



Comunicaciones



Cambios inducidos por el tratamiento con equinocandinas en la concentración de quitina de la pared de *Candida parapsilosis*

Mar Martí Carrizosa, Ferran Sánchez-Reus

Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

Correspondencia: Ferran Sánchez-Reus. Servei de Microbiologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. C/ Sant Quintí 89, bloque B, planta 2. 08041 Barcelona, España. Teléfono: +34 935537291. E-mail: fsanchezr@santpau.cat

Antecedentes. Las especies del complejo *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*) presentan diferentes grados de sensibilidad intrínseca reducida a las equinocandinas, atribuible a una mutación en la región HS1 del gen *FKS1* (P660A) que está presente en todos los aislamientos. Hasta ahora, se desconocen los mecanismos de resistencia adquirida a las equinocandinas en el complejo *C. parapsilosis*: solo ha sido descrita una mutación situada fuera de las regiones HS del gen *FKS1* (F1386S) en una única cepa resistente.

Objetivo. El objetivo de este trabajo fue determinar las concentraciones de quitina de la pared celular y su distribución, estudiar si existían diferencias entre las 3 especies del complejo y determinar si estas concentraciones se modificaban después de un tratamiento con caspofungina.

Métodos. Se incluyeron en el estudio 11 aislamientos de *C. parapsilosis*, 3 de *C. metapsilosis*, 4 de *C. orthopsilosis* y una cepa control de *C. albicans*. El estudio de la sensibilidad a las equinocandinas se realizó mediante Sensititre YeastOne. La composición de la pared celular (quitina, glucano y manano) se determinó mediante cromatografía (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). La distribución de la quitina en la pared celular se visualizó mediante microscopía de fluorescencia y tinción con los cromóforos blanco de calcoflúor y la lectina WGA (Wheat Germ Aglutina).

Resultados. Todos los aislamientos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fueron sensibles a las 3 equinocandinas, mientras que 4 de los 11 aislamientos de *C. parapsilosis* fueron clasificados como intermedios (MIC = 4) y 2 como resistentes (MIC > 4), como mínimo, a una de las equinocandinas. El contenido basal de quitina (expresado en porcentaje v/v) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos sensibles de las 3 especies del complejo (*C. orthopsilosis*, 9,43%; *C. metapsilosis*, 9,53% y *C. parapsilosis*, 7,79%), pero sí con respecto a la cepa de *C. albicans* (4,61%). Los aislamientos de *C. parapsilosis* resistentes a alguna de las equinocandinas fueron los que presentaron los valores basales de quitina más bajos, aunque

el tratamiento previo de estos aislamientos con caspofungina incrementó el contenido de quitina en una media del 3%, en detrimento del contenido de glucano. El incremento máximo de quitina se observó en los 2 aislamientos de *C. parapsilosis* resistentes (9 y 11%). La distribución natural de la quitina en la pared celular no se vio afectada por el tratamiento previo con caspofungina.

Conclusiones. El contenido basal de quitina es similar en las 3 especies del complejo *C. parapsilosis* y superior al de la cepa control de *C. albicans*. El incremento de los valores de quitina después del tratamiento con caspofungina señala la posible implicación de una respuesta compensatoria que podría estar implicada en el mecanismo de resistencia adquirida a las equinocandinas.

Actividad antifúngica *in vitro* de compuestos de origen natural contra aislamientos orales de *Candida*

Katherine Miranda-Cadena, Cristina Marcos-Arias, Estíbaliz Mateo, Elena Eraso, Guillermo Quindós

Laboratorio de Micología Médica (UFI 11/25-UPV/EHU), Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Leioa, Vizcaya, España

Correspondencia: Katherine Miranda Cadena. Laboratorio de Micología Médica. Facultad de Medicina y Odontología. UPV/EHU. E-mail: kmiranda001@ikasle.ehu.eus

Antecedentes. La candidiasis oral es una de las infecciones superficiales más frecuentes y se asocia principalmente a pacientes inmunodeprimidos. La recurrencia y recalcitrancia de la enfermedad hace necesario el estudio de alternativas terapéuticas a los fármacos antifúngicos utilizados habitualmente. Los compuestos naturales son una alternativa prometedora para el tratamiento de estas infecciones.

Objetivos. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de carvacrol, eugenol, geraniol, citral, cinamaldehído, terpinel-4-ol, linalool y timol contra aislamientos orales de *Candida*.

Métodos. Se ha estudiado la actividad antifúngica *in vitro* de los compuestos de origen natural, del fluconazol y de la anfotericina B contra un total de 37 aislamientos: 5 cepas de referencia y 32 aislamientos clínicos orales de 8 especies de *Candida* mediante el método de microdilución en caldo EUCAST. El rango de concentraciones analizadas para los compuestos de origen natural fue de 2-1.024 µg/ml; 0,12-64 µg/ml para el fluconazol y 0,03-16 µg/ml para la anfotericina B. Se determinó la concentración más baja del compuesto que produjo una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ (CMI)

a las 24 h de incubación. Se determinó la concentración mínima fungicida (CMF) de los compuestos estudiados. Se incluyeron como controles las cepas de referencia *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Resultados. Cinamaldehído, citral, timol, carvacrol y eugenol fueron los compuestos más activos contra *Candida* (media geométrica [MG]: 53,07; 83,19; 84,77; 100,33 y 166,38 $\mu\text{g/ml}$). Geraniol, terpinel-4-ol y linalool presentaron menor actividad antifúngica (MG: 332,77; 641,06 y 787,77 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Las MG de las CMF de los compuestos más activos fueron: cinamaldehído 78,65 $\mu\text{g/ml}$; citral 276,50 $\mu\text{g/ml}$; carvacrol 233,11 $\mu\text{g/ml}$; timol 237,52 $\mu\text{g/ml}$ y eugenol 986,34 $\mu\text{g/ml}$. El timol mostró excelente actividad antifúngica *in vitro* contra los aislamientos de *C. albicans* (MG: 33,9 $\mu\text{g/ml}$), *C. krusei* (MG: 22,63 $\mu\text{g/ml}$), *C. parapsilosis* (MG: 32 $\mu\text{g/ml}$) y *C. dubliniensis* (MG: 26,91 $\mu\text{g/ml}$). El eugenol presentó su mejor actividad contra las especies *C. orthopsilosis* (MG: 2,83 $\mu\text{g/ml}$) y *C. metapsilosis* (4 $\mu\text{g/ml}$). El citral fue más activo contra *C. albicans* (MG: 33,9 $\mu\text{g/ml}$) y *C. glabrata* (MG: 50,8 $\mu\text{g/ml}$). Por último, el cinamaldehído fue más activo contra la especie *C. tropicalis* (MG: 45,25 $\mu\text{g/ml}$).

Conclusiones. Los compuestos carvacrol, cinamaldehído, citral, eugenol y timol mostraron excelente actividad antifúngica contra las diferentes especies de *Candida* estudiadas, con el carvacrol, el cinamaldehído y el timol como los de mayor efecto fungicida. Los compuestos geraniol, linalool y terpinen-4-ol mostraron buena actividad anticandidiásica, aunque no provocaron un efecto fungicida.

Financiación. Este estudio ha sido financiado parcialmente por Fundación ONCE Oportunidad al Talento, GIC IT-696-13 (Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritz) y UFI 11/25 (UPV/EHU).

Efecto sinérgico de anidulafungina en combinación con posaconazol en un modelo murino de aspergilosis diseminada

Adela Martín-Vicente, Javier Capilla, Josep Guarro
Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España
Correspondencia: Prof. Josep Guarro. Unitat de Microbiologia. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. URV. Reus, España.
Teléfono: +34 977759359. Fax: +34 977759322.
E-mail: josep.guarro@urv.cat

Antecedentes. Las especies de *Aspergillus* son responsables del 90% de las infecciones por hongos filamentosos, con *Aspergillus fumigatus* como la especie de mayor incidencia clínica. Actualmente la terapia de elección para el tratamiento de la aspergilosis invasiva se basa en la utilización del voriconazol (VRC). A pesar de los avances en el tratamiento de la aspergilosis, la mortalidad continúa siendo alta. El fallo terapéutico y el incremento de aislamientos resistentes a los azoles hace esencial encontrar tratamientos alternativos. Las terapias combinadas podrían considerarse, ya que permitirían administrar dosis más bajas, disminuir la toxicidad del tratamiento e incrementar la eficacia, además de reducir los costes.

Objetivos. Evaluar la eficacia *in vivo* de la anidulafungina (AFG) combinada con el posaconazol (PSC) en un modelo murino de aspergilosis.

Métodos. Ratones OF-1 inmunosuprimidos con ciclofosfamida fueron infectados con suspensiones de conidios obtenidas de tres cepas de *A. fumigatus* (FMR 7739, FMR 10528 y FMR 13142), consistentes en 1×10^3 - 1×10^4 UFC/animal. Los animales recibieron 10 mg/kg de AFG ip, 20 mg/kg de PSC administrado oralmente BID, 25 mg/kg de VRC oral QD, o la combinación de AFG y PSC a las dosis comentadas. Todos los tratamientos se iniciaron 24 h después de la infección y se prolongaron durante 7 días. La eficacia de las terapias fue evaluada mediante el análisis de la supervivencia y la carga fúngica en riñón.

Resultados. AFG aumentó de manera significativa la supervivencia de los animales infectados con las cepas FMR 7739 y FMR 13142 ($p \leq 0,049$) mientras que PSC y VRC solamente lo hicieron frente a la cepa FMR 13142 ($p \leq 0,045$). La combinación mostró eficacia contra las 3 cepas analizadas ($p \leq 0,005$), aunque solo resultó ser mejor que la monoterapia con PSC contra las cepas FMR 7739 y FMR 10528 ($p \leq 0,004$) y no superó la eficacia obtenida con AFG en ningún caso. La combinación también superó la eficacia del VRC contra la cepa FMR 10528. En cuanto a los ensayos de carga fúngica, la AFG mostró eficacia respecto al grupo control en los animales infectados con las cepas FMR 10528 y FMR 13142 ($p \leq 0,0008$). Las monoterapias con los 2 azoles redujeron significativamente la carga fúngica en riñón de los animales infectados con las 3 cepas ($p \leq 0,009$). La terapia combinada redujo de manera significativa la carga fúngica en riñón en comparación con el grupo control y también con las monoterapias frente a las 3 cepas ($p \leq 0,02$). Cabe destacar que la combinación esterilizó los riñones de aquellos ratones infectados con la cepa FMR 10528 y de la mayoría de los infectados con las otras cepas.

Conclusiones. La combinación AFG-PSC ha mostrado una buena eficacia frente a la aspergilosis diseminada por *A. fumigatus*. Puede representar una alternativa terapéutica para el tratamiento de la aspergilosis en caso de fallo terapéutico con los tratamientos de primera línea.

Terapias antifúngicas frente a la candidiasis experimental por *Candida kefyr* en ratones

Marta Sanchis, Adela Martín-Vicente, Javier Capilla, Josep Guarro
Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España
Correspondencia: Prof. Josep Guarro. Unitat de Microbiologia. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. URV. Reus, España.
Teléfono: +34 977759359. Fax: +34 977759322.
E-mail: josep.guarro@urv.cat

Antecedentes. Aunque *Candida albicans* es la especie más frecuentemente aislada en casos de candidiasis diseminada, hemos asistido en los últimos años a un incremento en la incidencia de infecciones causadas por otras especies emergentes. Entre estas, *Candida kefyr* es de interés por su elevada incidencia en pacientes con neoplasias hematológicas tratados mediante quimioterapia y por la falta de recomendaciones específicas para su tratamiento. Estudios *in vitro* han demostrado una buena actividad de todos los antifúngicos sobre ella; sin embargo, los resultados en la clínica humana han sido variables. Ante la falta de guías de tratamiento contrastadas para la candidiasis diseminada por *C. kefyr*, los modelos animales pueden ser una herramienta útil como punto de partida para establecer tratamientos adecuados para esta infección emergente.

Objetivos. Evaluar la actividad *in vitro* de caspofungina (CFG), fluconazol (FLC) y anfotericina B (AMB) así como determinar la eficacia de dichos fármacos frente a *C. kefyr* en un modelo murino de candidiasis diseminada.

Métodos. Se evaluó la actividad *in vitro* de CFG, AMB y FLC frente a 2 cepas de *C. kefyr* mediante determinación de las CMI y curvas de mortalidad. Para el desarrollo de los modelos experimentales se utilizaron ratones machos inmunosuprimidos inoculados con 1×10^7 CFU/animal de *C. kefyr* (cepas FMR 11745 y FMR 11743) y tratados con CFG (5 mg/kg QD), FLC (50 mg/kg BID) y AMB (0,8 mg/kg QD) durante 10 días. La eficacia del fármaco se evaluó mediante la reducción de la carga fúngica en riñón. Se determinaron las concentraciones séricas de los fármacos mediante bioanálisis, y los valores de $(1 \rightarrow 3)$ - β -D-glucano por medio de un análisis cinético y colorimétrico (Fungitell, Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA, EE. UU.).

Resultados. Mediante los estudios de curvas de mortalidad se observó actividad fungicida de la CFG y la AMB frente a *C. kefyri*, mientras que en el caso del FLC el efecto fue fungistático. Todos los fármacos redujeron significativamente la carga fúngica en riñón respecto a los animales no tratados ($p \leq 0,002$). De ellos, la CFG fue el tratamiento más eficaz ($p \leq 0,0003$ y $p \leq 0,0148$ en comparación con FLC y AMB, respectivamente). El FLC también tuvo una eficacia superior a la AMB en la reducción de la carga fúngica sobre ambas cepas ($p \leq 0,0140$). Además los 3 tratamientos fueron capaces de disminuir significativamente los valores de $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-glucano}$. Nuevamente, la CFG fue el antifúngico más eficaz, seguida por la AMB. Los valores de concentración obtenidos de los 3 fármacos en suero después de 10 días de tratamiento fueron superiores a las CMI de ambas cepas.

Conclusiones. CFG y AMB mostraron una actividad fungicida mientras que FLC mostró una actividad fungistática frente a ambos aislamientos de *C. kefyri*. Los 3 fármacos fueron eficaces reduciendo la carga fúngica en riñón y los valores de $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-glucano}$, con CFG como el más efectivo.

Sensibilidad antifúngica de celomicetos aislados de muestras clínicas procedentes de los Estados Unidos

Nicomedes Valenzuela, Deanna Sutton, José Cano, Katihuska Paredes, Josep Guarro, Alberto M. Stchigel

Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, URV, Reus, España

Correspondencia: Alberto M. Stchigel. Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. URV. Reus, España.

Teléfono: +34 935811089. Fax: +34 935812006.

E-mail: albertomiguel.stchigel@urv.cat

Antecedentes. Estudios recientes han mostrado un aumento en el número de infecciones superficiales y sistémicas debidas a celomicetos. Dichos hongos se caracterizan por producir esporas de origen asexual (conidios) dentro de cuerpos fructíferos denominados picnidios o acérvulos (Sutton, 1980). La vía de adquisición de la infección es, mayoritariamente, por implantación traumática a partir de material vegetal o fómites contaminados: los pacientes inmunodeprimidos constituyen la población con mayor riesgo de adquirir este tipo de infecciones.

Objetivos. Determinar la sensibilidad antifúngica de una serie de aislamientos clínicos de celomicetos frente a la anfotericina B, el voriconazol, el posaconazol, el itraconazol, la anidulafungina, la micafungina, la caspofungina, la terbinafina y la flucitosina.

Métodos. Se incluyeron 109 cepas de origen clínico de diferentes taxones de celomicetos proporcionados por el Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, en San Antonio (Texas). Las cepas fueron identificadas con base en su caracterización morfológica y la secuenciación del dominio D1/D2 del gen 28S del ARN ribosomal. La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se realizó siguiendo el método de microdilución descrito por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2008).

Resultados. Como resultados preliminares podemos destacar la gran actividad antifúngica de la terbinafina frente a todos los aislamientos, con una media geométrica de la CMI de $0,08 \mu\text{g/ml}$. Con la anfotericina B se observaron diferencias en la sensibilidad entre géneros; para *Neoscytalidium* el rango fue de $0,06\text{-}1 \mu\text{g/ml}$, mientras que para *Peyronella* fue de $0,5\text{-}8 \mu\text{g/ml}$. En el caso de los azoles, se observó un amplio rango de CMI, con el voriconazol y el posaconazol como los antifúngicos que presentaron mayor actividad. De todos los antifúngicos analizados, la flucitosina presentó las CMI más altas, con medias geométricas de $2,83 \mu\text{g/ml}$ y $4 \mu\text{g/ml}$ para *Neoscytalidium* y *Peyronella*, respectivamente, mientras que

las equinocandinas mostraron medias geométricas iguales o inferiores a $0,5 \mu\text{g/ml}$.

Conclusiones. Los celomicetos presentaron, en general, una especial sensibilidad a los azoles y las equinocandinas. Futuros estudios en modelos animales serían necesarios para comprobar estas observaciones.

Estudio mediante técnicas proteómicas de la respuesta mediada por IgG séricas frente a *Lomentospora prolificans* en individuos inmunocompetentes

Aize Pellon, Andoni Ramirez-Garcia, Idoia Buldain, Aitziber Antoran, Aitor Rementeria, Fernando L. Hernando

Fungal and Bacterial Biomics Research Group, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU); Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), 48940 Leioa, Vizcaya, España

Correspondencia: Aize Pellon: Teléfono +34 94 601 5507.

E-mail: aize.pellon@ehu.es; Fernando L. Hernando: Teléfono +34 94 601 5407. E-mail: fl.hernando@ehu.es

Antecedentes. *Lomentospora prolificans* es un patógeno oportunista emergente con tendencia a diseminarse hematógicamente en pacientes inmunodeprimidos, con una prevalencia clínica relevante sobre todo en España y Australia (Alastruey-Izquierdo et al., 2013; Slavin et al., 2015). Cuenta, además, con una alta resistencia intrínseca a los antifúngicos disponibles en la actualidad. A pesar de su amplia distribución en ecosistemas modificados por el ser humano (Harun et al., 2010), los individuos inmunocompetentes rara vez se ven afectados por esta micosis, probablemente debido a la respuesta inmune eficaz que estos individuos desarrollan. La comprensión de estas respuestas en pacientes con estados inmunológicos variables podría ayudar al tratamiento o diagnóstico de las infecciones causadas por este hongo.

Objetivos. Este trabajo tuvo como objetivo principal la identificación de los principales antígenos proteicos reconocidos por IgG séricas humanas y el estudio de su seroprevalencia en individuos inmunocompetentes.

Métodos. Se obtuvieron extractos proteicos de células completas y de superficie celular, tanto de conidios como de hifas, y se procesaron mediante electroforesis bidimensional para estudiar el proteoma completo y el subproteoma superficial, respectivamente. A continuación, las proteínas reconocidas por IgG fueron detectadas mediante Western blot mediante sueros de 10 individuos inmunocompetentes. Finalmente los antígenos más seroprevalentes fueron identificados mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS) a partir de spots obtenidos en los geles bidimensionales.

Resultados. Se detectaron 169 y 102 spots de proteína reconocidos por IgG séricas en los inmunomas de extractos de conidio e hifa, respectivamente. Entre ellos, más del 70% de los sueros utilizados reconocieron 13 spots en cada morfotipo, que fueron identificados como antígenos inmunodominantes. En concreto, los más seroprevalentes e intensamente reconocidos fueron la subunidad β de la proteína-G, la malato deshidrogenasa y la DHN1, en conidios; y la proteína de choque térmico 70 (*heat shock protein*, Hsp), la Hsp90, la subunidad β ATP sintasa y la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, en hifas. Además, se detectó la presencia de alguno de estos antígenos seroprevalentes, tales como la Hsp70 o la Hsp90, en el subproteoma superficial.

Conclusiones. En este estudio hemos detectado una amplia respuesta humoral específica frente a *L. prolificans* mediada por IgG séricas en individuos inmunocompetentes. Así, hemos identificado una serie de nuevos antígenos en ambos morfotipos, tanto en el proteoma completo como en la superficie celular. La ausencia de estos anticuerpos en pacientes inmunodeprimidos podría ser una de las causas que expliquen la tendencia de este hongo a infectar a dichos

pacientes. Sin embargo, la importancia de dichos anticuerpos protectores y el papel de las proteínas identificadas durante la infección deben ser estudiados con mayor amplitud. Por otro lado, estos antígenos podrían ser utilizados como dianas tanto terapéuticas como diagnósticas, lo que podría reducir la gran morbimortalidad asociada a las micosis causadas por *L. prolificans*.

Financiación. Proyectos EHUA13/14, UFI11/25, y GIU12/44 de la UPV/EHU y del Gobierno Vasco/Eusko Jaurlaritz (GV/EJ). AP posee una beca predoctoral de la UPV/EHU; IB y AA, del GV/EJ.

Análisis proteómico de aislamientos clínicos de *Candida albicans* diferenciados en la capacidad de formación de biopelículas e hidrofobicidad

Eulogio Valentín-Gómez¹, Laura Cabello-Murgui¹, Almudena Valentín-Verdeguer¹, Amelia Murgui-Faubel¹, Javier Pemán-García²

¹Grupo GMCA. Departamento de Microbiología, Universidad de Valencia, Burjassot (Valencia), España; ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

Correspondencia: Eulogio Valentín Gómez. Grupo GMCA. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Av. Vicente Andrés Estellés s/n. 46100 Burjassot. Valencia, España. Teléfono: +34 963543614. Fax: +34 963544543.

E-mail: eulogio.valentin@uv.es

Antecedentes. *Candida albicans* es uno de los hongos aislados con mayor frecuencia en enfermedades fúngicas invasivas, sobre todo en pacientes cuyo sistema inmunitario se encuentra afectado negativamente. En *C. albicans* se ha descrito una relación directa entre hidrofobicidad, formación de biopelículas y patogenicidad, así como resistencia a tratamientos antifúngicos. Estudios preliminares realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que no existe una relación directa entre los 3 parámetros mencionados (resultados no publicados).

Objetivos. El objetivo de este trabajo es la realización de un análisis proteómico de la matriz extracelular (ME) de cepas de *C. albicans* clasificadas como muy formadoras, medianamente formadoras o poco formadoras de biopelículas, y ver la relación existente entre los 3 grupos en cuanto al proteoma de la ME.

Métodos. Se realizó un análisis proteómico de 9 aislamientos clínicos procedentes de hemocultivos: 3 muy formadores de biopelículas (MF), 3 medianamente formadores (MdF) y 3 poco formadores (PF). Se obtuvieron las biopelículas siguiendo el siguiente protocolo: se realizó un recuento de células de *C. albicans* crecidas en medio YPD líquido empleando un contador BioRad T20 Automated Cell Counter. Se resuspendieron 10⁵ células en medio RPMI y se incubaron a 37 °C con suave agitación durante 48 h. Pasado este tiempo se recogió la biopelícula formada y se realizó un extracto hidroalcohólico que denominamos extracto de matriz extracelular (ME). El extracto de ME se sometió a análisis proteómico mediante tripsinización. La mezcla de péptidos obtenida se sometió a una cromatografía líquida seguida de una espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Para el escrutinio de los resultados se empleó la base de datos de *C. albicans*.

Resultados. Los perfiles proteicos de la ME procedentes de las 3 cepas de cada categoría (MF, MdF, PF) mostraron los siguientes resultados. En las cepas MF se identificaron 1.790 proteínas de las que 588 eran comunes entre las 3 cepas; en las cepas MdF una media de 600 proteínas fue identificada, en las que 160 eran comunes a las 3 cepas analizadas (un 27%). Cuando las cepas PF se analizaron, tan solo una media de 220 proteínas fue identificada, entre ellas, se vio que 115 proteínas estaban presentes en las 3 cepas, lo que supone un 50% de las proteínas identificadas. De todas las proteínas identificadas, solo 74 eran comunes a las 9 cepas analizadas.

Conclusiones. Los resultados del análisis proteómico realizado nos lleva a concluir que las cepas más productoras de biopelículas secretan al medio extracelular una gran cantidad de material proteico, del orden de 3 veces más que las cepas MdF y 8 veces más que las cepas PF. Estos resultados nos llevan a pensar que cuanto mayor es la cantidad de proteínas en la ME mayor es la capacidad de mantener la biopelícula. Estas proteínas podrían ayudar a mantener fuertemente unidos los componentes celulares de la biopelícula no solo entre ellos sino a la superficie donde se adhieren las células. Para finalizar, de los resultados que hemos obtenido podría inferirse que se precisan al menos 70 proteínas en la ME para mantener una mínima estructura de biopelícula.



Financiación Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PI12/01797, integrado en el Plan Nacional de I+D+I 2008-2011 y cofinanciado por el ISCIII-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Diagnóstico de la candidiasis invasiva mediante biomarcadores: *hyphal wall protein-1* y metionina sintasa

Ander Díez¹, Giulia Carrano^{1,2}, Inés Arrieta^{1,2}, María Soledad Cuétara³, María Jesús Sevilla¹, María Dolores Moragues^{1,2}

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología;

²Departamento de Enfermería I, Universidad del País Vasco (UPV-EHU), San Sebastián, España. ³Hospital Severo Ochoa, Leganés, España

Correspondencia: María Dolores Moragues. Facultad de Medicina y Enfermería, UPV-EHU. Barrio Sarriena s/n. 48940 Leioa, España. E-mail: lola.moragues@ehu.eus

Antecedentes. *Candida albicans* es un hongo dimórfico que puede ocasionar candidiasis invasivas (CI) asociadas a una elevada morbimortalidad. A pesar de las mejoras en algunos métodos de diagnóstico y de la introducción de nuevos tratamientos antifúngicos, la CI sigue siendo un problema importante en pacientes críticos. Nuestro grupo ha identificado algunos antígenos de la pared de los tubos germinales de *C. albicans*, entre los que destacan *hyphal wall protein-1* (Hwp1-N), Als3-N, metionina sintasa (Met6), Hyr1 y Ece1, que podrían ser útiles como biomarcadores en el diagnóstico temprano de la CI.

Objetivos. Desarrollar un test para la determinación en suero de anticuerpos frente a las proteínas recombinantes Met6 y Hwp1-N de *C. albicans*, y evaluar su utilidad para el diagnóstico temprano de la CI.

Métodos. Las proteínas Hwp1-N y Met6 se obtuvieron de forma recombinante en *Escherichia coli* y se utilizaron en análisis ELISA para la detección de anticuerpos específicos en un total de 442 sueros pertenecientes a 159 pacientes ingresados en el Hospital Severo Ochoa de Leganés. Grupo I (62 pacientes con CI), grupo II (53 pacientes con infecciones por otros hongos), grupo III (44 pacientes sin evidencia de enfermedad fúngica invasiva).

Resultados. La detección por ELISA de anticuerpos frente a Hwp1-N y Met6 mostró valores medios de absorbancia relativa significativamente superiores para los sueros de los pacientes del grupo I frente a los 2 grupos control. El análisis frente a Met6 mostró los valores más destacados con una sensibilidad y valor predictivo negativo del 98,4%. Sin embargo, la detección de anticuerpos anti-Hwp1-N resultó una técnica más específica (78,8%) que la de anti-Met6 (60%). La combinación de resultados no mejoró la capacidad diagnóstica de las pruebas individuales. El grado de acuerdo entre las pruebas

ensayadas y el hemocultivo (HC) fue moderado en el caso de la ELISA anti-Met6 (0,53) e intermedio para Hwp1-N (0,35). La detección de anti-Hwp1-N se anticipó al diagnóstico por HC en 8 de los 20 pacientes (40%) de los que se disponía de muestras previas al HC positivo. En el caso de la ELISA anti-Met6 la anticipación alcanzó al 90% de estos pacientes.

Conclusiones. La detección de anticuerpos anti-Met6 por ELISA tiene mejor capacidad diagnóstica para la CI que la detección de anticuerpos anti-Hwp1-N, al ser una técnica muy sensible y con un elevado valor predictivo negativo. La combinación de resultados de ambas técnicas no mejora la capacidad diagnóstica de la ELISA anti-Met6. La detección de anticuerpos anti-Met6 puede anticiparse al diagnóstico por hemocultivo de la CI.

Estudio de la expresión de factores de virulencia del hongo patógeno *Aspergillus fumigatus* durante una infección intranasal mediante retrotranscripción qPCR e hibridación con la micromatriz AWAFLUGE v.1

Saray Etxenagusia¹, Xabier Guruceaga¹, Guillermo Ezpeleta^{2,3}, Mónica Sueiro-Olivares¹, Andoni Ramirez-García¹, Jimena V. Fernandez-Molina¹, Ana Abad-Díaz de Cerio⁴, Javier Garaizar⁴, Fernando L. Hernando¹, Aitor Rementería¹

¹Fungal and Bacterial Biomics Research Group, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Vizcaya;

²Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina y Odontología UPV/EHU, Leioa, Vizcaya; ³Servicio de Medicina Preventiva, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Navarra; ⁴Fungal and Bacterial Biomics Research Group, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Vizcaya

Correspondencia: Saray Etxenagusia. Fungal and Bacterial Biomics Research Group. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencia y Tecnología. UPV/EHU. Leioa, Vizcaya, España. Teléfono: 946015964. E-mail: sarayetxenagusia@hotmail.com / aitor.rementeria@ehu.eus

Antecedentes. *Aspergillus fumigatus* es un hongo saprófito productor de conidios capaz de causar aspergilosis invasiva en pacientes inmunodeprimidos. La tasa de mortalidad es del 50% e incluso puede llegar al 95% en los casos más graves. Con el propósito de entender mejor la adaptación del hongo al huésped y los mecanismos de patogenicidad que este desarrolla durante un proceso infeccioso, se diseñó un modelo murino de infección intranasal. El estudio de expresión fúngica se llevó a cabo mediante la hibridación de la micromatriz AWAFLUGE v.1 y mediante retrotranscripción qPCR (RT-qPCR).

Objetivo. El objetivo de este estudio fue detectar la expresión de algunos genes de virulencia de este hongo durante los 4 días de infección intranasal de los animales.

Métodos. Ratones inmunosuprimidos fueron infectados por vía intranasal con una dosis de 1×10^7 conidios. Cada día de la infección se sacrificó un animal y se realizaron extracciones de ARN total para realizar el estudio transcriptómico. El ARN extraído se hibridó con la micromatriz AWAFLUGE v.1 para estudiar los niveles de expresión de los genes. Para los estudios de RT-qPCR se seleccionaron 36 genes de virulencia y se diseñaron cebadores en función de las secuencias de los genes obtenidas en NCBI, que se verificaron mediante la herramienta BLAST del NCBI y PCR convencional sobre ADN del hongo para comprobar su especificidad. Posteriormente se llevó a cabo una RT-qPCR, se calcularon las eficiencias de los cebadores y se estudio la expresión de los genes seleccionados mediante análisis de nanofluídica (Biomark HD Nanofluidic qPCR system de Fluidigm). Finalmente se correlacionaron los datos obtenidos con las 2 técnicas mediante el cálculo del coeficiente de Pearson.

Resultados. Con los resultados de la micromatriz se seleccionaron 4 genes invariantes para normalización de los datos y 8 de expresión diferencial. Los resultados obtenidos con los cebadores diseñados para estos 12 genes y los 36 genes de virulencia seleccionados mostraron unas eficiencias medias del 92%. El análisis de expresión mostró valores positivos de expresión en los genes *Ags1*, *Ags3*, *Sky1*, *Atp11* y *Tps* entre otros. Por contra, los genes de la catalasa, *MAT1* y *SreA* no mostraron expresión durante los días de infección. Se obtuvo una correlación de Pearson de 0,88 entre las 2 técnicas utilizadas, lo que puede ser debido a la realización de 2 técnicas diferentes.

Conclusiones. Prácticamente todos los genes de virulencia analizados mostraron expresión durante los días de infección estudiados, lo que indicaría que la virulencia de este hongo podría ser multigénica.

Financiación. Este trabajo fue subvencionado por la UPV/EHU (PES13/03, GIU12/44 y UFI11/25) y el Ministerio de Economía y Competitividad (MICINN CSD2009-00006). X. Guruceaga y M. Sueiro-Olivares han sido financiados por la Fundación Jesús Gangoiti Barrera y el Gobierno del País Vasco, respectivamente.

Estimación de la reproducibilidad y repetitividad de un estudio transcriptómico de un modelo murino de infección intranasal de *Aspergillus fumigatus* mediante análisis de genes invariantes

Xabier Guruceaga¹, Guillermo Ezpeleta^{2,3}, Saray Etxenagusia¹, Mónica Sueiro-Olivares¹, Jimena V. Fernandez-Molina¹, Andoni Ramirez-García¹, Ana Abad-Díaz de Cerio⁴, Javier Garaizar⁴, Fernando L. Hernando¹, Aitor Rementería¹

¹Fungal and Bacterial Biomics Research Group. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Vizcaya;

²Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina y Odontología UPV/EHU, Leioa, Vizcaya; ³Servicio de Medicina Preventiva e Higiene Hospitalaria, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Navarra; ⁴Fungal and Bacterial Biomics Research Group, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Vizcaya

Correspondencia: Xabier Guruceaga. Fungal and Bacterial Biomics Research Group. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Leioa, Vizcaya, España. Teléfono: 946015964. E-mail: xguruceaga001@ikasle.ehu.eus/aitor.rementeria@ehu.eus

Antecedentes. *Aspergillus fumigatus* es un hongo saprófito de distribución aérea ubicua con capacidad para causar diversas enfermedades con una elevada morbimortalidad en el ser humano, sobre todo en pacientes inmunodeficientes. Para estudiar la patogénesis de la infección por dicho hongo pueden realizarse estudios transcriptómicos mediante micromatrices de expresión o secuenciación masiva de ARN (ARNSeq), que generan un gran volumen de datos que dificulta su análisis e interpretación. En este ensayo se realizó un estudio transcriptómico de los genes de *A. fumigatus* en un modelo murino de infección intranasal.

Objetivos. 1) Describir los resultados de expresión obtenidos y 2) analizar los genes invariantes identificados mediante un modelo de ANOVA para estimar la repetitividad y reproducibilidad del ensayo.

Métodos. Con una dosis de 1×10^7 conidios se infectaron intranasalmente ratones inmunosuprimidos. A diario se realizaron extracciones de ARN total de los pulmones infectados para realizar el estudio transcriptómico mediante la micromatriz AWAFLUGE v.1. Los datos se analizaron empleando modelos lineales incluidos en las librerías Bioconductor y Limma pertenecientes al programa estadístico R, que permiten la detección de genes invariantes y la clasificación de los distintos genes estudiados en función de la expresión relativa de estos a lo largo del ensayo. Además, dado que

los genes invariantes se caracterizan por mantener una expresión constante a lo largo del tiempo, se realizó un ANOVA de un factor de la media de intensidades lumínicas obtenidas con cada una de las sondas para objetivar la expresión de los genes a lo largo del tiempo de estudio, y estimar así las varianzas de repetitividad y reproducibilidad.

Resultados. De los 9.630 genes estudiados, 11 fueron clasificados como invariantes y 111 mostraron una expresión diferencial a lo largo de los días: 93 genes presentaron infraexpresión mientras que 18 presentaron sobreexpresión. De estos últimos, 10 (56%) codificaban proteínas hipotéticas. De los genes infraexpresados, el 13% forman parte activa de alguna vía metabólica, con un total de 25 rutas implicadas en al menos una de sus reacciones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los resultados del ANOVA realizado sobre los genes invariantes; los valores de la varianza de la repetitividad y reproducibilidad fueron de 0,238 y 0,666, respectivamente.

Conclusiones. La incorporación a los análisis bioinformáticos de la expresión génica de un análisis mediante ANOVA de un factor de los genes invariantes podría ser de utilidad para estimar la repetitividad y reproducibilidad de un ensayo, además de ser una posible medida de su calidad. Los resultados apuntan a que hay varias rutas metabólicas que parecen tener un papel modulador importante y que existe una gran cantidad de genes cuya función no se conoce, pero que pueden ser relevantes en una infección por vía intranasal.

Financiación. Este trabajo fue subvencionado por la UPV/EHU (PES13/03, GIU12/44 y UFI11/25) y el Ministerio de Economía y Competitividad (MICINN CSD2009-00006). X. Guruceaga y M. Sueiro-Olivares han sido financiados por la Fundación Jesús Gangoiti Barrera y el Gobierno del País Vasco, respectivamente.

Cuantificación mediante qRT-PCR de *Mucor circinelloides* en órganos diana tras la infección sistémica en ratones

Patricia Navarro Rodríguez, Loida López, Marta Sanchis, Javier Capilla, Josep Guarro

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

Correspondencia: Javier Capilla. Unitat de Microbiologia. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. URV. Reus, España. Teléfono: +34 977759381. Fax: +34 977759322. E-mail: javier.capilla@urv.cat

Antecedentes. *Mucor circinelloides* es un hongo dimórfico considerado un patógeno oportunista emergente capaz de causar infecciones graves con altas tasas de mortalidad, en especial entre la población inmunodeprimida. Los factores responsables de la virulencia de *M. circinelloides* no se hallan completamente dilucidados. Mediante estudios de supervivencia en ratones se observaron grados de virulencia bien diferenciados entre 2 cepas de *M. circinelloides*, NRRL 3631 (avirulenta) y CBS 277. 49 (virulenta). Sin embargo, la determinación de la carga fúngica realizada mediante cultivo no mostró diferencias entre ambas cepas. La homogenización mecánica de tejidos para la posterior evaluación de la carga fúngica puede alterar la viabilidad de las UFC presentes en los órganos, subestimando así la carga fúngica. Ante la necesidad de cuantificar de la forma más precisa posible la invasión tisular por *M. circinelloides*, hemos empleado qRT-PCR para la cuantificación del microorganismo en órganos de ratón.

Objetivos. Evaluar el grado de invasión de las cepas NRRL 3631 y CBS 277.49 de *M. circinelloides* en una infección sistémica en ratón, mediante cuantificación de ADNg de tejidos infectados con la técnica molecular de PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Métodos. Se realizó qRT-PCR utilizando como molde ADNg total extraído a partir de órganos de ratones infectados con 2×10^6 esporangiosporas. Se utilizaron cebadores específicos del gen sintasa de quitina V (*chsV*) para la amplificación del ADNg fúngico.

Para normalizar los datos se cuantificó el ADNg de ratón con el empleo de cebadores específicos del gen β -2-microglobulina (β 2m) y se relacionó la señal de amplificación (Ct) de ambos genes en cada muestra. Los órganos analizados fueron bazo, cerebro, hígado, pulmón y riñón.

Resultados. Se detectó presencia del hongo en todos los tejidos analizados, independientemente de la cepa. La infección con la cepa CBS 277.49 mostró valores de Ct entre 32 y 37, equivalentes a 0,45-8,4 pg de ADNg de hongo por 1 μ g de ADNg de ratón. Se detectó mayor cantidad de ADN fúngico en pulmón, seguido de riñón y cerebro; el hígado y el bazo fueron los órganos menos afectados. El grado de invasión de la cepa NRRL 3631 resulta visiblemente inferior a los obtenidos con CBS 277.49 en todos los órganos analizados (0,46-1,6 pg de ADNg fúngico por μ g de ADNg de ratón). El órgano más afectado tras la infección con CBS 277.49 fue el pulmón, en el que se detectó un 80% más de ADNg fúngico respecto al mismo tejido infectado por la cepa avirulenta, por lo que resultó ser el órgano con mayor diferencia en grado de invasión entre ambas cepas.

Conclusiones. La técnica qRT-PCR es válida y precisa para la cuantificación de masa fúngica en órganos de ratón infectados. La aplicación de esta herramienta ha permitido detectar que el grado de invasión de 2 cepas con diferente virulencia es también distinta. La cepa virulenta CBS 277.49 fue más invasiva que la cepa avirulenta NRRL 3631.

Identificación del complejo *Candida albicans* por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Jorge Arca-Suárez, Pilar Aznar-Marín, Teresa Trujillo-Soto, Inmaculada Guerrero-Lozano, Francisca de la Rubia-Martín, Fátima Galán-Sánchez, Manuel Rodríguez Iglesias

UGC de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospitales Universitarios Puerta del Mar y de Puerto Real, Cádiz, España

Correspondencia: Manuel Rodríguez-Iglesias. UGC de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Hospitales Universitarios Puerta del Mar y de Puerto Real, Cádiz, España. Teléfono: +34 956002045. Fax: +34 956003081. E-mail: manuel.rodriguez Iglesias@uca.es

Antecedentes. *Candida albicans* es el principal agente causal de candidiasis vaginal. Desde hace unos años, se ha descrito el *Candida albicans complex* en el que se encuentran incluidas las especies *C. albicans*, *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* var. *africana*, esta última muy vinculada con la candidiasis vaginal. En la rutina diaria su identificación presenta grandes complicaciones por su gran similitud en sus características morfológicas y fenotípicas, tanto en los medios convencionales como cromogénicos. Este problema se ha solucionado gracias a la introducción de las técnicas moleculares y de espectrometría de masas.

Objetivos. El objetivo fue identificar por espectrometría de masas todas las cepas con coloración verde en agar cromogénico, susceptibles de ser identificadas como *C. albicans*, en el período de enero de 2013 a septiembre de 2015.

Métodos. Se analizaron 2.168 aislamientos de levaduras mediante el sistema MALDI-TOF (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania), obtenidos de muestras vaginales procedentes de pacientes atendidas en nuestro hospital o en centros ambulatorios. Las muestras clínicas se cultivaron según metodología habitual: agar sangre, agar chocolate y Chromagar Candida a 37 °C durante 24-48 h. Las cepas se seleccionaron en función de sus características morfológicas, fenotípicas y coloración en Chromagar. La identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó de forma convencional previa extracción con ácido fórmico.

Resultados. De los 2.168 aislamientos identificados por MALDI-TOF, 2.081 (94,5%) correspondieron a *C. albicans*, 112 (5%) a *C. albicans* var. *africana* y 10 (0,5%) a *C. dubliniensis*. Los scores alcanzaron valores que aseguraban la identificación de género y especie.

Conclusiones. Chromagar es un buen medio para la identificación de determinadas especies de *Candida*, aunque no es posible distinguir las especies incluidas en *Candida albicans complex*. Al utilizar la espectrometría de masas como método de identificación, es destacable la presencia significativa de *C. albicans* var. *africana*, datos que coinciden con la bibliografía consultada, en los que se describe como un patógeno oportunista recientemente vinculado a candidiasis vaginal. MALDI-TOF MS es una herramienta rápida y fiable para la identificación de estas especies en la rutina diaria, aunque deberían confirmarse por técnicas moleculares.

Valoración de los cultivos mixtos con especies de *Aspergillus* sección *Nigri* en el diagnóstico de la aspergilosis invasiva

Dulce Miralles-Salvador¹, Fátima Galán-Sánchez¹, Carmen Castro², Pilar Bermudes³, María José Linares⁴, Maite Ruiz de Pipaón⁵, Carmen Pazos⁶, Carolina Freyre⁷, María Luisa Serrano⁸, Waldo Sánchez-Yebra⁹, Antonio Sánchez-Porto¹⁰, Estrella Martín-Mazuelos², Manuel Rodríguez-Iglesias¹

HU Puerta del Mar, Cádiz¹; HU Virgen de Valme, Sevilla²; HU Carlos Haya, Málaga³; HU Reina Sofía, Córdoba⁴; HU Virgen del Rocío, Sevilla⁵; H San Pedro de Alcántara, Cáceres⁶; HU de Puerto Real, Cádiz⁷; HU Virgen de las Nieves, Granada⁸; CH Torrecárdenas, Almería⁹; H de La Línea, Cádiz¹⁰

Correspondencia: Manuel Rodríguez-Iglesias. UGC de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Hospitales Universitarios Puerta del Mar y de Puerto Real. Cádiz, España. Teléfono: +34 956002045. Fax: +34 956003081. E-mail: manuel.rodriguez Iglesias@uca.es

Antecedentes. Las especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* son un grupo de hongos filamentosos de gran relevancia médica dentro de las micosis fúngicas invasivas y su diagnóstico precisa de técnicas moleculares basadas en secuenciación de dianas específicas para la tipificación intraespecífica de los aislamientos clínicos. En la literatura, la aspergilosis fúngica invasiva producida por estos agentes se considera provocada por un único agente causal.

Objetivos. Comparar el diagnóstico fenotípico (observación macroscópica y microscópica) y proteómico (espectrometría de masas) de aislamientos clínicos de *Aspergillus* de la sección *Nigri* con técnicas de PCR por secuenciación del gen parcial de la β -tubulina.

Métodos. En el curso de un estudio multicéntrico prospectivo de infección fúngica invasiva en 13 hospitales de Andalucía y Extremadura, se seleccionaron 57 aislamientos de *Aspergillus niger* obtenidos de muestras respiratorias de pacientes diagnosticados por métodos convencionales. La identificación fue después contrastada por técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Para la identificación molecular, se aisló el ADN genómico y se amplificó parcialmente por PCR el gen de la β -tubulina. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del GenBank.

Resultados. Del total de 57 aislamientos solo el 74,5% mostraron concordancia entre los análisis proteómicos y la secuenciación. Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se detectaron 2 cultivos múltiples (*A. niger* + *A. brasiliensis* y *A. niger* + *A. fumigatus*). La eficacia del análisis de β -tubulina permitió diferenciar hasta 4 especies (41 aislamientos) dentro de la sección *Nigri*: 12 *A. niger*, 27 *A. tubingensis*, un *A. awamori* y un *A. aculeatus*. Sin embargo, no se obtuvo amplificación para la región de la β -tubulina en 14 aislamientos (24,5%). Estas cepas se reaislaron y se pudo comprobar la presencia de otros hongos filamentosos de posible comportamiento saprofito.

Conclusiones. Las especies crípticas de la sección *Nigri* de *Aspergillus* tienen una prevalencia significativa (70,3%) en estos pacientes. Aunque los cultivos múltiples son poco frecuentes, habría que valorarlos teniendo en cuenta el historial clínico del paciente. Hay que minimizar al máximo los posibles agentes

inhibidores (metabolitos u organismos contaminantes) que generan resultados negativos en la PCR. Las interacciones entre el hongo patógeno y otros hongos saprofitos podrían estar manteniendo una relación de micoparasitismo, por las interacciones hifales encontradas entre ambos. En la literatura se conoce la capacidad de especies de *Aspergillus* para inhibir el crecimiento de otros hongos saprofitos. Cabría pensar que dicha interacción pudiera estar dándose en el hospedador y que no fuera la consecuencia de una contaminación en laboratorio. Por ello, es importante la identificación en las etapas tempranas y cumplir con las normas de seguridad en el laboratorio para descartar contaminantes *in vitro*.

Caracterización fenotípica de cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas de animales domésticos

Laura Puig, M. Rosa Bragulat, Gemma Castellá, F. Javier Cabañes
Grupo de Micología Veterinaria, Departamento de Sanidad y de Anatomía Animales, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España
Correspondencia: M. Rosa Bragulat. Grupo de Micología Veterinaria. Departamento de Sanidad y de Anatomía Animales. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona, España. Teléfono: +34 935811089. Fax: +34 935812006. E-mail: rosa.bragulat@uab.cat

Antecedentes. *Malassezia pachydermatis* es una levadura causante de otitis y dermatitis, especialmente en perros. Es una especie lipófila, como lo son todas las especies incluidas en el género, pero se considera no lipodependiente, ya que puede crecer en agar glucosado de Sabouraud (SGA) sin adición de lípidos. Las cepas de esta especie presentan una gran variabilidad genética y hasta el momento han sido poco estudiadas fenotípicamente ya que, debido a sus requerimientos nutricionales, no se desarrollan bien en los medios tradicionalmente utilizados para evaluar la asimilación de fuentes de carbono en levaduras.

Objetivos. El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar fenotípicamente cepas de *M. pachydermatis* aisladas de distintos animales domésticos. Para ello se utilizaron las técnicas recomendadas para la caracterización de especies lipodependientes del género.

Métodos. Se utilizaron quince cepas de *M. pachydermatis*, aisladas tanto de animales sanos como con otitis y dermatitis, y la cepa del tipo CBS 1879. Las cepas se estudiaron en SGA a 32 °C y en el medio agar Dixon modificado (mDA) a 32, 37, 40, 42 y 45 °C. Paralelamente se valoró la capacidad de desarrollo en presencia de diferentes ésteres de polioxiethylensorbitano (Tween 20, 40, 60 y 80) y Cremophor EL mediante la técnica de difusión. También se estudió la presencia de los enzimas catalasa y β -glucosidasa.

Resultados. Todas las cepas crecieron en SGA a 32 °C, así como en mDA a 32, 37 y 40 °C. No obstante, a estas dos últimas temperaturas se detectó un menor crecimiento en algunas cepas. Solo dos no se desarrollaron a 42 °C y ninguna creció a 45 °C. Dos de las cepas estudiadas mostraron repetidamente colonias de menor diámetro que las restantes. La prueba de la catalasa resultó positiva para todas las cepas, y el test de la β -glucosidasa fue negativo para todas ellas. El desarrollo en presencia de los diferentes Tween y Cremophor EL fue variable y permitió identificar diferentes perfiles. El 56% de las cepas mostró un halo de inhibición del crecimiento alrededor del Tween 20. El 31% no mostró inhibición y el 12% presentó un estrecho anillo de inhibición del crecimiento a cierta distancia del desarrollo inicial de la cepa (anillo de inhibición). Todas las cepas se desarrollaron alrededor del Tween 40, aunque el 25% mostró anillo de inhibición. Todas las cepas crecieron en presencia de Tween 60 y Tween 80. Asimismo, todas mostraron crecimiento en presencia de Cremophor EL, aunque el 56% presentó anillo de inhibición.

Conclusiones. Las cepas analizadas de *M. pachydermatis* mostraron diferencias en el grado de crecimiento a 37, 40 y 42 °C. También se observaron diferentes comportamientos en el crecimiento en presencia de Tween 20, Tween 40 y Cremophor EL que permitieron detectar distintos perfiles de desarrollo. No obstante, todas estas diferencias no se correlacionaron claramente con las agrupaciones detectadas al realizar un estudio mediante secuenciación multilocus de dos genes ribosomales (ITS y LSU rRNA) y los genes de la quitina sintasa 2 (CHS2) y la β -tubulina.

Estudio multilocus sobre la diversidad molecular de cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas de animales domésticos

Laura Puig, Gemma Castellá, F. Javier Cabañes

Grupo de Micología Veterinaria. Departamento de Sanidad y de Anatomía Animales, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España
Correspondencia: Gemma Castellá. Grupo de Micología Veterinaria. Departamento de Sanidad y de Anatomía Animales. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona, España. Teléfono: +34 935811089. Fax: +34 935812006. E-mail: Gemma.Castella@uab.cat

Antecedentes. *Malassezia pachydermatis* es una levadura que forma parte de la microbiota normal de la piel de los animales y bajo ciertas condiciones puede provocar dermatitis y otitis, especialmente en perros y gatos. Existe una gran variabilidad genética entre las cepas de esta especie, que se han estudiado principalmente en cepas aisladas de perros.

Objetivos. El objetivo de este estudio es la caracterización molecular de cepas de *M. pachydermatis* procedentes de distintos animales domésticos. La diversidad molecular y la relación filogenética entre las cepas fueron analizadas mediante secuenciación multilocus de dos genes ribosomales (ITS y LSU rRNA) y los genes de la quitina sintasa 2 (CHS2) y la β -tubulina.

Métodos. Se estudiaron quince cepas de *M. pachydermatis*, aisladas tanto de animales sanos como con otitis y dermatitis, así como la cepa tipo CBS 1879. Se extrajo el ADN de los aislamientos y se amplificaron los genes ITS, LSU, CHS2 y β -tubulina. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas. Posteriormente, se realizó el análisis filogenético con la combinación de las secuencias obtenidas de los cuatro genes. Se construyeron árboles filogenéticos con el método de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana.

Resultados. Se caracterizaron diferentes tipos de secuencias para cada gen. En el gen LSU rRNA se caracterizaron cinco tipos de secuencias, once tipos para la región ITS, nueve para el gen CHS2 y ocho tipos de secuencias de β -tubulina. Se identificaron nuevos tipos de secuencias, algunos de ellos descritos por primera vez en determinadas especies animales. Al combinar las secuencias de los cuatro locus analizados, se obtuvieron quince genotipos, distribuidos en dos clados bien definidos. En el primer clado se incluyeron genotipos aislados de gatos, perro, cabra y cerdo: los genotipos de gato formaron un subclado claramente diferenciado. En el segundo clado se distinguían dos grupos, uno formado por aislamientos solo de perros y otro compuesto por genotipos procedentes de perros juntamente con uno aislado de caballo. Se pudo observar una clara relación entre genotipos de *M. pachydermatis* y la especie animal de la que se aislaron las cepas, independientemente del estado de salud del animal (sano, o con otitis/dermatitis).

Conclusiones. *M. pachydermatis* es una especie que presenta una gran variabilidad genética. Los análisis filogenéticos realizados indican que podría estar teniendo lugar un proceso de especiación, en el que diferentes genotipos se estarían adaptando a diferentes condiciones de vida relacionadas con los distintos hospedadores animales. El presente estudio muestra la realización por primera vez de un análisis filogenético

multilocus en cepas de *M. pachydermatis*, una herramienta útil para el estudio de la variabilidad intraespecífica y que podría contribuir a la estimación del origen y diversificación de la presente especie, y que permite profundizar en los conocimientos actuales sobre su ecología, epidemiología y posible proceso de especiación.

Aislamiento de hongos filamentosos en muestras respiratorias y cribado de su sensibilidad a itraconazol en un hospital terciario

Elisa Ibáñez Martínez, Lorena Lozano García, Patricia Falomir Salcedo, Javier Pemán García
Servicio de Microbiología y Parasitología Clínicas, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia

Correspondencia: Elisa Ibáñez Martínez. Servicio de Microbiología y Parasitología Clínicas. Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Valencia, España. Teléfono: +34 677 644 405. E-mail: elisa.im86@gmail.com

Antecedentes. El número de pacientes con riesgo de sufrir enfermedad fúngica invasiva (EFI) es cada vez mayor, por lo que, a pesar de la mejora en las técnicas diagnósticas y la aparición de nuevos antifúngicos, su incidencia sigue aumentando. La aparición de resistencias a los azoles en hongos filamentosos es un problema emergente en varios países de Europa, por lo que se hace necesario conocer la prevalencia de especies resistentes en nuestro medio y establecer métodos rápidos y fiables para detectar su presencia. Para ello, en el primer semestre de 2015 se realizó en España el estudio poblacional prospectivo de la resistencia a azoles en *Aspergillus* y otros hongos filamentosos en España (FILPOP-2)

Objetivos. Describir los aislamientos de hongos filamentosos en muestras respiratorias en el Hospital La Fe y realizar una aproximación a su sensibilidad al itraconazol. Este análisis forma parte del estudio multicéntrico FILPOP-2.

Métodos. Entre enero y junio de 2015 se sembraron 541 muestras respiratorias en agar Sabouraud con cloranfenicol, caldo Sabouraud con cloranfenicol y agar Sabouraud suplementado con itraconazol (S-IZ) a una concentración de 2 mg/l. Menos del 10% (49) de estas muestras procedían de pacientes con fibrosis quística. Las cepas se identificaron por sus características morfológicas macro- y microscópicas, y se recogieron datos clínicos y demográficos de los pacientes. Las EFI se clasificaron en probadas, probables o posibles según criterios modificados de la EORTC/MSG (2008).

Resultados. Se observó crecimiento de hongos filamentosos en 77 de las 541 muestras sembradas. De estas 77, 10 (pertenecientes a 6 pacientes) se clasificaron como EFI probable, 10 (7 pacientes) como posible, 40 (37 pacientes) como colonizaciones y 17 como contaminaciones. No se clasificó ningún caso como EFI probada. La mayoría de las muestras procedían del Servicio de Neumología (76,2%), seguidas por las de Hematología (9,2%), Reanimación (4,4%), Cirugía Torácica (1,8%), UCI (1,8%) y Oncología (1,3%). Las especies más frecuentemente aisladas fueron *Aspergillus fumigatus* (43,59%), *Aspergillus niger* (14,1%), *Scedosporium apiospermum* (10,26%), *Aspergillus flavus* (7,69%), *Aspergillus terreus* (6,41%), *Penicillium* spp. (6,41%) y *Aspergillus ochraceus* (5,13%). El 29,41% de los aislamientos *A. fumigatus*, el 75% de *S. apiospermum*, el 18,18% de *A. niger* y el 50% de *Fusarium* spp. crecieron en S-IZ. Seis episodios de EFI se clasificaron como probables, cinco de ellos fueron causados por *A. fumigatus* (uno por *A. fumigatus* y *A. ochraceus*) y uno por *A. terreus*. Seis episodios se clasificaron como EFI posible, cuatro causadas por *A. fumigatus*, una por *A. terreus* y una por *S. apiospermum*. Las colonizaciones más frecuentes fueron causadas por *A. fumigatus* (42,11%), *A. niger* (21,05%), *A. terreus* (15,79%), *A. flavus* (13,16%) y *S. apiospermum* (7,89%).

Conclusiones. En nuestro centro, la prevalencia de *A. fumigatus* y *A. flavus* en los aislamientos de muestras respiratorias es similar a

la observada en otros estudios, pero la de *A. niger* y *S. apiospermum* es superior. La resistencia de *A. fumigatus* a itraconazol encontrada por este medio de cribado es más elevada que la observada en otros estudios en nuestro medio.

Identificación de hongos filamentosos causantes de infecciones superficiales mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS

Elisa Rubio, Miriam López, Izaskun Alejo-Cancho, Andrea Vergara, Jorge Puig de la Bellacasa

Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica, Hospital Clínic y Provincial de Barcelona, Departamento de Hongos y Muestras Respiratorias, Barcelona, España

Correspondencia: Elisa Rubio García. Residente de Microbiología y Parasitología Clínica, Hospital Clínic y Provincial de Barcelona. Barcelona, España. Teléfono: +93 227 5522. Ext: 2752 Fax: +93 227 93 72. E-mail: elrubio@clinic.ub.es

Antecedentes. Los dermatofitos son los hongos filamentosos que más frecuentemente producen infecciones superficiales en piel, pelo y uñas. Se caracterizan por su capacidad queratinolítica y comprenden los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Otros hongos saprófitos carentes de capacidad queratinolítica pueden producir infecciones superficiales al colonizar lesiones ya existentes.

Objetivos. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la eficacia de la técnica de secuenciación de la región *internal transcriber spacer* (ITS) para la rápida y correcta identificación de los hongos aislados en muestras superficiales.

Métodos. Las muestras de piel, pelo y uñas remitidas por el Servicio de Dermatología entre julio de 2012 y diciembre de 2014 se sembraron en medio Sabouraud glucosa agar y se incubaron a 30 °C durante 21 días antes de considerarlos negativos. Las cepas aisladas se resembraron en agar patata y, una vez crecidas, se sometieron a disrupción mecánica por agitación con arena de vidrio para lisis de la pared fúngica. La extracción del material genético se realizó con el sistema automático EZ1 (Quiagen®). La región amplificada fue la ITS2, con el empleo de los cebadores ITS86 e ITS4. Para la amplificación se usó el termociclador SmartCycler a una temperatura de alineamiento de 52 °C; se utilizó Sybergreen como marcador fluorescente. La identificación de la especie se realizó mediante la secuenciación del producto de PCR (BigDye de AppliedBiosystems) al comparar las secuencias con las depositadas en la base pública de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El proceso de identificación de las cepas se realizó en un período de entre 2 y 4 días.

Resultados. En la tabla se muestran los resultados de las identificaciones de las 122 cepas aisladas en función de su procedencia.

Identificación	Procedencia			Total
	Uñas	Piel	Pelo	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	2		3
<i>Microsporum canis</i>	1		1	2
<i>Trichophyton interdigitale</i>	18	7	2	27
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4	1		5
<i>Trichophyton rubrum</i>	28	13	1	42
<i>Aspergillus terreus</i>	1			1
<i>Aspergillus unguis</i>	1			1
<i>Aspergillus versicolor</i>	2			2
<i>Acremonium exuviarum</i>	2			2
<i>Alternaria alternata</i>	4	1		5
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1			1
<i>Chaetomium globosum</i>	1	1		2
<i>Cladophialophora bopii</i>		1		1

<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2			2
<i>Coniosporum epidermidis</i>	1			1
<i>Fusarium oxysporum</i>	3			3
<i>Fusarium solani</i>	4			4
<i>Ochroconis</i> sp.	1			1
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1			1
<i>Phoma</i> sp.	1			1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	2	1		3
Sin valor clínico	7	5		12
Total	86	32	4	122

Se identificaron un 64,8% de casos por hongos dermatofitos y un 35,2% por hongos saprófitos. Se consideraron sin valor clínico aquellas identificaciones de hongos sin precedente de causar infecciones superficiales.

Conclusiones. Las técnicas de identificación basadas en aspectos macroscópicos y microscópicos del hongo requieren personal experimentado y pueden resultar dificultosas o lentas. En cambio, la técnica de secuenciación de la región ITS proporcionó una identificación fiable en un período mínimo de 2 días. Cabe destacar que el porcentaje de hongos saprófitos identificados con posible valor etiológico es elevado comparado con el de la literatura actual, en la que representan un 15%.

Species diversity and antifungal susceptibility of *Aspergillus* section Versicolores in clinical samples

João Paulo Zen Siqueira, Dania García, Josepa Gené, Pamela Thomson, Josep Guarro

Unitat de Micologia. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. URV. Reus, España

Correspondencia: Josep Guarro. Unitat de Micología. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, URV. Reus, España. Teléfono: +34 97759359. Fax: +34 97759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat

Antecedentes. *Aspergillus* is a ubiquitous genus of ascomycetous fungi. Apart from its biotechnological and industrial importance, it is relevant its ability to cause severe human infections. Within the genus, the section Versicolores includes a group of species characterized by biserial conidial heads, usually radiated and with some shade of green, with typically echinulate, globose to subglobose conidia. There is a great colony variation but little microscopy differences, which hamper the morphological identification. *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus sydowii* are the most commonly reported species of this fungal group, which have demonstrated their potential as human and animal opportunistic pathogens. Recently, the taxonomy of the section has been revised and 20 species were accepted. However, there is little knowledge on the diversity of these species in clinical setting. Moreover, the *in vitro* antifungal susceptibility is only known for a few strains of those mentioned species.

Objetivos. To investigate, by using a multi-locus phylogenetic study, the spectrum of species of *Aspergillus* section Versicolores involved in clinical samples and to determine the *in vitro* antifungal susceptibility of the species identified.

Métodos. A total of 77 isolates belonging to *Aspergillus* section Versicolores from the USA were included in the study. Their morphological characterization was performed in Czapek Yeast Autolysate agar and Malt Extract agar. Total genomic DNA was extracted using the FastDNA® Kit. The following genetic markers were amplified: internal transcribed spacer region, β -tubulin, calmodulin and RNA polymerase II second largest subunit. PCR products were sequenced in both directions at Macrogen Europe. Maximum Likelihood and Bayesian Inference analyses were carried out to construct a phylogenetic tree. Sequences of the type strains of the species of this section were used for comparison. The antifungal susceptibility of the most prevalent species was determined

against the drugs itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, 5-fluorocytosine, amphotericin B, and the echinocandins (micafungin, anidulafungin and caspofungin) by the CLSI guidelines.

Resultados. The strains investigated were distributed among 10 of the 20 species of the section, clustered with high support values with the respective type strains. The most common species was *A. sydowii* (26%), followed by *A. creber* (22%), *A. amoenus* (18.2%), *A. protuberus* (13%), *A. jensenii* (10.4%) and *A. tabacinus* (5.2%). The species *A. cvjetkovicii*, *A. fructus*, *A. puulaauensis* and, surprisingly, *A. versicolor* were represented by only one strain each (1.3%). This is the first time that the species *A. cvjetkovicii*, *A. puulaauensis* and *A. jensenii* are reported from clinical specimens. The echinocandins and terbinafine were the most active drugs against the fungi tested, while 5-fluorocytosine was the less active.

Conclusiones. Considering the high number of isolates belonging to species of *Aspergillus* section Versicolores that have been identified, the clinical relevance of this group of aspergilla cannot be overlooked. In our study *A. sydowii* was the most frequent species. By contrast, *A. versicolor*, traditionally considered the most common species of this section, here was only anecdotally recovered. *In vitro* results showed high activity of the drugs tested, with exception of 5-fluorocytosine.

Fotoinactivación con azul de metileno de *Candida albicans*: comparación de la eficacia con el uso de diferentes fuentes de luz

Vanesa Pérez-Laguna¹, Luna Pérez-Artiaga¹, Verónica Lampaya¹, Yolanda Gilaberte², María José Revillo¹, Antonio Rezusta¹

¹Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, España; ²Departamento de Dermatología, Hospital San Jorge, Huesca, España

Correspondencia: Vanesa Pérez-Laguna. Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza, España. Teléfono: +34 686107806. E-mail: vanesa2488@yahoo.es

Antecedentes. *Candida albicans* es una levadura que se encuentra colonizando piel y mucosas, que frecuentemente actúa como patógeno y que ocasiona infecciones en estas zonas. Debido al posible incremento en las resistencia a antimicrobianos, estas infecciones pueden ser difíciles de tratar y se cronifican, por lo que se requiere el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. Una opción puede ser la terapia fotodinámica (PDT). Esta técnica consiste en el empleo de moléculas fotosensibilizadoras que, activadas por la luz, generan especies reactivas de oxígeno que resultan citotóxicas. El azul de metileno (MB) es un fotosensibilizante muy activo cuya máxima absorción se produce a la longitud de onda de 665 nm.

Objetivos. El objetivo de este trabajo fue comparar la eficacia en la fotoinactivación de *C. albicans* con MB usando tres fuentes de luz diferentes: una correspondía a la longitud de onda de su pico de absorción y las otras dos a todo el espectro visible.

Métodos. Se prepararon suspensiones de *C. albicans* ATCC 10231 ajustadas para contener $>10^7$ células/ml. Noventa microlitros de estas suspensiones se pusieron en los diferentes pocillos de una placa *microtiter* y se les añadió 10 μ l de MB a diferentes concentraciones, de forma que se probaron concentraciones desde 640 hasta 5 μ g/ml en diluciones seriadas de 1/2. Las suspensiones resultantes se irradiaron a 37 J/cm² con las tres lámparas que evaluar: LED rojo (625 nm; 0,007 W/cm²), LED blanco (460-515-625 nm; 0,024 W/cm²) y halogenuro metálico (ancho espectro de 420 a 700; 90 mW/cm²). Se hicieron los controles apropiados. Todas las suspensiones resultantes se sembraron en agar Sabouraud para conocer el número de levaduras viables mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (CFU/ml). El criterio de una reducción de 6 log₁₀ en el número de CFU/ml se adoptó para definir la actividad fungicida.

Resultados. PDT-MB con LED rojo logra una reducción de 6 log₁₀ en el número de CFU/ml con concentraciones entre 80-160 μ g/ml de MB. Sin embargo, casi se consigue la misma reducción con 160-320 de MB al emplear LED blanco o la lámpara de halogenuro metálico.

Conclusiones. La fotoinactivación con azul de metileno de *C. albicans* se logra con las tres lámparas probadas, aunque hay diferencias en la eficacia: LED rojo > LED blanco > halogenuro metálico. Este estudio apoya el uso de la PDT en la clínica y no solo con el empleo de lámparas con la longitud de onda más adecuada para cada fotosensibilizante que, como cabría esperar, es la más eficaz, sino también con el uso de lámparas de amplio espectro. Se podría incluso valorar el uso de luz solar.

Financiación. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CTQ2013-48767-C3-2-R Ministerio de Economía y Competitividad de España.

Infección diseminada por *Talaromyces (Penicillium) marneffei* en una paciente con VIH tratada con voriconazol

Ester del Barrio, Luisa Martín, Carmen Vidal, José Luis Pérez, Núria Borrell

Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, España

Correspondencia: Ester del Barrio. Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca, España. Teléfono: +34 649384989. E-mail: ester.delbarrio@ssib.es

Antecedentes. *Talaromyces marneffei* es la única especie dimórfica de su género asociada a infección en humanos. Su zona endémica se restringe al sudeste asiático, pero los movimientos de población han determinado que aparezcan casos importados. La presentación clínica más común es la penicilosis diseminada, que se asocia con una elevada morbilidad en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en VIH positivos con menos de 100 CD4/mm³. El tratamiento de elección para este cuadro clínico es la anfotericina B por vía intravenosa durante dos semanas, seguida de itraconazol por vía oral durante diez semanas.

Objetivos. Describir el diagnóstico, evolución y manejo de la infección diseminada por *T. marneffei* en una paciente natural de China, con VIH en estadio 3 avanzado e insuficiencia renal aguda tratada con voriconazol.

Métodos. Se evaluó la situación clínica de la paciente mediante entrevista, exploración física y pruebas complementarias. Los hemocultivos fueron incubados en sistema Bactec®. La identificación presuntiva del hongo se realizó mediante estudio macroscópico del subcultivo en agar Sabouraud y espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI Biotyper). La identificación definitiva se realizó mediante secuenciación de las regiones variables ITS1 e ITS2 y alineamiento frente a secuencias del GenBank. Se estudió la sensibilidad antifúngica por el método E-test. Los niveles plasmáticos de voriconazol se determinaron mediante cromatografía líquida/tándem masa.

Resultados. La paciente, sin tratamiento antirretroviral, presentó fiebre, pérdida de peso y diarreas crónicas. Los hemocultivos, realizados tras pico febril, fueron positivos a las 48 h. En el subcultivo creció un hongo filamentoso que producía un pigmento difusible de color rojo vinoso. El método MALDI-TOF arrojó la identificación de *Penicillium* (score 1,48) y la secuenciación identificó el hongo como *T. marneffei*. En el estudio de sensibilidad antifúngica los resultados de concentración mínima inhibitoria (CMI expresada en μ g/ml) fueron fluconazol (1), itraconazol (0,012), voriconazol (0,016), posaconazol (<0,002), caspofungina (>32) y anfotericina B (0,016). El tratamiento inicial fue anfotericina B (3 mg/kg/día) durante tres días, pero, tras el deterioro clínico y renal que presentó la paciente, fue necesario su ingreso en UCI y sustituir este

tratamiento por voriconazol intravenoso cinco días seguidos de 150 mg/12 h por vía oral hasta completar 3 meses. Los niveles plasmáticos de voriconazol fueron de 3,3 µg/ml (rango de concentración efectiva: 2-6 µg/ml). Durante el segundo mes, una analítica de control reveló signos de hepatotoxicidad (sin que fuera precisa la suspensión del antifúngico) que desaparecieron al finalizar el tratamiento. Se produjo curación clínico-microbiológica tras completar el tratamiento.

Conclusiones. 1) La infección diseminada por *T. marneffe* se presentó con sintomatología inespecífica y sin presencia de lesiones cutáneas ni clínica respiratoria. 2) Los hemocultivos demostraron ser un método rentable para el aislamiento de este hongo filamentoso. 3) Las características macroscópicas de crecimiento rápido y pigmentación rojiza, junto con la epidemiología del caso, permitieron orientar su identificación. 4) MALDI-TOF MS identificó el género del aislamiento y la secuenciación permitió determinar la especie. 5) La buena evolución clínica de la paciente indica que el tratamiento con voriconazol puede ser una alternativa terapéutica eficaz para la infección sistémica por *T. marneffe* en pacientes con insuficiencia renal.

Cinco casos de mucormicosis en un año en un hospital de 700 camas

Izaskun Alejo-Cancho, Miriam Lopez, Elisa Rubio, Andrea Vergara, Jorge Puig de la Bellacasa

Servicio de Microbiología, Hospital Clínic, Barcelona, España

Correspondencia: Izaskun Alejo Cancho. Servicio de Microbiología. Hospital Clínic, Barcelona, España. Teléfono: +34 93 227 5522. Fax: +34 93. E-mail: alejo@clinic.ub.es

Antecedentes. La mucormicosis es una infección fúngica invasiva causada por hongos del subfilum *Mucoromycotina*, cuya incidencia está en aumento en los últimos años. Se trata de infecciones potencialmente mortales que afectan sobre todo a pacientes con algún factor de inmunosupresión (diabetes mellitus, trasplantes) o con politraumatismos (presentaciones cutáneas). La falta de sospecha clínica y las dificultades diagnósticas hacen que sea probable que esta infección se encuentre infradiagnosticada.

Objetivos. El objetivo de este trabajo es analizar los casos de mucormicosis en un hospital terciario de 700 camas entre enero de 2014 y febrero de 2015.

Métodos. Se identificaron de forma retrospectiva los casos microbiológicamente documentados de mucormicosis mediante una búsqueda en la base de datos del laboratorio de Microbiología. Se obtuvieron los datos demográficos, clínicos y de tratamiento a partir de la historia clínica de los pacientes. Las muestras se sembraron siguiendo los procedimientos de rutina de nuestro laboratorio. La identificación preliminar se realizó por observación de las características micro- y macroscópicas de la colonia, y la identificación definitiva se alcanzó mediante técnicas de secuenciación. Se amplificó y secuenció la región ITS2, que está altamente conservada en los hongos, pero cuya secuenciación permite una buena discriminación entre diferentes géneros y especies.

Resultados. En el período de estudio se registraron cinco casos de mucormicosis. La media de edad fue 47 años y tres de los pacientes eran varones. Se encontraron dos casos de mucormicosis cutánea por *Lichteimia corymbifera* en pacientes con politraumatismos severos, dos casos de mucormicosis pulmonar por *L. corymbifera* y *Cunninghamella bertholletiae* en pacientes oncohematológicos y un caso de mucormicosis rinocerebral por *Rhizopus oryzae* en un paciente receptor de trasplante alogénico de médula ósea. Todos los pacientes recibieron tratamiento con anfotericina B. En los casos de mucormicosis cutánea y rinocerebral se realizaron, además, desbridamientos de la zona afectada. La evolución fue favorable en los casos de mucormicosis cutánea y rinocerebral, con resolución de la infección en todos los casos. Los casos de mucormicosis

pulmonar, a pesar del tratamiento recibido, tuvieron un resultado fatal.

Conclusiones. El número de casos detectados en nuestro hospital durante el período del estudio fue superior al que podría haberse esperado según las estimaciones de estudios recientes, que calculan una incidencia de 0,04 casos/100.000 habitantes en España, y una incidencia algo mayor en Francia (0,12 casos/100.000 habitantes). La buena respuesta de los casos de mucormicosis cutánea y rinocerebral puede atribuirse a un diagnóstico rápido, seguido de un tratamiento antifúngico correcto con anfotericina B asociado a un desbridamiento amplio de las lesiones. El diagnóstico de los casos de mucormicosis pulmonar fue tardío, por lo que el tratamiento se pautó cuando la enfermedad ya estaba avanzada y el resultado fue, en ambos casos, fatal. Los datos del presente estudio apoyan la teoría de que la sospecha clínica y la correcta aplicación de técnicas diagnósticas permiten adelantar el diagnóstico de mucormicosis, lo cual permitiría comenzar el tratamiento lo antes posible y mejorar el pronóstico de los pacientes.

Epidemiología de las infecciones fúngicas superficiales en un hospital de tercer nivel del este de España

Lorena Lozano García¹, Elisa Ibáñez Martínez², Iris Gómez Alfaro², Patricia Falomir Salcedo², Rosa Blázquez Garrido¹, Javier Pemán²

¹Hospital General Universitario Morales Meseguer; ²Servicio de Microbiología y Parasitología Clínicas, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, España

Correspondencia: Lorena Lozano García. lorena.lozano@hotmail.com. Teléfono: +669091518

Antecedentes. Las micosis superficiales son infecciones causadas por distintos tipos de hongos, entre los que se encuentran principalmente los dermatofitos, aunque también pueden estar provocadas por hongos levaduriformes y, con menos frecuencia, por otros hongos filamentosos no dermatofitos. Sin embargo, su prevalencia y epidemiología se ven influidas por características regionales y climáticas, variables en función de la región geográfica de estudio.

Objetivos. Análisis de la epidemiología de las infecciones fúngicas superficiales en un hospital del este de España durante un período de 4,5 años.

Métodos. Estudio retrospectivo de los aislamientos microbiológicos clínicamente significativos en el Hospital Universitario La Fe (Valencia) entre enero de 2010 y junio de 2015. Los resultados se analizaron según el tipo de muestra (uña, pelo, piel) y la edad del paciente (0-15 años, 16-45 años, >45 años).

Resultados. Se incluyeron en el estudio un total de 2.878 muestras: de uña (1.850), piel (948) y pelo (80), con resultados positivos para hongos en un 43,45%; 36,28 y 22,5%, respectivamente. Los aislamientos más frecuentes correspondieron a dermatofitos, con *Trichophyton* como el género aislado en más ocasiones (456; 39,1%), y las especies *T. rubrum* (233; 19,98%) y *T. mentagrophytes* (176; 15,9%) como las más habituales. Se aisló *Microsporum* en 33 ocasiones (2,83%): *M. canis* (24; 2,06%) y *M. gypseum* (9; 0,77%). Se obtuvieron 464 aislamientos de levaduras (39,79%), de las que 410 (35,16%) pertenecían al género *Candida* (*C. parapsilosis*: 256; 21,95%; *C. albicans*: 79; 6,78%; *C. glabrata*: 24; 2,06%). Entre los hongos no dermatofitos destacaron *Acremonium* spp. (53; 4,5%), *Scopulariopsis brevicaulis* (46; 3,95%) y *Fusarium* spp. (14; 1,2%). En el análisis por tipo de muestra los aislamientos más frecuentes en muestras de uña correspondieron a *Candida* (310; 38,7%) (*C. parapsilosis*: 201; 10,92%; *C. albicans*: 57; 3,10%), *T. rubrum* (147; 18,35%) y *T. mentagrophytes* (106; 13,23%). No hubo diferencias significativas en incidencia por edades. Sin embargo, la frecuencia fue mayor en los grupos de edad más avanzada (0-15 años: 21; 44,78%; 16-45 años: 229; 42,72%; >45 años: 551; 43,8%). En las muestras de pelo predominaron *T. verrucosum* (6; 33,33%) y

T. rubrum (3; 16,67%). En este caso la incidencia y frecuencia de las dermatofitosis fue mayor en pacientes más jóvenes: 0-15 años: 10 (20,41%); 16-45 años: 7 (28%) y >45 años: 1 (16,67%). En las muestras de piel se aisló principalmente *Candida* (93; 27,27%) (*C. parapsilosis*: 55; 5,83%; *C. albicans*: 21; 2,23%), *T. rubrum* (82; 24,05%) y *T. mentagrophytes* (70; 2,05%), con una incidencia media del 36,16% y una frecuencia que aumentó con la edad: 0-15: 57 (31,84%), 16-45: 128 (35,56%) y >45: 156 (38,61%). Hubo 78 infecciones mixtas (6,69%), de las cuales 50 (4,29%) correspondieron a aislamientos de dermatofitos u hongos filamentosos con hongos levaduriformes y 22 (1,89%) a varias especies de hongos levaduriformes.

Conclusiones. En nuestro medio fueron principalmente los dermatofitos los hongos asociados a micosis superficiales. La especie más frecuente fue *T. rubrum* tanto en muestras de pelo como de uña y piel, seguida de *T. mentagrophytes* y *M. canis*. Una alta proporción de estas infecciones estuvo causada por levaduras, principalmente *C. parapsilosis*, y fueron *Acremonium* y *S. brevicaulis* los hongos no dermatofitos con más frecuencia implicados en micosis superficiales en nuestra área.

Descripción de tres casos de queratitis micótica

Mario Ruiz-Bastián, C. Muñoz-Paraíso, M. Regodón-Domínguez, M.T. Durán-Valle, J.L. Gómez-Garcés

Hospital Universitario de Móstoles, Móstoles, Madrid, España

Correspondencia: Mario Ruiz Bastián. Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Móstoles. Móstoles, Madrid, España. Teléfono: +34626918404. E-mail: mario.ruiz.bastian@gmail.com

Antecedentes. La queratitis infecciosa es una inflamación de la córnea que puede estar producida por bacterias, hongos, virus o parásitos. Las queratitis micóticas o fúngicas pueden producirla tanto levaduras como hongos filamentosos.

Objetivos. El objetivo de este trabajo es describir tres casos de queratitis micótica diagnosticados en el Hospital Universitario de Móstoles (2005-2015).

Métodos. Revisión retrospectiva de las historias clínicas de pacientes con examen directo o cultivo de raspados o biopsias corneales positivos para hongos. Se recogieron los datos demográficos, factores predisponentes, presentación clínica, tratamiento y evolución. La identificación de levaduras se realizó por el método Vitek MS (bioMérieux) y la de hongos filamentosos por métodos fenotípicos habituales. La sensibilidad a antifúngicos se estudió por E-test para *Candida* en agar RPMI (anfotericina B y candidinas) y agar Mueller-Hinton con azul de metileno (azoles), y por la metodología EUCAST para *Fusarium*.

Resultados. **Caso 1:** Varón de 44 años que acude al hospital en octubre de 2011 por absceso corneal en el ojo derecho secundario a trasplante de córnea un mes antes. En 2008 había sido intervenido con cirugía refractiva, que se complicó hasta desarrollar una lesión corneal. En el examen en fresco del raspado corneal se observaron micelios y se inició tratamiento con voriconazol iv y tópico, anfotericina B liposomal iv y, posteriormente, se administró voriconazol intravítreo. En el cultivo creció, a los cinco días, *Fusarium solani* y se añadió al tratamiento un colirio de natamicina. A pesar del tratamiento médico y quirúrgico, evolucionó a panofalmitis, que requirió evisceración y colocación de prótesis. **Caso 2:** Mujer de 66 años diagnosticada en octubre de 2012 de queratitis bilateral con úlcera corneal infiltrada en el ojo izquierdo. La paciente presentaba glaucoma crónico simple, distriquisias con entropión cicatricial y blefaritis en ambos ojos. En el cultivo corneal del ojo izquierdo se aisló *Candida albicans*. Se inició tratamiento con voriconazol tópico y se añadió voriconazol oral por la formación de un absceso corneal; la paciente se curó. **Caso 3:** Mujer de 60 años que había sido diagnosticada en 2012 de leucoma postterapéutico e

intervenida de cataratas en ambos ojos en enero de 2014; unos días después presentó una úlcera corneal en el ojo izquierdo a pesar del tratamiento profiláctico con valaciclovir. Continuó con la terapia antiviral y se colocaron parches de membrana amniótica e injerto de esclera consecutivamente. En octubre de 2014 ingresó por perforación corneal del ojo izquierdo y en el cultivo de la biopsia corneal creció, a los cinco días, *Fusarium oxysporum*. Se comenzó tratamiento con voriconazol tópico y oral, anfotericina B liposomal iv y colirio de natamicina. Ese mismo mes recibió un trasplante de córnea ineficaz, y finalmente se procedió a la evisceración e implantación de una prótesis. Las CMI ($\mu\text{g/ml}$) para *C. albicans*, *F. solani* y *F. oxysporum* fueron, respectivamente, 0,5; 1 y 2 para la anfotericina B; 0,5, -, - para el fluconazol; 0,016, >8 y >8 para el itraconazol; 0,016, >8 y 8 para el voriconazol y 0,25, >16 y >16 para la caspofungina.

Conclusiones. La queratitis micótica en una entidad rara. En nuestro hospital, en los últimos 10 años, solo se han diagnosticado tres casos. Los dos casos de queratitis por *Fusarium* comportaron la pérdida del ojo afectado.

Análisis de los dermatofitos recibidos entre los años 2003 y 2015 en el Centro Nacional de Microbiología

Rivero-Menéndez, Araceli Monzón, Manuel Cuenca-Estrella, Ana Alastruey-Izquierdo

Laboratorio de referencia de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

Correspondencia: Olga Rivero Menéndez. Laboratorio de referencia de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid, España. Teléfono: +34 918223661. E-mail: orivero@isciii.es

Antecedentes. Los dermatofitos son hongos que tienen la habilidad de invadir tejidos queratinizados como la piel, el pelo y las uñas y causar infecciones contagiosas. La enfermedad causada por estos hongos, llamada dermatofitosis, es común en todo el mundo y tiene gran importancia en el ámbito veterinario y de salud pública. El espectro de los dermatofitos aislados de lesiones de la piel ha cambiado a lo largo de los últimos 70 años. La mayor parte de los dermatofitos pertenecen a los géneros *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Arthroderma* e incluyen aproximadamente 30 especies que actúan como agentes etiológicos de la dermatofitosis en los seres humanos. En Europa, antes de la Segunda Guerra Mundial, *Microsporum audouinii* y *Epidermophyton floccosum* eran los más aislados, mientras que *Trichophyton rubrum* es el dermatofito más común desde los años 50 del pasado siglo. En la actualidad, el 80-90% de los aislamientos son *T. rubrum*, seguido en frecuencia por *Trichophyton mentagrophytes*, *sensu lato*.

Objetivos. El objetivo de este trabajo fue determinar las especies de los dermatofitos recibidos entre 2003 y 2015 en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología.

Métodos. Se analizaron todos los aislamientos de dermatofitos recibidos en el Servicio de Micología durante los últimos doce años. Todos fueron identificados mediante estudio morfológico macro- y microscópico. Además, se realizó la identificación molecular en 427 aislamientos.

Resultados. Un total de 2.812 aislamientos fueron analizados, de los cuales 57 fueron recibidos en 2003, 323 en 2004, 40 en 2005, 506 en 2006, 283 en 2007, 337 en 2008, 334 en 2009, 286 en 2010, 218 en 2011, 158 en 2012, 95 en 2013, 90 en 2014 y 85 en 2015. A lo largo de estos doce años se identificaron aislamientos de cuatro géneros distintos y 19 especies diferentes. El género más frecuente fue *Trichophyton* con 2.355 aislamientos (83,7% del total), entre los que destacaron 1.330 de *T. rubrum* (47,3%), 417 de *T. interdigitale* (14,8%) y 133 de *T. mentagrophytes* (4,8%). El siguiente género más frecuente fue *Microsporum* con 379 aislamientos (13,5%) y *Arthroderma* con

21 (0,7%). El uso de la identificación molecular evidenció que los aislamientos identificados morfológicamente como *T. mentagrophytes* eran *T. interdigitale*.

Conclusiones. 1) Las especies del género *Trichophyton* fueron las que se aislaron de forma mayoritaria, con *T. rubrum* como la especie

más frecuente. 2) La identificación molecular permitió la identificación de *T. interdigitale* como la especie más frecuente del complejo *T. mentagrophytes/T. interdigitale* en las muestras recibidas. 3) El uso de las herramientas moleculares permitió la identificación de especies menos frecuentes.