

Posters
Antifúngicos

Poster AF-1

Estudio de la sensibilidad *in vitro* de *Candida no albicans* frente a diversos antifúngicos mediante el sistema *Sensititre*®

B. Gomila, J. Galiano, L. Amselem, M.D. Tirado y M.E. Celades

Servicio de Microbiología, Hospital General de Castellón de la Plana

Objetivo: Estudiar la sensibilidad *in vitro* frente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y 5-fluocitosina en aislamientos clínicos de *Candida no albicans* en pacientes del área 02 de Castellón.

Material y métodos: Se estudiaron 156 aislamientos de *Candida no albicans* en los siguientes tipos de muestras: sangre, absceso, broncoaspirado, lavado broncoalveolar, catéter, esputo, orina, exudado ótico y exudado de herida. La identificación se realizó mediante el sistema VITEK 2 y el sistema API 32 C Levaduras (ambos de bioMérieux). La determinación de la CMI se llevó a cabo con el sistema *Sensititre*® a partir de un cultivo de 24 horas en medio Sabouraud. Los criterios de sensibilidad fueron los incluidos en el documento M27-A del NCCLS.

Resultados: De 156 cepas estudiadas, 54 (34,31%) correspondieron a *C. tropicalis*, 48 (30,78%) a *C. parapsilosis*, 36 (23,07%) a *C. glabrata*, 7 (4,49%) a *C. krusei*, 5 (3,20%) a *C. lusitaniae*, 4 (2,56%) a *C. guilliermondii*, 1 (0,64%) a *C. dublinensis* y 1 (0,64%) a *C. rugosa*. El comportamiento de las distintas especies de *Candida* frente a los distintos antifúngicos ensayados fue el que se indica en la siguiente Tabla:

Especies (n)	Categorías	Anfotericina B Nº cepas (%)	Fluconazol Nº cepas (%)	Itraconazol Nº cepas (%)	Ketoconazol Nº cepas (%)	5-fluocitosina Nº cepas (%)
<i>C. tropicalis</i> (54)	S	50 (92,5)	54 (100)	23 (42,6)	54 (100)	54 (100)
	DD	0	0	30 (55,5)	0	0
	R	4 (7,5)	0	1 (1,9)	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (48)	S	47 (97,9)	46 (95,8)	46 (95,8)	48 (100)	48 (100)
	DD	0	2 (4,2)	1 (2,1)	0	0
	R	1 (3,1)	0	1 (2,1)	0	0
<i>C. glabrata</i> (36)	S	35 (97,2)	11 (30,5)	1 (2,8)	20 (55,5)	36 (100)
	I	0	0	0	14 (38,9)	0
	DD	0	22 (61,1)	8 (22,2)	0	0
<i>C. krusei</i> (7)	R	1 (2,8)	3 (8,4)	27 (75)	2 (5,4)	0
	S	5 (71,4)	0	0	4 (57,1)	0
	I	0	0	0	2 (28,6)	7 (100)
<i>C. lusitaniae</i> (5)	DD	0	0	6 (85,7)	0	0
	R	2 (28,6)	7 (100)	1 (14,3)	1 (14,3)	0
	S	5 (100)	5 (100)	3 (60)	5 (100)	4 (80)
<i>C. guilliermondii</i> (4)	DD	0	0	2 (40)	0	0
	R	0	0	0	0	1 (20)
	S	4 (100)	4 (100)	3 (75)	4 (100)	3 (75)
<i>C. dublinensis</i> (1)	DD	0	0	1 (25)	0	0
	R	0	0	0	0	1 (25)
<i>C. rugosa</i> (1)	S	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
	DD	0	0	0	0	0

S = sensible, I = intermedio, DD = dosis dependiente, R = resistente.

Conclusiones: Se ha podido comprobar que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. dublinensis* y *C. rugosa*, presentan una elevada sensibilidad frente a los antifúngicos testados, mientras que *C. glabrata* y *C. krusei* mostraron su habitual elevada resistencia a fluconazol e itraconazol. Se observó que todas las cepas estudiadas fueron sensibles a la 5-fluocitosina.

Poster AF-2

Estudio de la actividad antifúngica de voriconazol en un modelo *in vitro* de simulación farmacodinámica

R. García, A. Calvo, R. Amores, B. Laguna y J. Prieto

Departamento de Microbiología I, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid

Introducción/objetivos

En los últimos años la resistencia de *Candida* spp. a los azoles es cada vez más frecuente debido a su uso masivo. Voriconazol (VOR) es un nuevo antifúngico del grupo de los azoles que posee una actividad superior a fluconazol (FLU), menor toxicidad y mejor farmacocinética. La tendencia actual es la aplicación de los resultados de las pruebas de sensibilidad antifúngica a los modelos de simulación farmacodinámicos que permiten aproximarnos lo máximo posible a lo que ocurre *in vivo*. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antifúngica de VOR y FLU mediante un modelo de simulación farmacodinámico *in vitro* frente a *C. albicans* y *C. glabrata*.

Material y métodos

Se estudiaron 8 aislados clínicos de *C. albicans*, 4 de *C. glabrata* y *C. albicans* ATCC 200955 con diferente sensibilidad. Rango de sensibilidad de FLU: 0,5-128 y 4-8 µg/ml frente a *C. albicans* y *C. glabrata*, respectivamente. Rango de sensibilidad de VOR: 0,03-32 y 0,06-0,25 µg/ml frente a *C. albicans* y *C. glabrata*, respectivamente. Se enfrentó un inóculo de 10⁶ UFC/ml de cada cepa a las concentraciones séricas alcanzadas por la administración de una dosis de 400 mg de VOR (12 horas) y una de 400 mg de FLU (24 horas) mediante un modelo de simulación farmacodinámico *in vitro*, microfiltración, previamente validado.

Resultados

Se observaron diferencias significativas en los recuentos en Log UFC/ml entre las curvas control y las curvas con VOR a las 12 horas y FLU a las 24 horas para todos los aislados tanto en *C. albicans* como para *C. glabrata* independientemente de la CMI del aislado. Al comparar la actividad de ambos fármacos, se observó una mayor actividad de VOR frente a FLU en 3 aislados de *C. albicans* a las 12 h, mientras que en los aislados de *C. glabrata* estudiados no se observaron diferencias significativas a este mismo tiempo entre ambos fármacos. No se apreció ninguna correlación significativa entre la muerte desarrollada por VOR y FLU con el AUC/CMI, C_{max}/CMI y el T>CMI.

Conclusiones

FLU y VOR presentaron un comportamiento fungistático (reducción inferior a 3 Log UFC/ml). Dicho comportamiento fue similar en las cepas de *C. albicans* y *C. glabrata* tanto sensibles como resistentes a VOR y FLU, hecho que demostraría la importancia de las concentraciones subinhibitorias de los azoles en la actividad desarrollada frente a estos microorganismos. La escasa correlación con los índices de eficacia dejan patente la dificultad de establecer una predicción clínica adecuada con los azoles y *Candida* spp. mediante los parámetros existentes.

Poster AF-3

Estudio *in vitro* de la actividad fungistática y fungicida de caspofungina sobre levaduras y *Candida no albicans* determinada por dos métodos: M27-A2 y EUCAST

M. Romero, J. Pemán, E. Cantón, J. Frasset, A. Orero y M. Gobernado

Centro de Investigación y Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia

Objetivos: Estudiar la actividad fungistática y fungicida de caspofungina sobre levaduras *no albicans* por métodos de microdilución en caldo realizados siguiendo las normas propuestas por dos comités para la estandarización de ensayos clínicos: NCCLS (M27-A2) y EUCAST.

Material y métodos: El estudio incluyó 147 cepas de levaduras procedentes de hemocultivos y pertenecientes a 14 especies: *C. famata* (5), *C. glabrata* (34), *C. guilliermondii* (13), *C. inconspicua* (1), *C. krusei* (22), *C. lambica* (1), *C. lusitanae* (3), *C. parapsilosis* (17), *C. sake* (1), *C. tropicalis* (42), *B. capitatum* (3), *P. ohmeri* (1), *S. cerevisiae* (2) y *Y. lipolytica* (1). Como cepa control de calidad se empleó ATCC 6258 (*C. krusei*).

Pruebas de sensibilidad: NCCLS, como medio de cultivo se utilizó RPMI1640 con glutamina y sin bicarbonato, el inóculo fue del orden de 10^3 UFC/ml y la lectura de la CMI visual a las 48 horas de incubación. EUCAST: se utilizó el mismo medio suplementado con un 2% de glucosa, el inóculo fue del orden de 10^5 UFC/ml y la lectura de la CMI espectrofotométrica a las 24 horas de incubación.

Determinación de la CMF: se transfirieron a SDA 100 μ l (M27-A2) o 10 μ l (EUCAST) de los pocillos sin crecimiento y se realizó recuento del número de colonias tras 48 horas de incubación a 35 °C.

Se definieron la CMI₂ y la CMI₀ como la mínima concentración de antifúngico que produjo una reducción del crecimiento con respecto al control $\geq 50\%$ y del 100% respectivamente. La CMF fue la concentración más baja que produjo una reducción del número de UFC $\geq 99\%$ con respecto al inóculo inicial.

Resultados: Los resultados de CMI₂, CMI₀ y CMF obtenidos para el 50% de la población en las diferentes especies se muestran en la siguiente tabla:

Especie (n°)	M27-A2			EUCAST		
	CMI ₂ 50%	CMI ₀ 50%	CMF 50%	CMI ₂ 50%	CMI ₀ 50%	CMF 50%
<i>C. glabrata</i> (34)	0,5	2	2	0,25	0,5	1
<i>C. guilliermondii</i> (13)	1	2	≥ 64	1	4	≥ 64
<i>C. krusei</i> (22)	1	2	2	0,5	1	2
<i>C. parapsilosis</i> (17)	2	2	4	1	2	≥ 64
<i>C. tropicalis</i> (42)	0,5	1	1	0,25	0,5	0,5
Miscelánea (19)	1	2	2	1	1	8
Total (147)	1	2	2	0,5	1	2

Conclusiones: Caspofungina tiene buena actividad sobre las especies estudiadas. La CMI₂ y la CMI₀ para el total de las cepas es ≤ 2 μ g/ml (NCCLS) y ≤ 1 μ g/ml (EUCAST). La diferencia entre la CMI₂ y la CMI₀ es de una dilución. Las CMF, son más altas especialmente en *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*, especies sobre las que caspofungina es intrínsecamente menos activa.

Poster AF-4

Etiología y estudio de sensibilidad de las fungemias durante un periodo de cuatro años

M.V. García, R. Rodríguez, M.M. Gallardo, E. Martín, A. Rivera, I. Viciano, C. Arana y A. Pinedo

Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria, Málaga

Introducción: Las levaduras son una causa emergente de sepsis en pacientes hospitalizados por lo que un tratamiento adecuado de estos procesos es fundamental.

Objetivos: Conocer la etiología y sensibilidad de las fungemias diagnosticadas en nuestro laboratorio en un periodo de cuatro años.

Material-métodos: Se estudiaron 34.061 hemocultivos desde enero de 1998 hasta diciembre 2002 que se procesaron por el sistema automatizado Bactec-9240® (Becton Dickinson). La identificación se llevó a cabo a través de test de filamentación, tinta china y el sistema automático MicroScan RY1® (Dade Berhing). Para el estudio de sensibilidad se usó el sistema de microdilución Sensititre® (Izasa).

Resultados: Se estudiaron un total de 73 pacientes con hemocultivos positivos para levaduras de los cuales 41 (56,2%) fueron varones y 32 (43,8%) mujeres, la edad media fue de 55,79 años (rango: 15-83). La levadura más aislada fue *C. albicans* 27 (37%), seguida de *C. tropicalis* 14 (19,2%), *C. parasilopsis* 11 (15,1%), *C. glabrata* 7 (9,6%), *C. lusitaniae* 5 (6,8%), *C. krusei* 4 (5,5%), *C. neoformans* 2 (2,7), otras 2 (2,7%). La sensibilidad a los antifúngicos testados se recoge en la siguiente tabla:

	S	SDD	I	R
Anfotericina	100%	–	–	–
Fluconazol	86,3%	6,8%	1,4%	5,5%
Itraconazol	83,6%	8,2%	–	8,2%
Ketoconazol	90,4%	1,4%	8,2%	–
5-fluocitosina	91,8%	–	4,1%	4,1%
Voriconazol	9,4%	–	–	4,1%

SDD: sensible dosis dependiente.

Todas las cepas de *C. albicans*, *C. guilliermondi*, *C. parasilopsis*, *C. lusitaniae* y *C. neoformans* fueron sensibles a todos los antifúngicos, mientras que *C. glabrata* fue resistente a voriconazol (14,3%) y a itraconazol (42,9%). *C. tropicalis* resistente a voriconazol (14,3%), itraconazol (14,3%), 5-fluocitosina (2%) y fluconazol (14,3%). *C. krusei* resistente a itraconazol (50%), 5-fluocitosina (25%) y fluconazol (25%).

Conclusiones:

- 1) *C. albicans* es la especie más aislada y la causa más frecuente de fungemia en nuestro medio.
- 2) La sensibilidad a anfotericina B fue del 100%.
- 3) La resistencia global a fluconazol fue del 5,5%, siendo *C. albicans* sensible en el 100% de los casos.
- 4) Las especie más resistentes fueron *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.

Poster AF-5

Sensibilidad de *Candida albicans* a los azoles en los dos últimos años

M.J. Linares, F. Solís, A. Ibarra, F.C. Rodríguez, M.J. Lacasa y M. Casal

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba

Objetivo: Estudiar retrospectivamente las sensibilidades de cepas de *C. albicans* a tres azoles (fluconazol, itraconazol y ketoconazol) durante el periodo Enero 2000 a Diciembre de 2002.

Material y Métodos: Se realizó un estudio retrospectivo de las sensibilidades de 1.249 cepas de *C. albicans* aisladas de diferentes muestras clínicas (hemocultivos, exudados de heridas, esputo, aspirados bronquiales, biopsia y orina).

La identificación se llevó a cabo mediante procedimientos habituales (microscópicos, macroscópicos y bioquímicos). El estudio de sensibilidad se realizó utilizando un test de microdilución en placa (SENSITITRE ®/ALAMAR YEAST ONE IZASA) que detecta la CMI de los antifúngicos: Fluconazol (FZ), Itraconazol (IZ) y Ketoconazol (KZ).

Los rangos de las concentraciones ensayadas por los diferentes antifúngicos fueron: para FZ de 0.125 - 256; IZ de 0.008 - 16; KZ de 0.008 - 16. El inóculo, el tiempo de incubación y la lectura se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron cuatro cepas control: *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 90018 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Resultados: Durante el periodo de estudio, se evaluaron un total de 1.249 episodios de candidosis por *C. albicans* en 1.108 pacientes. Los rangos de CMI para los tres azoles fueron: para FZ de 1 - ≥ 256 ; IZ de 0.03 - ≥ 16 ; KT de 0.016 - ≥ 16 . Las CMI₅₀ para los diferentes antifúngicos fueron: FZ 1, IZ 0.06 y KZ 0.06. Las CMI₉₀ de las levaduras aisladas frente a los diferentes azoles fueron: FZ 4; IZ 0.125; KT 0.03. El 6% de las cepas presentaron resistencia *in vitro* a FZ y el 2% se mostraron con sensibilidad dependiente de la dosis. El 2% de las cepas mostraron resistencia frente a IZ y el 1% con sensibilidad dependiente de la dosis.

Conclusión: Aunque *C. albicans* todavía se manifiesta con sensibilidad a los azoles, estos datos podría justificar la necesidad de realización de técnicas de sensibilidad *in vitro* de todos los aislamientos.

Poster AF-6

Actividad fungicida de voriconazol y caspofungina sobre *Candida krusei*

J. Frasquet, M. Romero, J. Pemán, E. Cantón, N. Aparisi y M. Gobernado

Centro de Investigación y Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia

Objetivos: Estudiar la actividad fungicida de voriconazol y caspofungina sobre *Candida krusei* mediante curva de letalidad o mortalidad-tiempo.

Material y métodos: El estudio se realizó con 5 cepas de *Candida krusei* procedentes de hemocultivos. Como cepa control de calidad se empleó *Candida krusei* ATCC-6258.

La CMI se determinó mediante el método descrito en el documento M27-A del NCCLS utilizando los inóculos, 10^3 UFC/ml (voriconazol y caspofungina) y 10^4 UFC/ml (voriconazol). Se determinaron la CMI_2 y la CMI_0 (mínima concentración de antifúngico que produce una reducción del crecimiento con respecto al control $\geq 50\%$ y del 100% , respectivamente).

La concentración mínima fungicida (CMF) se determinó transfiriendo 100l de los pocillos sin crecimiento de las CMI a placas de agar Sabouraud para hacer el recuento del número de colonias viables tras 48 h de incubación a 35°C . La CMF se definió como la concentración más baja que produjo una reducción de crecimiento $\geq 99\%$ con respecto al inóculo inicial.

Las curvas de mortalidad-tiempo se realizaron en medio RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato, volumen final 5 ml, con un inóculo de 10^5 UFC/ml. Las concentraciones de antifúngicos ensayadas fueron 0,03, 0,12, 0,5, 2, 8 y 32 $\mu\text{g/ml}$. Las UFC se determinaron a las 0, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas de incubación.

Resultados: Los resultados de CMI_0 , CMI_2 y CMF obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

	Inóculo 10^3 UFC/ml						Inóculo 10^4 UFC/ml					
	Intervalo ($\mu\text{g/ml}$)			Media geométrica			Intervalo ($\mu\text{g/ml}$)			Media geométrica		
	CMI_2	CMI_0	CMF	CMI_2	CMI_0	CMF	CMI_2	CMI_0	CMF	CMI_2	CMI_0	CMF
Voriconazol	0,25-2	0,5-2	1-8	0,57	1	2,3	0,5-2	1-2	1-8	0,87	1,5	3,03
Caspofungina	1-2	1-2	1-8	1,32	1,74	2,29	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Las curvas de mortalidad-tiempo mostraron que la actividad fungicida de voriconazol se inició a las 8-12 horas de incubación, dependiendo de la concentración y de la cepa ensayada, y la de caspofungina entre las 2-4 h.

A las 48 h de incubación la diferencia en UFC/ml respecto al control de crecimiento fue de 1,4-3 Log con 2 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol y de 4,32-5,40 Log para 2 $\mu\text{g/ml}$ de caspofungina.

Conclusiones: Ambos antifúngicos son activos sobre *Candida krusei*. La actividad fungicida de caspofungina es mayor y más rápida que la de voriconazol.

La repercusión clínica de estos hallazgos debe validarse mediante ensayos clínicos.

Poster AF-7

Actividad fungicida de voriconazol en *Candida* spp.

M.C. Rubio^{1,2}, J. Gil^{1,2}, I. Ramírez de Ocariz¹, R. Benito^{1,2} y A. Rezusta²

¹Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza;

²Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina de Zaragoza

Objetivo: Estudiar la actividad fungicida de voriconazol frente a aislamientos clínicos de *Candida* spp.

Material y métodos: Se ha evaluado el efecto fungicida de voriconazol frente a 54 cepas de *Candida* spp. procedentes de muestras clínicas de pacientes atendidos en el Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" de Zaragoza. La distribución por especies es: 20 *C. glabrata*, 14 *C. krusei*, 7 *C. parapsilosis*, 5 *C. dubliniensis*, 3 *C. lusitaniae*, 2 *C. albicans*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. guilliermondii* y 1 *C. famata*. Como cepa control de calidad se utilizó *C. parapsilosis* ATCC 22019.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó siguiendo las recomendaciones del NCCLS, documento M27-A2.

La concentración mínima fungicida (CMF) se estableció realizando el recuento de células viables con respecto al inóculo inicial. Para ello se transfirió 100 µl de cada uno de los pocillos sin crecimiento a placas de agar Sabouraud que se incubaron 48 horas a 35 °C. La CMF se definió como la menor concentración de antifúngico que redujo el crecimiento $\geq 99\%$.

Resultados: El rango de CMI y de CMF, la CMI₅₀ y CMI₉₀, la CMF₅₀ y CMF₉₀ de voriconazol frente a 54 aislamientos clínicos de *Candida* spp. se muestran en la tabla siguiente:

Especie (nº)	CMI (µg/ml) voriconazol			CMF (µg/ml) voriconazol		
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMF ₅₀	CMF ₉₀	Rango
<i>Candida glabrata</i> (20)	0,06	0,5	0,03-1	4	8	0,5->8
<i>Candida krusei</i> (14)	0,25	0,25	0,12-0,25	2	2	1-2
<i>Candida</i> spp.* (20)	≤0,015	0,03	≤0,015-0,25	0,25	2	0,03-4
Total (54)	0,06	0,25	≤0,015-1	1	4	0,03->8

*7 *C. parapsilosis*, 5 *C. dubliniensis*, 3 *C. lusitaniae*, 2 *C. albicans*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. guilliermondii* y 1 *C. famata*.

Para *C. parapsilosis* cuyas CMI están comprendidas entre ≤0,015-0,03 µg/ml, el rango de CMF fue de 0,06 a 2 µg/ml. Las 5 *C. dubliniensis* estudiadas fueron inhibidas por ≤0,015 µg/ml y el rango de CMF fue de 0,06 a 4 µg/ml. Las 3 *C. lusitaniae* fueron inhibidas por ≤0,015 µg/ml y el rango de CMF fue de 0,06 a 0,25 µg/ml. Las CMI de las 2 *C. albicans* fueron ≤0,015 µg/ml y 0,03 µg/ml y las CMF 0,25 y 0,5 µg/ml. Todas las cepas de *C. lusitaniae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. famata* presentaron una CMF ≤1 µg/ml. Esta misma concentración mostró actividad fungicida sobre el 85,7% de *C. parapsilosis*, el 80% de *C. dubliniensis*, el 50% de *C. glabrata* y el 42,8% de *C. krusei*.

Conclusiones: La actividad fungicida de voriconazol frente a *Candida* spp. es especie dependiente. Muestra buena actividad frente a especies como *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* y menor frente a *C. krusei* (42,8%).