, Ana Isabel Aller y Estrella Martín-Mazuelos
Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme, Sevilla, ¹Centro Infecciones de Transmisión Sexual, Sevilla

Objetivos. En los últimos años se ha descrito un aumento de la prevalencia de especies del género *Candida* no-*Candida albicans*, debido a su menor sensibilidad a los antifúngicos triazólicos. El objetivo de este estudio fue revisar la prevalencia de vaginitis por *C. albicans* y otras especies del género *Candida* en nuestra área, comparándola con la del Centro de Enfermedades de transmisión sexual (ITS) de Sevilla durante un periodo de 5 años.

Material y métodos. Se llevó a cabo un análisis retrospectivo de los cultivos de exudados vaginales correspondientes al área sanitaria de Valme, así como el de los pacientes atendidos en el centro de ITS durante los últimos 5 años (2003 a 2007).

El cultivo de exudados vaginales se realizó según técnica habitual, sembrando las muestras en medio CHROMagar-Candida (Becton Dickinson, Francia) e incubando a 35 °C durante 48 h. Para la identificación de los aislamientos, se utilizó la tarjeta YST del sistema Vitek-2 (bioMérieux S.A.).

Resultados. Se analizaron un total de 22.631 muestras del área hospitalaria y 493 del centro de ITS, aislándose levaduras en el 31,12% y 71,80% de los casos, respectivamente. La especie más frecuente en ambas áreas fue *C. albicans* (79,40% y 88,13%), seguida de *Candida glabrata* (14,74% y 7,27%), excepto en los años 2004 y 2006, donde la segunda especie más aislada en el centro de ITS fue *Candida tropicalis* (3,3%) y *Candida parapsilosis* (7,62%), respectivamente.

Las especies de *Candida* no-*C. albicans* no muestran un aumento en el número total de sus aislamientos, a pesar del uso de antifúngicos triazólicos y a su resistencia a los mismos.

No se observa una gran diferencia en cuanto a la prevalencia ni al agente causal de candidiasis vaginales entre las dos poblaciones estudiadas.

Conclusiones. 1) La prevalencia de candidiasis vaginales no muestra variación en los últimos cinco años. 2) *C. albicans* sigue siendo la especie más frecuente en las candidiasis vaginales. 3) No existe un aumento significativo de prevalencia de las especies no *C. albicans*.

Secuenciación multilocus en *Scytalidium dimidiatum*

Hugo Madrid, Josep Cano, Alberto Stchigel y Josep Guarro
Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona

Scytalidium dimidiatum (Penz.) B. Sutton & Dyko (Botryosphaeriaceae, Ascomycota), es un hongo dematiáceo oportunista, asociado principalmente a infecciones superficiales en piel y uñas (Morris-Jones et al., 2004). Esta especie presenta una morfología variable en cultivo, mostrando un micelio formado por hifas y artroconidios hialinos y pigmentados (Roeijmans et al., 1997). Ocasionalmente, un sinanamorfo picnidial,

denominado *Nattrassia mangiferae* (Syd. & P. Syd.) B. Sutton & Dyko, es producido (De Hoog et al., 2000). *Scytalidium hyalinum* C.K. Campbell & J.L. Mulder es un taxón similar a *S. dimidiatum*, pero que presenta sólo micelio y artroconidios hialinos. Este hongo se asocia con cuadros clínicos similares a los causados por *S. dimidiatum*. Un estudio basado en RFLP y análisis de metabolitos concluye que *S. hyalinum* y *S. dimidiatum* podrían ser una misma especie (Roeijmans et al., 1997).

En estudios recientes, el análisis de secuencias de ADN de aislamientos de especies fúngicas morfológicamente variables, ha permitido corroborar también la existencia de una variabilidad genética, y en determinados casos poner de manifiesto la existencia de especies crípticas dentro de los diferentes agrupamientos (Gilgado et al., 2005).

Con el fin de determinar si la alta variabilidad morfológica de *S. dimidiatum* se correlaciona con una eventual diversidad genética, hemos obtenido secuencias parciales de los genes de la quitina-sintasa (CHS), la tubulina (TUB), y la región ITS del ADN, en un grupo de 20 cepas, ambientales y clínicas, procedentes de África, América y Europa. El análisis de las secuencias nucleotídicas ha demostrado una baja variabilidad intraespecífica en las regiones TUB y CHS. Una mayor variabilidad se aprecia en las ITS. La variabilidad presente en los genes estudiados no se asocia con ninguna característica morfológica evidente, ni con la procedencia geográfica de las cepas.

Bibliografía:

- De Hoog GS, Guarro J, Gené JL, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2nd edition. CentraalBureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, 2000.
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: Proposal of two new species. J Clin Microbiol 2005; 43: 4930-4942.
- Morris-Jones R, Youngchirn S, Hextall JM, Gomez BL, Morris-Jones D, Hay RJ, Casadevall A, Nosanchuk JD, Hamilton AJ. *Scytalidium dimidiatum* causing recalcitrant subcutaneous lesions produces melanin. J Clin Microbiol 2004; 42: 3789-3794.
- Roeijmans HJ, De Hoog GS, Tan CS, Figge MJ. Molecular taxonomy and GC/MS of metabolites of *Scytalidium hyalinum* and *Nattrassia mangiferae* (*Hendersonula toruloidea*). J Med Vet Mycol 1997; 35: 181-188.

Evaluación del medio cromógeno *Candida* Chromogenic Agar CONDA para el aislamiento e identificación de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico

Cristina Marcos-Arias¹, Alfonso Javier Carrillo-Muñoz², Elena Eraso¹ y Guillermo Quindós¹

¹Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao y ²ACIA-Microbiología, Barcelona

Las candidiasis son infecciones habituales causadas principalmente por *Candida albicans*; sin embargo, otras especies están aumentando en frecuencia. Un estudio realizado en el hospital terciario de Cruces (Barakaldo, País Vasco) ha mostrado que las especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* se aíslan más frecuentemente en candidemias que *C. albicans* (57,7% versus 42,3%). De los episodios de fungemia el 42,3% fue causado por *C. albicans*, seguido de *Candida parapsilosis* (36,3%), *Candida glabrata* (9,7%), *Candida tropicalis* (4,4%), *Candida krusei* (4%) y otras especies (4,3%). Una identificación rápida de los aislamientos es de gran ayuda para el diagnóstico y el tratamiento de las candidiasis.

Se ha evaluado la utilidad del medio cromógeno *Candida* Chromogenic Agar, de Laboratorios CONDA (Madrid, España), en el aislamiento e identificación presuntiva de *C. albicans* y otras levaduras de interés médico, basado en la presencia de diferentes actividades enzimáticas. En este estudio se han ensayado un total de 264 aislamientos, incluyendo 94 *C. albicans*, 75 *C. parapsilosis*, 20 *C. glabrata*, 15 *Candida dubliniensis*, 12 *C. tropicalis*, 12 *Candida lusitanae*, 10 *C. krusei*, 10 *Candida guilliermondii*, 10 *Candida famata* y 6 *Candida rugosa*. La identificación de los aislamientos se confirmó con pruebas micológicas convencionales. Antes del ensayo, cada aislamiento fue subcultivado en agar glucosado de Sabouraud para asegurar su viabilidad. Las placas fueron incubadas a 37 °C y la lectura visual se realizó después de 24 y 48 h de incubación por dos investigadoras independientemente.

La mayoría de los aislamientos crecieron bien en el medio después de 24 h de incubación. La diferenciación de *C. albicans* en el medio Chromogenic Agar fue sencilla por el color verde que presentan las colonias, a diferencia del color beige, violeta o gris de la mayoría del resto de los aislamientos. La sensibilidad y especificidad para la identificación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* fueron del 100%, no encontrándose aislamientos falsos negativos ni falsos positivos. En cuanto a *C. tropicalis*, el color de la colonias fue gris verdoso y difería del referido en la ficha del producto, pero era diferente del observado en las colonias de otras especies. La diferenciación de *C. krusei* fue fácil por el color rosa mate con una sensibilidad y especificidad del 100%. Sin embargo, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* no se diferenciaron claramente de otras especies como *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* o *C. famata*.

El medio cromógeno diferencial *Candida* Chromogenic Agar es eficaz en el aislamiento e identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* en 24-48 h y permite observar claramente la presencia de cultivos mixtos.

Agradecimientos: A la Dra. Maite Ruesga de Laboratorios CONDA por la donación del medio. Trabajo financiado por los proyectos PI061895/2006 (del Fondo de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad) y GIU05/05 (de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea).

Combinación de voriconazol con anfotericina B en el Evolución de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos de aislamientos de *Candida parapsilosis* obtenidos de hemocultivo en los últimos tres años en el Hospital de Cruces, Barakaldo

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

La incidencia de *Candida parapsilosis* como agente etiológico de candidemia en muchas instituciones sanitarias españolas se ha incrementado en los últimos años. Su origen endógeno y su capacidad para sobrevivir en materiales biomédicos formando biopelículas le confieren unos rasgos patogénicos distintivos. Además, esta especie muestra una sensibilidad variable a los fármacos antifúngicos de uso común.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la actividad in vitro de los antifúngicos anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol frente a los aislamientos de *C. parapsilosis* y *Candida albicans* obtenidos durante los años 2005, 2006 y 2007 en cultivos de sangre y de líquido cefalorraquídeo en el Hospital de Cruces, Barakaldo.

Se estudiaron 85 aislamientos de hemocultivo de *C. parapsilosis* y 79 de *C. albicans* de un total de 206 aislamientos de diferentes especie de *Candida*, con el método de difusión en agar con tiras de Etest (BioDisk, Suecia) con los antifúngicos anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol. Como cepas de control se utilizaron *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258. La lectura se realizó tras incubación a 37 °C durante 24 h.

Ambas especies fueron sensibles a todos los antifúngicos evaluados aunque los aislamientos de *C. parapsilosis* mostraron CMI's más elevadas que los de *C. albicans*. El orden de actividad antifúngica frente a *C. parapsilosis* en base a las medias geométricas de las concentraciones mínimas inhibitorias (en µg/ml) fue el siguiente: ketoconazol (0,016) > voriconazol (0,024) > itraconazol (0,031) > 5-fluorocitosina (0,068) > fluconazol (0,308) > anfotericina B (0,480). En los aislamientos de *C. albicans* el orden de sensibilidad era muy similar: ketoconazol (0,012) > voriconazol (0,014) > itraconazol (0,031) > 5-fluorocitosina (0,057) > anfotericina B (0,223) > fluconazol (0,306).

No se observaron cambios significativos en la sensibilidad in vitro a los antifúngicos de *C. parapsilosis* y *C. albicans* en los tres años del estudio ya que ambas especies permanecieron sensibles a los antifúngicos evaluados.

Implicación de la trehalosa en la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos

Pilar González-Párraga¹, Ruth Sánchez-Fresneda¹, Ana Tapia², Thierry Jouault³, Juan-Carlos Argüelles¹ y María Martínez-Esparza²
¹Área de Microbiología¹ e Inmunología², Facultad de Biología¹ y Medicina², Universidad de Murcia, E-30071 Murcia, España; ³Inserm U799, Laboratoire de Mycologie Fondamentale et Appliquée, Université de Lille II, Lille, France

La elevada incidencia de infecciones fúngicas justifica el desarrollo de compuestos antifúngicos nuevos, más potentes y selectivos. En este sentido, las enzimas implicadas en el metabolismo de la trehalosa, un disacárido no reductor que en levaduras actúa como sustancia de reserva y protector frente a varios tipos de estrés, aparecen como una diana antifúngica de gran interés, debido a la ausencia de trehalosa en vertebrados. En el principal hongo patógeno oportunista del hombre, *Candida albicans*, la síntesis de trehalosa ocurre en respuesta específica frente al estrés oxidativo, y varias evidencias sugieren que podría ser un factor de patogenidad. Así, los resultados muestran que los genes implicados en la biosíntesis de trehalosa (*TPS1* y *TPS2*) y su degradación (*ATC1*) son necesarios para su virulencia. Los respectivos dobles mutantes interrumpidos presentan una notable pérdida de infectividad en modelos murinos de candidiasis sistémica, y un incremento en la sensibilidad a lisis mediada por macrófagos in vitro.

En estudios de sensibilidad a los antifúngicos comúnmente empleados en el tratamiento de la infección por *Candida*, encontramos diferencias en la MIC₉₀ para la 5-fluorocitosina y el itraconazol en el mutante homocigótico *tps1/tps1*, y para el itraconazol, el fluconazol y el voriconazol en el mutante *tps2/tps2*, respecto a sus correspondientes cepas parentales. No encontramos diferencias tras el tratamiento con anfotericina B o caspofungina.

Nuestros datos sugieren la necesidad de acometer nuevas búsquedas de agentes capaces de bloquear la síntesis o degradación de trehalosa, como sustancias de posible valor antifúngico, que podrían potenciar la eficacia de otros agentes empleados actualmente, para el tratamiento de las candidiasis.

El desarrollo del presente trabajo ha sido financiado con fondos procedentes del Proyecto BIO-BMC 06/01-0003 de la Dirección General de Investigación (Comunidad Autónoma de Murcia).

Criptococos patógenos en el medio ambiente: estudio del saprofito para entender al parásito

Margarita Cadenas, Iván Verdú, Lorena Pastor, Sonia Martínez, Eduardo González, Manuel Sánchez y María Francisca Colom
 Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Facultad de Medicina, Laboratorio de Micología, Universidad Miguel Hernández, Alicante

Dentro del género *Cryptococcus* encontramos dos especies patógenas para el hombre: *Cryptococcus neoformans* (serotipos A, D y A/D) y *Cryptococcus gattii* (serotipos B y C). Las levaduras de este género son redondeadas y están provistas de una cápsula de polisacáridos. El tamaño de la levadura, incluyendo su cápsula, puede variar entre las 10 y las 30 micras de diámetro, dependiendo de la cepa y del medio de cultivo que se utilice. Ambas levaduras pueden aislarse del medio ambiente. En el caso de *C. neoformans* el reservorio medioambiental principal son las heces de palomas. Para *C. gattii* el hábitat natural descrito son los eucaliptos.

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la supervivencia y observar los cambios morfológicos de las especies arriba indicadas, durante periodos de tiempo de hasta 164 días de permanencia en microcosmos que simulan los dos hábitats principales indicados.

En el caso de las heces de paloma se establecieron cuatro tipos de microcosmos: heces frescas estériles y no estériles; heces secas estériles y no estériles. Se establecieron tres grupos de ambientes; uno fue inoculado con *C. neoformans*, otro con *C. gattii*, y el último no fue inoculado (grupo control). Los muestreos fueron realizados durante un período de 60 días, con una toma de muestras cada cinco días aproximadamente.

Los microcosmos basados en sustratos derivados del eucalipto fueron corteza, fruto, flor, hoja fresca, hoja seca y suelo con detritus vegetal. Fueron divididos, a su vez, en estériles y no estériles. De nuevo se crearon tres grupos de ambientes inoculados con las dos especies de *Cryptococcus* y el grupo control. Se realizaron seis muestreos, tomados a lo largo de 164 días, para cada una de las cepas inoculadas. El intervalo inicial de muestreo fue de unos diez días incrementándose a 20 y 30 días para los últimos muestreos.

En cada muestreo se valoró el número de criptococos presentes, y la morfología y tamaño de las células. Dichas valoraciones se llevaron a cabo mediante recuento en cámara y siembra en placa (en el primer muestreo), y mediante microscopio óptico con micrómetro (en el segundo).

En todos los casos se observó una progresiva e importante disminución del tamaño celular para ambas especies a lo largo del tiempo. Inicialmente los tamaños eran superiores a las 8 micras, pero después de 30 días, en todos los microcosmos se observaron células de menos de 3 micras de diámetro. En cuanto a la viabilidad de las poblaciones de levaduras se ha observado que esta es mayor en las muestras previamente esterilizadas lo que podría ser debido a una falta de competencia con la biota residente. También se ha observado que el mayor número de células viables está presente en muestras de heces secas y, en algunos casos, incluso aumenta el número de células.

Estos resultados muestran no sólo que las levaduras pueden ser viables en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo, sino que en algunos de estos microcosmos proliferan y modifican su tamaño hasta un diámetro con el que pueden alcanzar los alvéolos pulmonares.