

SAMPAC

2013

14 - 15

NOVIEMBRE

CÁDIZ

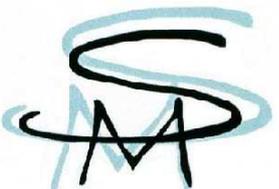
NUEVAS TECNOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS
EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA:
ENTRE LA GENÓMICA Y LA PROTEÓMICA.



XXVI

REUNIÓN DE LA
SOCIEDAD ANDALUZA DE
MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA
CLÍNICA

S
A
M
P
A
C





XXVI REUNIÓN SAMPAC

Cádiz 2013

**Nuevas tecnologías diagnósticas en
Microbiología Clínica:
entre la genómica y la proteómica**

Libro de Abstracts



Comité de Honor

Excma. Sra. Consejera de Salud de la Junta de Andalucía

D^a. María José Sánchez Rubio

Excma. Sra. Alcaldesa del Ayuntamiento de Cádiz

D^a Teófila Martínez Sáiz

Excmo. Sr. Presidente de la Diputación de Cádiz

D. José Loaiza García

Excmo. Sr. Rector Magnífico de la Universidad de Cádiz

D. Eduardo González Mazo

Ilmo. Director Gerente del Servicio Andaluz de Salud

D. José Luís Gutiérrez Pérez

Ilmo. Delegado Territorial de Salud y Bienestar Social de la Junta de Andalucía

D. Ángel Acuña Racero

Ilmo. Sr. Director Gerente del C.H. de Cádiz, Cádiz

D. Rafael Pereiro Hernández

Ilmo. Sr. Decano de la Facultad de Medicina

D. Antonio Lorenzo Peñuelas



Comité Organizador

Presidente	Dr. Manuel Rodríguez Iglesias
Secretaria	Dra. Clotilde Fernández Gutiérrez del Álamo
Vocales	Dra. Fátima Galán Sánchez
	Dr. Pedro García Martos
	Dra. Ana María García Tapia
	Dra. Inmaculada Guerrero Lozano
	Dra. María Dolores López Prieto
	Dra. Pilar Marín Casanova
	Dra. Carmen Martínez Rubio
	Dr. Santiago Pérez Ramos
	Dra. Inés Ruíz Molina
	Dr. Antonio Sánchez Porto



Comité Científico

Presidente honorario

Dr. José Mira Gutiérrez

Vocales

Dr. Juan Carlos Alados Arboledas

Dra. Berta Becerril Carral

Dr. Jesús Manuel Cantoral Fernández

Dr. Javier Casas Ciria

Dra. Clotilde Fernández Gutiérrez del Álamo

Dra. Carolina Freyre Carrillo

Dra. Fátima Galán Sánchez

Dr. Pedro García Martos

Dra. Ana María García Tapia

Dra. Iría Jesús de la Calle

Dra. Pilar Marín Casanova

Dr. Manuel Rodríguez Iglesias

Dra. Francisca de la Rubia Martín



Junta Directiva de la SAMPAC

Presidente	Dr. José María Navarro Marí
Vicepresidente	Dr. José Antonio Lepe Jiménez
Secretaria	Dra. Begoña Palop Borrás
Tesorera	Dra. Mercedes Pérez Ruiz
Vocal Almería	Dr. Waldo Sánchez-Yebra Romera
Vocal Cádiz	Dr. Juan Carlos Alados Arboledas
Vocal Córdoba	Dr. Manuel Causse del Río
Vocal Granada	Dr. Federico García García
Vocal Huelva	Dra. Matilde de la Iglesia Salgado
Vocal Jaén	Dra. Carolina Roldán Fontana
Vocal Málaga	Dra. M ^a Victoria García López
Vocal Sevilla	Dra. Maite Ruiz Pérez de Pipaón



JUEVES 14 NOVIEMBRE

16:00 Recogida de documentación

16:30 Exposición de comunicaciones orales (O01-O08))

Moderadoras:

- Matilde de la Iglesia Salgado (H Infanta Elena, Huelva)
- Natalia Montiel Quezel-Guerraz (H Costa del Sol, Marbella)

18:00 Café y visita al área de póster

18:30 Mesa Redonda I (SAMPAC/SAEI)

"Situación actual y perspectiva futura de la colaboración entre Microbiología y Enfermedades Infecciosas".

Moderadores:

- Jose María Navarro Marí (HU Virgen de las Nieves, Granada)
- Antonio Vergara de Campos (HU Puerto Real, Cádiz)

Ponentes:

- **El laboratorio de Microbiología Clínica y las Enfermedades Infecciosas.** Estrella Martín Mazuelos (HU Virgen de Valme, Sevilla)
- **¿Cómo la práctica clínica esta influenciada por los avances microbiológicos?** José Antonio Girón González (HU Puerta del Mar, Cádiz).
- **La experiencia de una UGC mixta de Microbiología y Enfermedades Infecciosas.** María Dolores López Prieto (H de Jerez de la Frontera).
- **Unidades de Gestión Clínica multidisciplinares en el Sistema Sanitario Público de Andalucía.** Jerónimo Pachón Díaz (Director General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación. Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales)

20:00 Inauguración Oficial

20:30 Conferencia "Rey Calero".

"La resistencia a antibióticos como enfermedad medioambiental: ¿es posible intervenir con estrategias Eco-Evo?"

- Fernando Baquero (Instituto Ramón y Cajal para la Investigación Sanitaria, Madrid)
- Presentación: Clotilde Fernández Gutiérrez del Álamo (HU Puerta del Mar de Cádiz)

21:30 Recepción de Bienvenida



VIERNES 15 NOVIEMBRE

09:00 Casos de Microbiología Clínica interactivos (con la colaboración de MSD)

Moderadoras:

- Encarnación Clavijo (HU Virgen de la Victoria, Málaga) y
- Fátima Galán Sánchez (HU Puerta del Mar, Cádiz)

10:30 Mesa Redonda II

“Avances en técnicas moleculares aplicadas a Microbiología Clínica”.

Moderadores:

- Manuel Casal Román (HU Reina Sofía, Córdoba) y
- Federico García García (HU San Cecilio, Granada)

Ponentes:

- **“Experiencia en el uso de las nuevas plataformas de diagnóstico molecular multiplex en el laboratorio de Microbiología”.** Manuel Causse del Río (HU Reina Sofía, Córdoba)
- **"Nuevos enfoques en el control de transmisión de patógenos multirresistentes a partir de los resultados de epidemiología molecular".** Lorena López Cerero (HU Virgen Macarena, Sevilla)
- **“Nuevas Técnicas de Secuenciación de Ácidos Nucleicos: Aplicaciones en Microbiología Clínica”.** Federico García García (HU San Cecilio, Granada)

12:00 Café y visita al área de pósters

12:30 Asamblea de socios de la SAMPAC

14:00 Comida de trabajo (Parador de Cádiz)

15:30 Exposición de comunicaciones orales (O09-O16).

Moderador:

- Waldo Sánchez-Yebra (C.H. Torrecárdenas, Almería)
- Carolina Roldán Fontana (C.H. de Jaen, Jaen)

17:00 Café y visita al área de pósters

17:30 Mesa Redonda III

“La espectrometría de masas y otras técnicas de análisis proteómico”.

Moderadores:

- Javier Aznar Martín (HU Virgen del Rocío, Sevilla) y
- Jordi Vila Estapé (Hospital Clínico, Barcelona)



Ponentes:

- **"Identificación directa de bacterias desde hemocultivos positivos mediante espectrometría de masas. Aspectos técnicos y clínicos"**. José Antonio Lepe Jiménez (HU Virgen del Rocío, Sevilla)
- **"Aplicación DE MALDITOF-MS en detección de resistencias bacterianas y estudios epidemiológicos"**. Dolores Rojo Martín (HU Virgen de las Nieves, Granada)
- **"Espectrometría de masas MALDI-TOF: Más allá de la identificación bacteriana y fúngica"**. Jordi Vila Estapé (Hospital Clínico, Barcelona)

19:00 Foro de debate

"El futuro de la especialidad de Microbiología Clínica".

Moderadores:

- Álvaro Pascual Hernández (HU Virgen Macarena, Sevilla) y
- Begoña Palop Borrás (HU Carlos Haya, Málaga)

21:30 Cena de Clausura y Entrega de Premios



PONENCIAS



El laboratorio de Microbiología Clínica y las Enfermedades Infecciosas

E.Martín Mazuelos

Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Hospital Universitario de Valme. Sevilla

La Microbiología Clínica (MC) es una especialidad muy consolidada en nuestro país, pero en los últimos años ha sufrido cambios destacables, tanto desde el punto de vista filosófico como tecnológico. La MC, adquiere gran entidad ya a finales del siglo XIX pero se va consolidando a lo largo del siglo XX, estructurándose como especialidad bien diferenciada de otras especialidades en los años 50. En las dos décadas siguientes, adquiere gran protagonismo, gracias a la intensa labor realizada en estos años por microbiólogos clínicos de Madrid y Barcelona. Todo ello coincide con el impulso que sufre el Sistema Sanitario Público y que da lugar a la creación de nuevos hospitales. El primer servicio de MC se creó en 1966 en el Hospital Puerta de Hierro en Madrid. La MC tiene funciones asistenciales, docentes y de investigación, que le permiten cumplir sus objetivos (diagnóstico etiológico, tratamiento, prevención y control de las enfermedades infecciosas (EI)), algunos específicos y otros compartidos con otras especialidades que también manejan las EI, en este sentido cabe destacar que el microbiólogo clínico no tiene su frontera en el laboratorio, sino que estas son mucho más amplias, teniendo que coordinarse con otras especialidades y entre estas especialidades está la de EI. Aunque las EI datan desde muy antiguo, es a principios de los 80 con la pandemia del SIDA, cuando adquiere realmente importancia, porque surge la necesidad de especialistas en este Área de conocimiento, para el manejo del SIDA y de sus infecciones concomitantes. Los primeros Servicios de EI en España lo constituyeron internistas dedicados a las EI y es en el Hospital de Bellvitge de Barcelona y en el Ramón y Cajal de Madrid donde aparecen los primeros servicios como tales, aunque en la actualidad, prácticamente en todos los hospitales españoles hay Servicio/Sección/Unidad de EI. Por otra parte, es también a principios de los años 80, cuando la MC y las EI convergen, lo que se pone de manifiesto con la creación, en 1982, de una nueva Sociedad científica, que abarca estas dos especialidades (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)). A partir de esta fecha, aunque hemos ido andando por caminos paralelos, la convergencia no ha sido muy estrecha, hasta muy recientemente, que con la nueva estrategia de gestión por Unidades de Gestión Clínica (UGC) multidisciplinares, dentro del Servicio Andaluz de Salud (SAS), se hizo efectiva la fusión de las Unidades Clínicas de Microbiología con la Unidades Clínicas de Enfermedades Infecciosas. La asociación funcional de estas dos áreas del conocimiento ha proporcionado un conjunto de beneficios de carácter sinérgico: mejora global de los circuitos diagnósticos, potenciación bidireccional de los conocimientos, incremento de la efectividad y eficiencia en la respuesta a problemas clínicos asistenciales complejos, consolidación del área de microbiología con la clínica de las enfermedades infecciosas en toda su amplitud, mejora en el aprovechamiento de los recursos y potenciación de la capacidad de gestión. En la actualidad en Andalucía este modelo tiene su apoyo por parte del SAS, y existen UGC de este tipo en muchos hospitales. En este binomio MC-EI, la MC aporta todos sus conocimientos y avances tecnológicos para aplicarlos a la clínica y las EI aproximan más estos conocimientos al paciente que sufre un proceso infeccioso. En los últimos años, la MC ha experimentado un cambio considerable con la introducción de nuevas tecnologías de alto nivel, que nos han permitido una gran optimización en el manejo de todo tipo de infecciones en cuanto al diagnóstico, tratamiento y estudios epidemiológicos, facilitando la identificación a nivel de especie de una forma más rápida, identificando microorganismos emergentes, detectando resistencias a distintos antimicrobianos y colaborando en la



prevención de la transmisión de las EI. Los avances más importantes están relacionados con la introducción de la biología molecular (PCR y secuenciación), la espectrometría de masas (MALDI-TOF) y la automatización. Estas nuevas circunstancias en el laboratorio de MC han permitido :1) Diagnosticar distintos síndromes a partir de una única muestra ;2) Optimizar el procesamiento de estas muestras : a) mediante el uso de nuevos medios de cultivo que permiten el crecimiento de microorganismos fastidiosos, no cultivables y/o nuevos; b) utilizando nuevos métodos de identificación y de estudios de resistencia (fenotípicos, por espectrometría de masas y por técnicas moleculares); 3) Implicarnos directamente en los estudios epidemiológicos. De todas estas nuevas tecnologías parece que la que tiene más aplicación futura es la secuenciación genómica. Todo lo anteriormente expuesto, unido a una mejora en el flujo de trabajo y en la emisión de los informes, favorecerá el diagnóstico y la instauración del tratamiento de una forma precoz, con el consecuente beneficio en el manejo del paciente. Como conclusión, podemos decir que los laboratorios de Microbiología Clínica tienen que modernizarse e intentar incluir en su rutina estas nuevas tecnologías.



Experiencia de una UGC mixta de Enfermedades Infecciosas y Microbiología

María Dolores López Prieto

UGC Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Hospital de Jerez (Cádiz)

La aparición de la Gestión Clínica como herramienta de organización de los servicios de nuestro Sistema Sanitario, ha dado la oportunidad a las Unidades de Microbiología de establecer uniones funcionales con otras que por diversas razones comparten estructuras, funcionalidad u objetivos integrales. Los modelos han sido diversos y van desde la continuidad de su integración en los Servicios de Análisis Clínicos, a la creación de UGC que engloban diversas áreas diagnósticas o bien a su fusión con las Unidades de Enfermedades Infecciosas que en algún caso se ha completado con la integración de Medicina Preventiva. La decisión de una u otra opción ha correspondido en gran parte a los profesionales según su propia visión del modelo, pero sin duda también ha sido impuesta en ocasiones por el equipo directivo del Centro, en base a sus propios intereses organizativos.

La experiencia de nuestra UGC tras casi cuatro años de andadura creo que se puede considerar favorable. Nació con escaso entusiasmo por parte de los profesionales de ambas disciplinas, quizás debido a los “miedos” propios a lo que no era habitual y a la posible suplantación de competencias y con una idea de estricta independencia funcional. Con el paso del tiempo, los miedos se han ido disipando y hemos ido tratando de integrar nuestras actividades en el área asistencial y de forma tímida en la docencia y la investigación. Los clínicos han aportado la visión real de las infecciones en la práctica asistencial diaria, que a veces perdemos inmersos en la tecnología diagnóstica y los microbiólogos hemos tratado de transmitir que nuestro trabajo puede y debe aportar un impacto favorable en los resultados en salud de sus pacientes. En este contexto hemos revisado conjuntamente protocolos diagnósticos y terapéuticos, hemos contribuido a la elaboración y difusión de guías y vías clínicas, establecido acuerdos de colaboración con otras Unidades y en resumen creo que hemos aumentado nuestra presencia al menos en el Hospital. El trabajo conjunto nos ha servido también en algunas ocasiones para optimizar protocolos que nos han permitido mayor eficiencia y un control presupuestario imprescindible en el momento actual.

Pero a pesar de todo creo que resta, según mi opinión, lo más difícil por hacer: demostrar y convencer a nuestra Organización que este modelo aporta un valor añadido sobre el resto de alternativas. No consiste en negar la evidencia de que trabajamos en el entorno de un conjunto de unidades diagnósticas con las que compartimos objetivos y recursos, es más, creo que esta faceta hay que optimizarla, pero debemos defender que nuestra área de conocimiento y los objetivos de nuestra misión se desarrollarán mejor con este tipo de alianzas. En un momento en que el futuro decreto de Troncalidad amenaza con mermar el desarrollo de ambas especialidades, microbiólogos e infectólogos debemos presentar un proyecto que claramente supere al que podamos aportar de forma independiente y centrado en actividades que de forma sinérgica supongan una mejora en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones



Experiencia en el uso de las nuevas plataformas de diagnóstico molecular multiplex en el laboratorio de Microbiología

Manuel Causse del Río

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba)

La reacción en cadena de la polimerasa se ha ido incorporando paulatinamente a las rutinas de nuestros laboratorios de Microbiología Clínica. Desde aquellas PCRs empleadas en el diagnóstico viral hasta las modernas PCRs a tiempo real de nuestros días no ha pasado tanto tiempo. Y es que la aplicación de estas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos ha dado un vuelco a la Microbiología.

Uno de los avances de estas técnicas fue la rt-PCR multiplex, permitiendo detectar varias dianas en un mismo tubo de reacción con un seguimiento tras el término de cada ciclo. Estas PCR pueden parecer fáciles de emplear pero requieren de unos estudios previos para su correcto funcionamiento debido a las múltiples variables que pueden interferir, entre las que destacan el diseño de cebadores, programas de amplificación, concentración de magnesio y tipo y cantidad de ADN polimerasa.

Estas PCR se están empleando de forma rutinaria en muchos de nuestros laboratorios y permite la detección ya sea desde la colonia de cultivo, o directamente desde la propia muestra de microorganismos, así como genes que implican resistencias a fármacos, etc. Por citar algunos ejemplos tendríamos PCR multiplex de VHS1, 2 y VVZ; PCR de meningitis bacterianas que detectan *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Listeria*; PCR para la detección de gripe A, B y subtipo A H1N12009 etc....

La mayoría de los soportes de estas PCR (Ligtcyclers, Stratagene...) permiten la detección simultánea de 2-3 microorganismos y el control de reacción (o Control Interno) en un solo run. Uno de los inconvenientes es que hay que esperar a que termine para montar otra técnica. En laboratorios de microbiología molecular donde hay que dar un resultados rápido, ya sea por la propia patología o la gravedad de la situación del paciente, no podemos permitirnos la espera entre run y run. Esto hoy en día podemos solucionarlo de varias maneras:

1.-Poner varias maquinas.

2.-Utilizar en una misma maquina varios termocicladores individuales: esto es lo que permite el GeneXpert y más aún el Smartcyclers, de manera que se pueden realizar diferentes reacciones independientes en cada termociclador: PCR Meningitis bacterianas+ PCR *Ps. aeruginosa/A. baumannii*.

3.-Utilizar rt-PCR de última generación: Son técnicas que permiten un "multiplexing" mucho más avanzado y extenso, en las que se trata de realizar en una sola reacción (o dividida en dos tubos pero con el mismo protocolo) un test que permita detectar todos, o la mayoría, de los microorganismos implicados en un síndrome clínico. Esto lo podemos realizar en dos formas:

a) Realizamos una PCR multiplex y al final separamos tanto como sea necesario los sitios de donde se realiza la detección de manera que cada uno corresponda a un microorganismo. Esta es la tecnología empleada por los MicroArrays y de última generación el FilmArray: Detección de 16 virus respiratorios y 3



bacterias implicadas en la neumonía adquirida de la comunidad o detección desde la botella de hemocultivo positiva de los microorganismos implicados más frecuentemente en la sepsis y mecanismos de resistencia

b) Realizamos PCR multiplex pero ampliamos la detección a dos o tres microorganismos por fluoróforo. Esto se consigue mediante la diferente temperatura de melting que tienen cada uno de los amplicones generados en cada fluoróforo y que corresponden a un microorganismo. Esta tecnología permite por ejemplo detectar 7 microorganismos implicados en las ETS en una sola reacción

Estas PCR multiplex de última generación permite detectar varios microorganismos en una sola reacción tienen unas grandes ventajas:

-gran sensibilidad y especificidad

-Se reduce la cantidad de muestra requerida. Importante en casos de LCR o Sangre en la que o tenemos suficiente volumen para realizar todas las pruebas

-Se reducen los falsos negativos al existir siempre un control de amplificación en cada muestra

-Se mejora el flujo de trabajo y se consumen menos reactivos

-Se minimiza la manipulación de las muestras y con ello las posibilidades de contaminación

pero también tienen inconvenientes:

-Las PCR multiplex no son baratas debido a la moderna tecnología empleada y a la dificultad a la hora de ponerlas a punto

-Necesita personal especializado

-Detectan ADN de microorganismos no viables o tienen dificultad para distinguir colonización/infección

-Exceso de peticiones ante la disponibilidad de la técnica, que se pueden acompañar de mal uso o llevar a la relajación en la petición de otras pruebas complementarias

Las PCR multiplex a pesar de su coste son muy eficaces en el laboratorio moderno de microbiología, ahorrando tiempo y costes al final ya que un diagnóstico positivo rápido (y lo tendremos más rápido cuantas menos test tengamos que realizar) es claramente beneficioso para el paciente y para el sistema sanitario que ahorra, aunque esto sea difícil de explicar a la administración y pueda tener reticencia a que se introduzca esta técnicas.



Nuevas Técnicas de Secuenciación de Ácidos Nucleicos: Aplicaciones en Microbiología Clínica

Federico García y Natalia Chueca

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio, Granada.

Durante la última década se han producido importantes avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos. Estos avances, además del desarrollo tecnológico, han supuesto una dramática reducción en el precio de secuenciación por base, lo que ha resultado en la generalización de su uso en muchas áreas de investigación. Una de estas áreas son las enfermedades infecciosas, lo que esta posibilitando su introducción en los laboratorios de microbiología clínica. Las principales técnicas de nueva generación de secuenciación de ácidos nucleicos (NGS-Next Generation Sequencing) se diferencian, entre otros, en función del método usado en la amplificación, el principio químico en el que se basan, la longitud de los fragmentos y la cantidad de kilobases que se pueden generar, y la tasa y el tipo de error que generan. Las plataformas más introducidas en el momento actual son 454/Roche (FLX y Junior), Illumina (HiSeq y MiSeq), Solid e Ion Torrent. De todas ellas la de mayor aceptación, uso y disponibilidad para los laboratorios de Microbiología Clínica es la Secuenciación 454. Para esta tecnología se ha diseñado un dispositivo específico de sobremesa, 454-GS Junior, que, con una capacidad de generar hasta 80.000-100.000 secuencias en ambas direcciones; 5' y 3' (librerías A de amplicones), o hasta 160.000 secuencias empleando una sola dirección (librerías L) por run. La principal aplicación con un desarrollo avanzado en Microbiología Clínica es el GS-Junior HIV Next Generation Sequencing Kit (Roche Diagnostics), que permite demostrar mutaciones de resistencia presentes hasta en el 1%, y que ha demostrado ser mejor predictor de fracaso virológico que la secuenciación poblacional. Actualmente se están implementando protocolos para estudiar el microbioma, que puede ser de gran utilidad en microbiología clínica. Otras áreas de inminente desarrollo serán el desarrollo de protocolos para la investigación del resistoma, y los posibles usos de esta tecnología para inferir relaciones epidemiológicas entre microorganismos.



Identificación directa de bacterias desde hemocultivos positivos mediante espectrometría de masas (aspectos técnicos y clínicos)

José A. Lepe

Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva.
Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla..

La espectrometría de masas, MALDI-TOF (matriz assisted laser desorption ionization time-of-flight) aplicada a la identificación de microorganismos está basada en la comparación entre el espectro de masas de proteico de un aislado con una base de datos de referencia. El proceso implica un proceso de co-cristalización de la muestra con una matriz. La mezcla de la muestra con la matriz se irradia con fotones mediante un láser cuya longitud de onda está en la banda de absorción de la matriz. Esta radiación provoca la ionización en fase gaseosa de las moléculas de la muestra y de la matriz, entonces los iones son acelerados en un tubo de vacío donde se separan en función su relación masa/carga la cual es registrada por un detector. El espectro de masas de los péptidos identificados es único para cada especie bacteriana o fúngica.

Una ventaja importante de esta metodología es que proporciona una identificación precisa del microorganismo a nivel de especie (y en algunos casos de subespecie), mediante un proceso de análisis muy rápido y con un tiempo de trabajo muy reducido en comparación con los métodos convencionales.

La capacidad del MALDI-TOF de trabajar sobre células bacterianas intactas ha permitido su empleo en la identificación directa de bacterias y levaduras a partir de botellas de hemocultivos positivas. La identificación basada en la espectrometría de masas posee un alto potencial cuando se utiliza sobre hemocultivos positivos ya que disminuye de forma importante los tiempos de respuesta de la prueba, permitiendo el manejo adecuado de los pacientes dentro del periodo conocido como ventana terapéutica. Ofreciendo la posibilidad de implementar un tratamiento antimicrobiano dirigido en vez de empírico en los pacientes con infección grave.

El proceso a partir de botellas de hemocultivos, básicamente no difiere mucho de la identificación a partir de colonias, excepto que las bacterias o levaduras deben de ser separadas de las sustancias presentes en el caldo de cultivo (generalmente productos del metabolismo bacteriano) o de la sangre, especialmente hemoglobina que produce una fuerte señal y enmascara los picos de proteínas de los microorganismos. Además de estos requerimientos, es necesario concentrar los microorganismos presentes en la muestra, ya que la capacidad de identificación del MALDI-TOF depende de la concentración en el inóculo. En general, la identificación mediante MALDI-TOF trabaja adecuadamente en concentraciones de microorganismos que oscilan entre 10^6 UFC/mL y 10^8 UFC/mL aunque en aquellos microorganismos con baja calidad espectral como son los estreptococos el inóculo es aún más crítico.

Existen diferentes protocolos para preparar las muestras procedentes de hemocultivos antes de su estudio y una comparación entre ellos es muchas veces difícil, aunque los protocolos que utilizan un proceso de extracción parecen mas exactos que los que trabajan sobre muestra directa, pero es difícil aclarar si estas diferencias son debidas a los distintos protocolos empleados en la preparación de la muestra o a los procesos de post-análisis empleados. En general, la fiabilidad de las identificaciones realizadas ha sido demostrada por varios trabajos y aunque a veces es necesario un reajuste de los scores de identificación, estos cambios aseguran una buena concordancia con respecto a la metodología MALDI-TOF convencional.

En conclusión, los buenos resultados publicados, unidos a la rapidez y al bajo coste de la espectrometría de



masas, hacen de ella un sistema apropiado y fácil de implantar en los laboratorios de microbiología clínica para la identificación directa de microorganismos a partir de botellas de hemocultivos.



APLICACIÓN DE MALDI-TOF MS EN LA DETECCIÓN DE RESISTENCIAS BACTERIANAS Y ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS

María Dolores Rojo Martín y Consuelo Miranda Casas

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada

La rápida detección de las resistencias bacterianas es fundamental debido a la aparición cada vez más frecuente de microorganismos multirresistentes, sobre todo en infecciones hospitalarias y en forma de brotes. Las técnicas utilizadas en la mayoría de los laboratorios de Microbiología (método Kirby-Bauer de difusión de discos, E-test, microdilución y sistemas automatizados) necesitan 18-24 h. Los métodos genotípicos pueden acortar este tiempo, pero suelen ser más complejos. Para el control de estas infecciones, es importante el tipado epidemiológico de las cepas, siendo necesaria una metodología, que por su laboriosidad y coste, se realiza normalmente en laboratorios de referencia.

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) puede ser una opción para afrontar estas necesidades.

Su aplicación para detectar beta-lactamasas, y en especial carbapenemasas en Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* se basa en que los antibióticos beta-lactámicos tras la hidrólisis por beta-lactamasas dan lugar a productos de distinta masa. En los espectros (o huella proteica) de la molécula original aparecen los picos correspondientes al beta-lactámico y sus sales, mientras que en los espectros obtenidos tras incubar una suspensión bacteriana con el antibiótico (1-3 h), en caso de hidrólisis, se observarán los picos de los productos de degradación o bien, la desaparición de los picos del beta-lactámico. Si en la mezcla de reacción se incluyen inhibidores específicos, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), oxacilina o ácido fenilborónico, se recuperará en el espectro el pico correspondiente al beta-lactámico, pudiéndose determinar el tipo de enzima presente (metalo- β -lactamasas, AmpC y KPC, respectivamente). Los resultados obtenidos hasta el momento, demuestran que MALDI-TOF MS es una técnica rápida y fiable para detectar cepas productoras de estas enzimas; no obstante, es necesario disponer de un software adecuado y adquirir habilidades para la interpretación de los espectros y, por el momento, ya que la mayoría de los protocolos están en fase de validación, los resultados se deben valorar conjuntamente con los de las técnicas fenotípicas y moleculares disponibles.

Mayor controversia existe en cuanto a su utilidad para diferenciar *Staphylococcus aureus* meticilin resistente (SAMR) de *S. aureus* meticilin sensible (SAMS). Se pueden obtener espectros estables y con picos específicos para SAMR y SAMS; incluso se han detectado biomarcadores específicos que podrían diferenciar SAMR hospitalario del adquirido en la comunidad, o detectar hVISA y VISA. Con la misma metodología se ha identificado *Enterococcus faecium* portador del gen vanB, *Klebsiella pneumoniae* con pérdida de porina OMPK36, responsable de resistencia a carbapenemes, *Bacteroides fragilis* portador del gen *cfrA* que codifica una metalo-betalactamasa y *Candida spp* y *Aspergillus spp* con mutaciones en el gen *fks* que confieren susceptibilidad reducida a las equinocandinas.

Otras aplicaciones se van abriendo paso, como la utilización de MALDI-TOF MS sobre fragmentos genómicos y sobre amplificadores para identificar mutaciones asociadas a resistencia o el método MS-RESIST, que utiliza medios de cultivo marcados con isótopos estables y se basa en que en presencia de antibióticos solo los microorganismos resistentes son capaces de crecer e incorporar los aminoácidos marcados del medio, lo que



incrementa la masa de las proteínas sintetizadas, produciéndose un cambio en el espectro con respecto a los microorganismos sensibles.

La aplicación de MALDI-TOF MS en estudios epidemiológicos se fundamenta en su capacidad para discriminar entre cepas estrechamente relacionadas. En el perfil proteico o espectro, además de los picos característicos de género o de especie, existen otros picos más variables dentro de la especie, cuya similitud podría ser paralela a la proximidad genética de los microorganismos, lo que permitiría establecer su relación clonal con resultados equiparables a los obtenidos con otras técnicas (REP-PCR, PFGE, etc.), pero de manera más rápida y económica. En la práctica, es necesario crear una base de datos con los espectros de las cepas a estudiar y posteriormente analizar su similitud con los algoritmos proporcionados por las distintas plataformas comerciales. Así se han caracterizado brotes por SAMR, *E. faecium*, *A. baumannii* y *C. parapsilosis*.

En resumen, la tecnología MALDI-TOF MS es una herramienta prometedora para los laboratorios clínicos de Microbiología, no solo para la identificación de microorganismos, sino para aportar de manera rápida y fiable información sobre su perfil de resistencias y características epidemiológicas, lo cual afianza el papel de la Microbiología en el campo del diagnóstico y control de la infección. No obstante, es necesario desarrollar protocolos de trabajo validados que permitan incluir esta tecnología en el flujo de trabajo de nuestros laboratorios.



COMUNICACIONES ORALES



001. Prevalencia de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* en muestras uretrales y endocervicales remitidas al H. U. Virgen Macarena (2007 – 2012)

J Machuca*, MI López-Hernández, F Fernández-Cuenca, AI Suárez, A Pascual

H. U. Virgen Macarena. UGC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Sevilla

Objetivo: Las infecciones de transmisión sexual (ITS) suponen un importante problema de salud pública a nivel mundial. *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* constituyen la primera y segunda causa bacteriana de ITS, respectivamente. El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* en nuestra área sanitaria.

Métodos: Se analizaron todas las muestras de exudado uretral y exudado endocervical remitidas al laboratorio de Microbiología del H. U. V. Macarena entre el periodo de 2007 a 2012.

Para el diagnóstico de gonococia las muestras se sembraron en medio agar chocolate GC. El diagnóstico de infección por *C. trachomatis* se llevó a cabo mediante cultivo en células McCoy (hasta agosto de 2008) o PCR (desde septiembre de 2008).

Resultados: Se procesaron 1721 muestras, 962 muestras de pacientes varones (55,9%) y 759 de mujeres (44,1%), realizándose un total de 1924 determinaciones (73,3% para diagnóstico de gonococo y 26,7% para *C. trachomatis*).

En el 7,6% de las muestras (n=135) se aisló alguno de los dos patógenos: en 76 muestras (4,3%) se aisló *N. gonorrhoeae*, en 57 (3,2%) se detectó *C. trachomatis* y en 2 (0,1%) se encontraron los dos patógenos.

En los varones hubo 72 muestras (7,5%) en las que se aisló gonococo y 19 (2%) en las que se halló *C. trachomatis*. Por otro lado, en mujeres el patógeno más frecuente fue *C. trachomatis* (37 muestras, 4,9%), aislándose *N. gonorrhoeae* sólo en 4 muestras (0,5%).

Con respecto al origen de las muestras, el 53,4% procedían de Atención Primaria, el 35,8% eran hospitalarias y el 10,8% de consultas de Centros de Especialidades. En el caso de los hombres el 76,69% de las muestras procedía de Atención Primaria, mientras que para las mujeres la mayoría de las muestras fueron tomadas en el hospital (65,7%).

Conclusiones:

En la población atendida por nuestro hospital la prevalencia de infecciones por *N. gonorrhoeae* es del 4,4% y en el caso de *C. trachomatis* es del 3,3%.

En las muestras de exudados uretrales el patógeno aislado con mayor frecuencia fue *N. gonorrhoeae* y las muestras procedían en su mayoría de atención primaria.

En las muestras endocervicales se diagnosticó principalmente *C. trachomatis* y procedían fundamentalmente de hospital.

**002. Estudio de la sensibilidad antibiótica en el grupo *Bacteroides fragilis*.**

Redero*MM., Artacho MJ., Gómez MJ., Lepe JA., Aznar J. Servicio de Microbiología-UCEIMP. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Objetivo. Estudiar la sensibilidad antibiótica y la evolución de la CMI de las distintas especies del grupo *Bacteroides fragilis* durante el período de enero del 2011 a agosto del 2013.

Materiales y métodos. El estudio incluyó 337 cepas del grupo *Bacteroides fragilis*. Estas cepas se aislaron en agar sangre KV; se identificaron mediante paneles para anaerobios de Microscan[®] y/o espectrometría de masas (MALDI-TOF) y se estudió la sensibilidad antibiótica mediante los métodos disco-placa y E-Test[®] e interpretados según criterios CLSI. Los datos se registraron y analizaron mediante programa OMNIUM[®] y el estudio estadístico se realizó con el programa SPSS[®]

Resultados. Durante el período de enero de 2011 hasta agosto de 2013 se aislaron 337 cepas del grupo *Bacteroides fragilis*, de las cuales se identificaron 173 *B. fragilis*, 76 *B. tethaiotaomicrom*, 42 *B. ovatus*, 22 *B. vulgatus*, 17 *B. uniformis*, 5 *B. caccae*, y 2 *B. estercoris*. El estudio de sensibilidades de estas cepas a Amoxicilina/Ac. clavulánico, Imipenem, Metronidazol, Moxifloxacino y Piperacilina/Tazobactam recogió los siguientes datos:

	CEPAS SENSIBLES					
	Grupo <i>B. fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. tethaiotaomicrom</i>	<i>B. uniformis</i>	<i>B. vulgatus</i>
Amoxicilina/clavulánico	48%	52%	33%	42%	47%	41%
Imipenem	91%	86%	90%	88%	100%	97%
Metronidazol	97%	98%	95%	100%	100%	95%
Moxifloxacino	56%	59%	38%	54%	59%	31%
Piperacilina/tazobactam	62%	76%	66%	26%	53%	46%

Las cepas del grupo *B. fragilis* presentaron las siguientes CMI-50, y CMI-90:

	2011			2012			2013		
	n	CMI ₅₀	CMI ₉₀	n	CMI ₅₀	CMI ₉₀	n	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Amoxicilina/clavulánico	84	4	256	107	6	256	86	8	256
Imipenem	77	0,38	16	98	0,38	1,5	82	0,12	0,5
Metronidazol	83	0,38	1	112	0,38	1	89	0,38	0,75
Moxifloxacino	82	3	32	111	2	32	89	2	32
Piperacilina/tazobactam	*	*	*	101	4	256	82	4	256

* No se disponen de datos de CMI de Piperacilina/ tazobactam en el 2011.

Conclusiones. Observamos diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en la sensibilidad de *B. ovatus* a amoxicilina/clavulánico y moxifloxacino; y de *B. tethaiotaomicrom* a piperacilina/tazobactam, con respecto al resto de especies del grupo *Bacteroides fragilis*. No hay cambios estadísticamente significativos de CMI₅₀ y CMI₉₀ a lo largo del período estudiado, excepto para el imipenem que muestra un marcado descenso de sus valores de CMI. En general, amoxicilina/ clavulánico y piperacilina/ tazobactam no parecen adecuados en el tratamiento empírico de las infecciones donde el grupo *B. fragilis* sea una etiología común.



O03. Evolución de la sensibilidad a daptomicina en *Enterococcus faecium* en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada

M. D. Rojo Martín, E. Moronta Cuadros*, Y. Hoyos Mallecot, C. Miranda Casas, A. Rodríguez García, P. Polo Moyano, J. M. Navarro Marí.

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

La daptomicina (DAP) es un antibiótico eficaz para tratar infecciones graves por gram positivos resistentes a otros antibióticos. En *Enterococcus faecium*, frecuentemente multirresistente y aislado en infecciones graves sobre todo de origen gastrointestinal, se están detectando cepas no susceptibles a DAP o con valores de CMI en el límite alto de la susceptibilidad, que pueden albergar mutaciones en uno o más genes del sistema *liaFSR* que preceden el desarrollo de resistencia a DAP.

Objetivos

- Estudiar la evolución de la sensibilidad y CMI para DAP en *E. faecium* en el Hospital Virgen de las Nieves durante 4 años (2010-2013).
- Estudiar cepas con CMI= 4 µg/mL mediante Etest en medio Brain Heart Infusion Agar (BHIA), que puede ser útil para identificar cepas con mutaciones en el sistema *liaFSR*.

Métodos. La identificación y estudio de susceptibilidad se realizaron con los sistemas WIDER (Soria Melguizo) y MicroScan (Siemens). Se estudiaron 20 cepas cuya CMI en sistema automatizado fue 4 µg/mL, realizando Etest (MIC Test Strip, Liofilchem®) en Mueller Hinton agar (MHA) y en BHIA. Según un estudio reciente, se puede correlacionar una CMI ≥ 16 µg/mL en BHIA con mutaciones en el sistema *liaFSR*, aunque podría haber cepas con CMI= 12 µg/mL con esta mutación.

Resultados. El nº de aislamientos de *E. faecium* ha ido aumentando durante el periodo estudiado: 99 (2010), 105 (2011), 137 (2012) y 103 (hasta septiembre de 2013), igualmente lo ha hecho el porcentaje de cepas no susceptibles a DAP, 6,6% en 2010, 10,5% en 2011, 7,5% en 2012 y 14,4% en 2013, así como el porcentaje de cepas con CMI= 4 µg/mL, 62,3% en 2010, 71,1% en 2011, 78,4% en 2012 y 75% en 2013.

En las 20 cepas estudiadas con CMI= 4µg/mL, solo un paciente había tenido tratamiento previo con DAP. Las CMIs obtenidas mediante Etest en MHA fueron 3µg/mL en 12 cepas (60%) y 4µg/mL en las 8 restantes (40%), con una concordancia con el sistema automatizado del 100%. Las CMIs obtenidas mediante Etest en BHA fueron 8µg/mL en 10 (50%) y 12 en las otras 10 (50%).

Conclusiones

- Se ha producido un incremento en el aislamiento de *E. faecium* con sensibilidad disminuida a DAP.
- Actualmente el 75% de las cepas tienen CMI en el límite alto de la susceptibilidad.
- Sería conveniente vigilar estas cepas, ya que podrían tener mutaciones en el sistema *liaFSR*, para lo que sería necesario completar el estudio a nivel molecular.
- Puede que en un futuro cercano sea conveniente revisar el punto de corte de DAP para *E. faecium*.



O04. Incidencia de Micobacterias atípicas aisladas en nuestro Centro

P. Ruiz Martínez*; J.B. Gutierrez Aroca; M. Causse ; M. Casal

Centro de referencia de Micobacterias. Facultad de Medicina. Hospital Universitario "Reina Sofía. Córdoba

Objetivo:

Dada la importancia que pueden tener diferentes especies de Micobacterias atípicas como causa de infección, presentamos las Micobacterias atípicas identificadas en nuestro Centro desde el año 2001 -2012. También se muestran las mezclas de Micobacterias aisladas en ese mismo período de tiempo.

Material y Metodo

Durante estos años , se han recibido 1759 cultivos para su identificación. Todos ellos fueron procesados a partir de los medios de cultivo de rutina sólidos ó líquidos. Las técnicas para su identificación empleadas a lo largo de estos años han sido procedimientos bioquímicos, genéticos (Sondas y Genotype CM/AS) y/o HPLC . El desarrollo de las técnicas genéticas ha permitido una identificación más rápida y fácil sobretodo para aquellas micobacterias de crecimiento lento e insidioso. Además, Genotype CM/AS, permite detectar la mezcla de Micobacterias.

Resultados:

De los 1759 cultivos procesados, 425 correspondieron a especies de Micobacterias atípicas . (23 especies diferentes) y en 7 cultivos , se detectaron mezclas de Micobacterias. La especie más frecuentemente identificada fué , *M. fortuitum* (74), *M. avium* (66), *M. chelonae* (58), *M. intracellulare* (46), *M. gordonae* (45), *M. kansasii* (30), *M. peregrinum* (20), *M. abscessus* (16), *M. marinum* (13), , *M. lentiflavum* (10), *M. szulgai* (5), *M. xenopi* (5), *M. scrofulaceum* (5), *M. smegmatis* (5), *M. mucogenicum* (5), , *M. malmoense* (4), *M. simiae* (3), *M. celatum* (3), *M. smegmatis* (2), *M. gastris* (2), *M. shimoidei* (2), *M. flavescens* (1), *M. diehrnoferii* (1).

En cuanto a las mezclas de Micobacterias: *Mycobacterium tuberculosis* + *Mycobacterium kansasii* (1); *Mycobacterium tuberculosis* + *Mycobacterium avium* (1); *Mycobacterium tuberculosis* + *Mycobacterium intracellulare* (2); *Mycobacterium tuberculosis* + *Mycobacterium lentiflavum* (1); *Mycobacterium chelonae* + *Mycobacterium peregrinum* (1); *Mycobacterium chelonae* + *Mycobacterium intracellulare* (1) .

Conclusion:

Los aislamientos de Micobacterias atípicas como responsables de cuadros clínicos y la utilización de técnicas genéticas, como es el Genotype (CM/AS), permite identificar de forma rápida y sencilla un gran número de Micobacterias atípicas de interés, así como el detectar la presencia de más de una micobacteria en un cultivo.



O05. Balance de dos años en el diagnóstico directo de tuberculosis en muestras con baciloscopias negativas

C. Freyre*, K. Rodiere, C. Martínez, S. Pérez.

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Puerto Real, Cádiz.

OBJETIVOS:

Analizar la utilidad de la introducción en la rutina diagnóstica del Laboratorio de Microbiología, de una técnica de PCR a tiempo real para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, MTB, en muestra directa y de posibles hallazgos de cepas multirresistentes.

MATERIAL Y MÉTODO:

Durante el año 2012 y hasta Septiembre de 2013, se han realizado PCR a tiempo real (XpertMTB/Rif, Cepheid) a todas aquellas muestras baciloscopias (BK) negativas, solicitadas tras sospecha clínica o en aquellas que presentaron celularidad en la tinción de Gram y cultivo convencional negativo. Los resultados fueron analizados comparando los resultados de la BK (auramina) y cultivos en medio líquido MGIT (Bactec MGIT 960) y sólido, Lowestein Jensen. Las pruebas de sensibilidad a las cuatro drogas de primera línea se realizaron en medio líquido y la sensibilidad a Rifampicina, además, por la técnica molecular, en las muestras donde se realizó PCR.

RESULTADOS:

Durante el periodo de estudio se detectaron 28 casos de TBC, de los cuales, 11 fueron BK negativa. La PCR se realizó en un total de 178 muestras, resultando positiva en 7 casos (no pudiéndose realizar en 4 de los casos con BK negativas). Todas presentaron el cultivo de micobacterias positivo. En cuanto al tipo de muestra, 4 fueron muestras respiratorias (4 esputos) y 3 extrapulmonares (1 LCR, 1 heces y 1 jugo gástrico). De los 7 pacientes, 5 fueron pacientes con ingreso reciente en el Hospital y alta sospecha de TBC, y 2 fueron familiares de los mismos. Todas las muestras presentaron sensibilidad a Rifampicina, tanto por la técnica de PCR como por antibiograma convencional.

CONCLUSIONES

La técnica de PCR a tiempo real en muestra directa XpertMTB/Rif nos ha permitido reducir el tiempo de diagnóstico de esta enfermedad a tres horas en el 25% de los pacientes con BK negativa.

En estos casos, además, se puede orientar al clínico de la sensibilidad de la cepa en el mismo momento del diagnóstico.



O06. Evolución de la resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* (1998-2012)

J. Saavedra, A. Domínguez*, A. Márquez, J. Fernández, A. de la Iglesia, F. Franco⁽¹⁾, J. Pérez, A. Tenorio, M. de la Iglesia.

UGC Microbiología. Complejo Hospitalario de Huelva. (1)Hospital de Riotinto

Objetivo:

Estudiar la evolución de la resistencia a isoniácida (RI) y la multiresistencia (MR) en el periodo comprendido entre 1998 (Mayo) y 2012 (Septiembre), en global, y en los grupos de inmigrantes, infectados por el VIH y población autóctona.

Métodos:

Se han estudiado las muestras procedentes del Área Hospitalaria Juan Ramón Jiménez de Huelva entre Mayo de 1998 y Septiembre de 2012. A partir de Abril de 2009 se incorporan muestras del Hospital de Riotinto y desde Junio de 2010 del Hospital Infanta Elena. El procesamiento se realizó utilizando medios líquidos (MGIT o BACTEC, Becton-Dickinson) y sólidos (Lowestein-Jensen). El estudio de resistencias se realizó con el método SIRE (Becton-Dickinson), utilizando medios líquidos (MGIT) y fármacos de primera línea.

Las cepas con alguna resistencia se enviaron para confirmación al Hospital Reina Sofía de Córdoba.

Resultados:

En el periodo 1998-2012 (785 cepas) se han detectado 25 con RI (3.18%) y 12 con MR (1.52%), ambas con tendencia ascendente (1998-2002: RI 1.32%, MR 0.44%; 2003-2007: RI 3.62%, MR 1.08%; 2008-2012: RI 4.25%, MR 2.83%). La suma de pacientes inmigrantes más infectados por el VIH supusieron respecto a la RI sólo una cuarta parte (6/25), mientras que respecto a la MR supusieron tres cuartas partes (9/12).

En el periodo 2001-2012 la RI y MR ha sido en inmigrantes (131): 3.05% y 4.58%; en infectados por el VIH (102): 3.92% y 1.96%; en población autóctona (415): 4.1% y 0.72%; en el total de la población (648): 3.8% y 1.7%.

En cuanto a la evolución, se observa en la población autóctona un aumento de la RI y MR (2001-2004: 3.12% y 0%; 2005-2008: 3.65% y 0%; 2009-2012: 5.33% y 2%). También en el grupo de inmigrantes se objetiva un incremento de la RI (2001-2004: 0%; 2005-2008: 2.63%; 2009-2012: 4.22%).

Conclusiones:

- La resistencia a isoniácida ha aumentado en nuestro medio suponiendo actualmente el 7.1% (RI: 4.25% más MR: 2.83%). Este incremento se ha observado tanto en la resistencia aislada como en la multiresistencia.
- En la población inmigrante tenemos los porcentajes más bajos de RI (3.05%) y los más altos de MR (4.58%). En la población autóctona, por el contrario, los más altos de RI (4.1%) y los más bajos de MR (0.72%). En la población de infectados por el VIH la RI (3.92%) es muy similar a la población autóctona, pero la MR (1.96%) es significativamente más alta.
- Durante los últimos doce años se evidencia un incremento en la población autóctona de la RI y la MR. Asimismo, en la población inmigrante se objetiva un aumento de la RI.



007. Descripción de un brote por *Coxiella burnetti* en el área sanitaria norte de Sevilla

M. Delgado-Valverde*, E. Ramírez de Arellano, J. Jiménez-Gallardo, MA. Muniain, A. Pascual

UGC Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla

Objetivos:

Descripción de un brote de Fiebre Q en una localidad del área sanitaria norte de Sevilla.

Métodos:

En Marzo de 2013 se detectó un aumento en la incidencia de Fiebre Q en una localidad de nuestra área sanitaria. Las autoridades sanitarias declararon una situación de brote y se estableció un radio de 20 Km. alrededor de la localidad para detectar los posibles casos en localidades adyacentes. La definición de caso fue: paciente con síndrome febril de duración intermedia sin foco y una determinación de anticuerpos IgM frente a *C. burnetti* positivo o indeterminado y/o la seroconversión del título de anticuerpos IgG en muestras de suero separadas 15 días. La detección de anticuerpos IgM frente a *C. burnetti* se realizó mediante ELISA (Vircell. Alere), la determinación del título de IgG se realizó por técnica de Inmunofluorescencia (Focus Diagnostics. Vitro). Se analizó la incidencia global en la localidad donde se estableció el foco y por grupos de edad. Los datos demográficos se recogieron del censo de población 2011 del Instituto Nacional de Estadística.

Resultados:

Entre marzo y septiembre de 2013 se detectaron 53 casos en Villaverde del Río (38), Brenes (7), Cantillana (6) y Burguillos (2). La presentación de la enfermedad fue principalmente un síndrome febril de duración intermedia sin foco. Los principales síntomas fueron fiebre (74%), molestias gastrointestinales (32%), elevación de enzimas hepáticas (68%) y malestar general con artromialgias (32%). 4 pacientes presentaron un cuadro respiratorio. El 60.3% de los pacientes presentaron un síndrome febril acompañado de elevación de enzimas hepáticas. El 52.8% de los pacientes acudió a Urgencias, y un 26.4% requirió ingreso hospitalario. El 56.6% de los casos fueron pacientes con edades comprendidas entre los 11 y 30 años. En 23 (43%) casos el diagnóstico se estableció con una única muestra de suero del paciente. En el 34% de los casos se detectó seroconversión del título de anticuerpos IgM e IgG frente a *C. burnetti*. Los títulos de anticuerpos IgG estuvieron entre 1/64 y 1/4096. En un solo caso se sospechó un resultado falso positivo de la técnica ELISA en la detección de IgM. En la localidad de Villaverde del Río la incidencia global fue de un 0.5% de la población, y de un 1.26% en pacientes entre 11 y 30 años.

Conclusiones:

La determinación de anticuerpos IgM frente a *C. burnetti* puede ser una herramienta útil en la detección precoz de casos de Fiebre Q en poblaciones con una prevalencia baja.



O08.Utilidad de espectrometría de masas [Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry] (MALDI-TOF MS- Bruker®) en el manejo y control de brotes de infección nosocomial: experiencia en el Hospital Universitario Virgen del Rocío (2012).

Artacho.MJ¹, González-Galán.V¹, Torres.MJ^{1,2}, Valencia. R³, Morillo. A³, Aznar.J^{1,2}

¹ Servicio de Microbiología. UCEIMP. H.U. Virgen del Rocío. IBIS/CSIC/US. ² Departamento de Microbiología. Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. ³ Servicio de Medicina Preventiva. UCEIMP. H.U. Virgen del Rocío.

Introducción: en el último año se han producido dos brotes de infección nosocomial por bacterias multiresistentes en nuestro centro. El primer brote se declara en octubre de 2012 producido por una cepa de *A. baumannii* resistente a colistina (ABXDR) que se extiende a dos unidades de la Unidad de Cuidados Intensivos de adultos. Un mes después, en noviembre de 2012, se declara un brote de *Serratia marcescens* en Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. En ambos casos se realizan cultivos ambientales en busca de la posible fuente.

Objetivos: Identificar la fuente y establecer la relación clonal de las cepas clínicas y ambientales implicadas, mediante la espectrofotometría de masas y comparar los resultados obtenidos con la técnica de referencia, electroforesis en campo pulsado.

Material y método: se procesaron todas las muestras clínicas y ambientales para su cultivo. La identificación preliminar de todas las cepas se realizó empleando el estudio de perfiles proteicos con espectrometría de masas [Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry] (MALDI-TOF MS- Bruker®) el software Microflex LT instrument Flexcontrol 3.0 y la base de datos Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics). La identificación bioquímica de las mismas se realizó empleando el panel NC53 y NC58 del sistema MicroScan (Siemens®). Las cepas aisladas se conservaron a -70º hasta su estudio en campo pulsado.

Resultados: en ambos brotes la identificación a nivel de género y especie coincide en el 100% de las cepas. En el brote de *Acinetobacter baumannii* se estudiaron 19 cepas de origen clínico y ambiental. El dendograma creado por MALDI-TOF MS- Bruker® agrupaba las cepas en 2 clones. El clon A estaba compuesto por 13 cepas y el clon B por 2 cepas. El resto de las cepas no estaban relacionadas entre sí. El campo pulsado agrupó a las cepas en dos clones. Un clon que agrupaba a 15 cepas con dos subclones (A y B), y un segundo clon (C) que agrupaba las 4 cepas restantes. En el brote de *Serratia marcescens* se estudiaron 9 cepas de origen clínico. El dendograma creado por MALDI-TOF MS- Bruker® agrupaba las cepas en un clon compuesto por 7 cepas y el resto de las cepas no estaban relacionadas. El campo pulsado agrupó a las cepas en un solo clon. La concordancia de los resultados empleando ambas técnicas fue del 80%.

Conclusiones: el papel activo del Servicio de Microbiología en el control de la infección nosocomial del centro ha permitido determinar en 24h la identificación a nivel de género y especie y la relación preliminar entre las cepas aisladas. Nuestros resultados indican que (MALDI-TOF MS- Bruker®) tiene el potencial para convertirse en una herramienta de primera línea de investigación y rápida para la identificación presuntiva de los clones de las cepas implicadas en brotes de infección nosocomial.



O09. Utilidad del Antígeno de manano y Anticuerpo antimanano en el diagnóstico de candidiasis invasiva en pacientes críticos.

Zakariya-Yousef I.¹, Parra-Sanchez M.¹, Castro C.¹, Romero A.¹, Macías D.², Aller A.I.¹, Loza A.², Martín-Mazuelo E.¹. ¹Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, H.U.Valme Área Sanitaria Sevilla Sur. ²Unidad Clínica de Cuidados Críticos y Urgencias, H.U.Valme, Área Sanitaria Sevilla Sur.

Objetivos:

Determinar la utilidad de los biomarcadores (BM) antígeno de manano (AgM) y anticuerpo antimanano (AcM) para el diagnóstico de candidiasis invasivas (CI) en pacientes críticos no neutropénicos (PCNN)

Material y Métodos:

Estudio observacional de cohortes prospectivo de PCNN ingresados más de 7 días en UCI. Bisemanalmente se les realizó: 1) Detección de AgM (PLATELIA™ *Candida* Ag Plus) y AcM (PLATELIA™ *Candida* Ag Plus), 2) Hemocultivos (HC), 3) Cultivos para estudio de colonización fúngica. Los HC se procesaron en el BACTEC 9240 (Becton-Dickinson®) y las cepas se identificaron en CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson®) y/o tarjeta YST (Vitek-2, bioMérieux®), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se consideró CI cuando se aisló *Candida* spp. en sangre o líquido peritoneal.

Puntos de corte:

AgM: Pos \geq 50 pg/ml; Neg $<$ 50 pg/ml. (Held, J., et al. *J. Clin. Microbiol*, 2013)

AcM: Pos \geq 10 UA/ml; Neg $<$ 10 UA/ml.

Resultados:

Se han incluido 41 pacientes clasificados como: 10 CI, 20 colonizados (CC) y 11 no colonizados ni infectados (NC/NI). Las CI se clasificaron en 5 peritonitis (2 *C. glabrata*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. parapsilosis* y 1 *C. albicans*) y 5 candidemias (4 *C. parapsilosis* y 1 *C. glabrata*).

Se analizaron 177 sueros, 12 fueron positivos para AgM: 2 en 1 paciente con CI, 3 en 2 CC y 7 en 3 NC/NI. 22 fueron positivos para AcM en 4 con CI, 4 CC y 8 NC/NI. De las 708 muestras para cultivo fueron positivas 169 para *Candida* spp.

La sensibilidad (S), especificidad (E), VPP y VPN obtenidos fueron: 10%, 87.1%, 20% y 75% en el caso del AgM; 40%, 64.5%, 26% y 77% para el AcM y 50%, 54.8%, 23.8% y 80.1% cuando se utilizaron en combinación.

En la literatura está demostrada la baja S de estos BM con *C. parapsilosis*. La S de la combinación aumentó al 60% en CI por especies distintas a *C. parapsilosis*. En pacientes CC sin CI demostrada, la mayoría de positivos fueron en pacientes con alta colonización rectal, siendo la E del AcM, AgM y su combinación del 80%, 87% y del 70% respectivamente. En el 50% de los casos de CI con algún BM positivo, éste lo fue entre 1 y 10 días previo al diagnóstico.

Conclusiones:

1.- La S de ambas pruebas para el diagnóstico de CI es muy escasa, aunque aumenta cuando se utiliza en combinación en CI por *Candida* no *parapsilosis*.

2.- El VPN no es discriminatorio de una CI en PCNN. Sería necesaria la utilización combinada con otros BM.

3.- Se necesitan más estudios con un mayor número de PCNN y donde se estudien de manera combinada con otros BM de CI.



O10. Impacto económico de la implantación de una técnica molecular para el diagnóstico de meningitis aséptica.

Juan Carlos Alados Arboledas*(1), José Ramón Carrasco (2), David Gómez-Pastrana (2) y MD López Prieto (2).

UGC EEII y Microbiología (1). UGC Pediatría (2). Hospital de Jerez de la Frontera (Cádiz)

Objetivo. Evaluar el impacto de la implantación de una técnica de PCR a tiempo real para la detección de enterovirus en Líquido Cefalorraquídeo (PCR EV en LCR). **Material y métodos.** Estudio retrospectivo de pacientes diagnosticados de meningitis aséptica (MA) mediante PCR EV en el periodo mayo-2012- a Junio-2013. Como grupo control se revisaron los casos de MA diagnosticados en el periodo 2010-2011. Criterios de inclusión: presentar un cuadro de MA, edad entre 1 y 14 años y no existencia de comorbilidades. Se incluyeron en el estudio un total de 66 pacientes, 29 en el grupo control y 37 en el grupo de estudio. La homogeneidad de los dos grupos de población se aseguró estudiando 17 variables. Se determinó la duración del ingreso (DI), el uso de antibióticos (UA) y la duración del tratamiento antibiótico (DT) para cada periodo. La técnica de PCR a tiempo real utilizada para el diagnóstico microbiológico fue Xpert® EV (Cepheid), que se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS.

Resultados. En el grupo control la DI media fue mayor (4.2 días) frente a 3,57 días del grupo de estudio, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el grupo control se utilizó antibiótico en el 41.4% de los pacientes frente a un 16.2% en el grupo de estudio; en cuanto a la DT fue mayor (2 días) en el grupo control que en el grupo de estudio (0.54 días); ambas diferencias fueron estadísticamente significativas. Para nuestra serie de 37 pacientes se hizo un cálculo del impacto económico de la incorporación de la técnica Xpert® EV a nuestra cartera de servicios; así frente a un coste de reactivo aproximado de 2775 euros, extrapolar los valores de DI y DT obtenidas en el grupo control, se ha producido una reducción en las estancias de 23 días y de 54 días de tratamiento (cefotaxima), teniendo en cuenta el coste

De estos conceptos en nuestro centro (estancia 400 euros/día; cefotaxima 6 euros/día), la reducción de gastos para nuestro centro ha sido de 6.749 euros.

Conclusiones:

- 1.- La determinación de PCR EV en LCR en niños de 1 a 14 años, sin comorbilidades, disminuye la administración de antibióticos y cuando se emplean se hace durante un menor período de tiempo.
- 2.- La determinación de PCR EV disminuye la duración del ingreso, aunque no de forma estadísticamente significativa.
- 3.- El impacto económico de la implantación de esta técnica es altamente favorable.



O11. Evolución genética de los virus de la gripe en Andalucía (temporadas 2011-2012 y 2012-2013)

S. Sanbonmatsu-Gámez, M. Pérez-Ruiz*, I. Pedrosa-Corral, C. Gómez-Camarasa, L. Béjar, A. Polo, J.M. Navarro-Marí.

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada

INTRODUCCIÓN. La naturaleza del genoma de los virus de la gripe da lugar a continuos cambios antigénicos menores (“drift”) responsables de las epidemias anuales y de los constantes cambios de la vacuna trivalente.

OBJETIVO. Analizar y describir las características genéticas de los virus de la gripe que han circulado en las dos últimas temporadas en Andalucía.

MATERIAL Y MÉTODOS. Durante las temporadas 2011-2012 (I) y 2012-2013 (II), las muestras positivas de gripe de la Red de Vigilancia en Andalucía (centinela y casos graves) se inocularon en línea celular MDCK-SIAT1 para recuperación de la cepa viral. Se llevó a cabo secuenciación de un fragmento del gen de la hemaglutinina (HA) y análisis de secuencias mediante comparación con las cepas publicadas por el ECDC y disponibles en GISAID (www.platform.gisaid.org). En cepas de gripe A(H1N1)pdm09 también se llevó a cabo secuenciación de un fragmento del gen de la neuraminidasa (NA) para investigar la presencia de la mutación H275Y asociada a resistencia a oseltamivir.

RESULTADOS. En la temporada I, el 95,5% de los virus circulantes correspondieron a gripe A(H3N2), un 4% a gripe B y un 0,1% a gripe H1N1pdm09. En la temporada II, el 77,7% fueron gripe B, el 19,9% H1N1pdm09 y el 2,5% H3N2. Se estudió la HA de 49 (2 H1pdm09, 36 H3 y 11 B) y 58 (33 H1pdm09, 4 H3 y 21 B) cepas en las temporadas I y II, respectivamente. Durante las 2 temporadas, las cepas analizadas de H1pdm09 eran análogas antigénicamente a la cepa vacunal A/California/07/2009(H1N1). En el caso de H3N2, durante la temporada I circularon en nuestro medio cepas de 3 subclados diferentes, antigénicamente análogas y derivadas de la cepa vacunal de ambas temporadas A/Victoria/361/2001 (H3N2). Para gripe B, durante las temporadas I y II circularon virus análogos a 3 y 2 cepas diferentes, respectivamente. El 27% y el 28,1% correspondieron a virus B análogos a las cepas vacunales de las temporadas I (B/Brisbane/60/2008, linaje Victoria) y II (B/Wisconsin/1/2010, linaje Yamagata). No se ha detectado la mutación H275Y en la NA (resistencia a oseltamivir) en las cepas H1N1pdm09 en ambas temporadas.

CONCLUSIÓN. Durante las dos últimas temporadas, los subtipos H1pdm09 y H3 de gripe A se han mantenido antigénicamente análogos, mientras que la mayoría de los virus de gripe B eran de linajes diferentes a las cepas vacunales, hecho que concuerda con el cambio de cepa de gripe B incluida en la vacuna trivalente en estas dos temporadas.



O12. Falsa hepatitis B oculta en trasplantado renal. Propuesta de perfil para el seguimiento de inmunodeprimidos con antecedentes de hepatitis B

I. Guerrero-Lozano⁽¹⁾, M. Álvarez⁽²⁾, M.T. García-Álvarez MT.⁽³⁾, M. Rodríguez- Iglesias⁽¹⁾, F. García⁽²⁾, C. Fernández Gutiérrez del Álamo⁽¹⁾.

⁽¹⁾UGC de Microbiología, H.U. Puerta del Mar, Cádiz; ⁽²⁾UGC de Microbiología, H.U. San Cecilio, Granada; ⁽³⁾UGC de Nefrología, H.U. Puerta del Mar, Cádiz.

Objetivo

Análisis de un caso de falsa hepatitis B oculta en trasplantado renal y, como consecuencia, replanteamiento del perfil de control serológico de Hepatitis B en pacientes inmunodeprimidos.

Métodos

Serología de hepatitis B (HBsAG, anti-HBc, anti-HBc IgM, anti-HBs, HBeAG y anti-HBe): Advia Centaur® XP Immunoassay Systems (Siemens). Carga viral de VHB: sistema m2000 (Abbott)

Resultados

Paciente de 70 años trasplantado de riñón en 2004 con antecedentes de hipertensión, hiperlipemia, hernia de hiato y colestectomizado. En el momento del trasplante presenta un perfil compatible con antecedentes de hepatitis B: HBsAg (N), aHBc (P), aHBs=18 con niveles de transaminasas normales (GPT=34). En julio de 2006 tiene lugar un aumento significativo de las transaminasas y de los anticuerpos aHBs, que vuelven a niveles anteriores en pocos meses. A partir de octubre de 2007 se observa un aumento discreto de la GPT que se mantiene durante los años sucesivos y los aHBs permanecen positivos pero en ligero descenso progresivo. En septiembre de 2012 se detecta un nivel discreto de HBsAg (CO=13), que se confirma. Ante la posibilidad de una reactivación realizamos aHBc-IgM (P), HBeAg (P), aHBe (N) y CV (10^9 UI/ml), resultados que confirman la reactivación. Puesto que la presencia de anticuerpos podrían enmascarar el HBsAg y la posibilidad de que la infección estuviese activa desde tiempo atrás, se estudiaron retrospectivamente estos marcadores en muestras de los dos años anteriores, guardadas en nuestra seroteca, con los resultados reflejados en la tabla siguiente (negrita).

FECHA	HBsAG	aHBc	aHBcIgM	aHBs	HBeAG	aHBe	GPT	CV (UI/ml)
06-05-04	N	P		18			34	
25-07-06	N	P		256			149	
20-11-06				35				
11-09-07				38			29	
05-10-07							55	
26-02-10	N	P		31	(P)	(N)	59	(2800 x 10⁶)
13-06-11	N	P	(D)*	23	(P)	(N)	68	(366 x 10⁶)
09-08-11	N	P	(N)	16	(P)	(N)	71	(756 x 10⁶)
05-09-12	P-13 (c)	P	P	17	P	N	54	1000 x 10 ⁶

*Zona gris.

El estudio genotípico de la muestra reveló que se trata de un genotipo D2 con las mutaciones de escape 133T, 144E y 144G y diversas sustituciones en el dominio RT y en la proteína SHB

Conclusiones

En individuos inmunodeprimidos con antecedentes de hepatitis B, resultados aparentemente compatibles con una hepatitis B resuelta, pueden ocultar elevadas cargas virales. Consideramos que en estos enfermos, el perfil de la serología habitual frente a hepatitis B es insuficiente. El AgHBe es un marcador que precede en años al AgHBs y proponemos su inclusión de rutina en el control de enfermos inmunodeprimidos con antecedentes de hepatitis B. Además aconsejamos realizar cargas virales periódicas.



O13. Respuesta virológica frente al tratamiento de las infecciones por el Virus de la Hepatitis C con Antivirales de Acción Directa (DAA) en pacientes mono infectados y coinfectados con VIH

Palomares JC, Parra-Sánchez M*, Bernal, S, Zakariya I, Pérez L, Sivianes N, Mancebo M, Pineda JA, Martín-Mazuelos E.

U. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. H. U. de Valme (Sevilla).

Objetivos: El tratamiento con Interferón pegilado/Ribavirina de las infecciones por el virus de la hepatitis C (VHC) tiene una baja tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) especialmente en pacientes coinfectados con el VIH y con genotipos 1 y 4 de VHC. Pretendemos analizar la respuesta virológica de pacientes tratados con esta biterapia y alguno de los nuevos DAA: Boceprevir, Telaprevir, Dataclasvir, Faldaprevir o Sofosbuvir.

Pacientes y métodos: Se trataron un total de 46 pacientes (14 mono infectados y 32 coinfectados con VIH). Veinte con Telaprevir, 7 con Boceprevir, 7 con Dataclasvir, 8 con Faldaprevir y 4 con Sofosbuvir. Infectados con genotipo 1 (1a o 1b), exceto los tratados con Sofosbuvir con los genotipos 3 o 4. La mediana de edad fue de 47 años (45-51) incluyéndose 40 hombres y 6 mujeres.

Se obtuvieron muestras para la determinación de la carga viral antes de iniciar tratamiento y en las semanas 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 semanas y 12 semanas después de finalizar el tratamiento. Los resultados corresponden al corte realizado a las 12 semanas de tratamiento. La medición de las cargas virales se realiza mediante RT-PCR (Roche Cobas Ampliprep Cobas Taqman). Una carga viral de VHC inferior a 10 IU/mL se considera como "indetectable". El fracaso virológico una carga viral superior a 1000 IU/mL a las 12 semanas.

Resultados: Once (24%) de los pacientes habían recibido tratamiento previo con biterapia. Los resultados a las 12 semanas mostraron 3 fracasos virológicos (1 paciente tratado con Boceprevir y 2 con Telaprevir) sin tratamiento previo. Cuarenta y tres pacientes (93.5%) presentaron RVS tras las 12 semanas.

Conclusiones:

1. Las respuestas virales de los pacientes mono infectados y los coinfectados no mostraron diferencias significativas.
2. A las 12 semanas, se obtuvo RVS en el 93% de los pacientes, por lo que los tratamientos estudiados parecen una opción terapéutica eficaz en ambos tipos de pacientes.
3. Será necesario completar tratamiento de todos los pacientes y analizar los resultados finales para establecer su eficacia de forma definitiva.



O14. Análisis de los canales de transmisión de VIH-1 en Andalucía oriental.

Santiago Pérez-Parra, Natalia Chueca, Marta Alvarez, María Dolores Mérida, Raquel Camacho-Luque,
Federico García

Hospital Clínico San Cecilio, Servicio de Microbiología, Granada

Objetivo: Describir los diferentes canales de transmisión de VIH-1 en Andalucía Oriental, estudiar los datos epidemiológicos relacionados, obtener los mapas georeferenciados de los casos índice, y analizar la transmisión de clusters con resistencias a los antiretrovirales de primera línea

Pacientes y Métodos: Para el siguiente estudio contamos con 696 pacientes diagnosticados de VIH-1 durante el periodo 2005-2012, todos ellos residentes en Andalucía Oriental. La secuencia del gen *pol* (RT y Proteasa) se generó utilizando Trugene HIV Genotyping Kit (Siemens, NAD). Las secuencias en formato "fasta" se convirtieron a formato "mega" para ser analizadas mediante el programa MEGA 5.2. Para el subtipado, utilizamos la herramienta REGA HIV-1 Subtyping tool versión 2.0. La historia evolutiva fue inferida a través del programa MEGA 5.2 utilizando el método de Neighbor-Joining, considerando sólo las ramas pertenecientes a los clusters con un valor bootstrap superior al 85%. Para la georeferenciación de los canales de transmisión utilizamos ArcGIS Explorer Desktop Esri©.

Resultados: De las 696 secuencias utilizadas, 302 secuencias se asociaron a 78 clústers diferentes. De estos, 51 eran clusters de subtipos B, 17 de subtipos no-B y 9 de mezclas B/No-B. La mayoría de los clusters estaban formados por parejas (n=49), de hombres que practican sexo con hombres (n=31), de nacionalidad española (n=37), y se agruparon en las franjas de 25-40 años de edad (n=42). La mayor prevalencia de pacientes VIH infectados por kilómetro cuadrado, se ha registrado en las zonas metropolitana de Granada central y la costa de Granada y Almería (Puntos calientes de VIH). Hemos encontrado 5 clusters con más de 10 individuos. Sólo en 7 clusters coexistían individuos en los que se detectaba la transmisión de mutaciones de resistencia, siendo las más frecuentes las TAMs y revertientes de 215Y/F, y mutaciones para los NNRTIs.

Conclusiones: El estudio de canales de transmisión de VIH mediante análisis filogenético en grandes cohortes, se presenta como una herramienta potente y de gran utilidad para la vigilancia y control epidemiológico de la propagación del VIH. La presencia de clusters en determinados colectivos, y algunos con mutaciones de resistencia, debe alertar a los servicios de microbiología, infecciosas y medicina preventiva, y servir para generar esfuerzos colaborativos para implantar medidas de contención en la propagación del VIH-1.



O15. Estudio de las características clínicas, epidemiológicas y virológicas de pacientes VIH en primer fracaso del tratamiento antirretroviral

Gabriel Sena Corrales, Isabel Viciano Ramos, Carmen María Gonzalez Domenech, Laura Mora Navas, Valle Otero Bernal, Anita Dayaldasani, Encarnación Clavijo Frutos. Servicio de Microbiología y Parasitología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Málaga).

INTRODUCCIÓN: La elección del primer tratamiento antirretroviral (TAR) es un punto clave en la evolución de los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La aparición de mutaciones de resistencia frente a diferentes fármacos es un problema de especial importancia, ya que obliga a realizar cambios hacia regímenes más caros y complejos, limitando las posibilidades de éxito del TAR

OBJETIVOS: Describir una cohorte de paciente VIH positivos en primer fracaso a los que se solicitó un test de resistencias genotípicas y las mutaciones seleccionadas por cada régimen terapéutico.

MATERIAL Y METODOS: Estudiamos los pacientes diagnosticados de infección por VIH-1 en primer fracaso durante el período 2007-2013 atendidos en el Hospital Virgen de la Victoria (Málaga), excluyéndose del estudio aquellos en que no se consiguió amplificación de la muestra en los test de resistencia. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes cumplimentando un cuestionario que incluyó variables de interés epidemiológico, clínico, microbiológico, y farmacológico. La determinación de mutaciones de resistencia a fármacos se realizó mediante el Kit de genotipado TRUGENE HIV-1 (Siemens).

RESULTADOS: Incluimos 135 pacientes, 77,8% hombres con edad media de 45 años (22-84), carga viral media: 52.383cp/ml (37-830.822) y media de linfocitos CD4: 372 (15-1201). Un 29% de los pacientes presentaron valores de niveles de cd4 < 200 y el 16,2% presentaban una carga viral > 100.000cp/ml. 70 pacientes (51,9%) estaban en tratamiento con No análogos y 51 (37,8%) con Inhibidores de proteasas. Terapia antirretroviral al fracaso: **TNF+FTC+NAN**:18,5%, **TNF+FTC+IP**:15,6%, **TNF+3TC+NAN**:10,4%, **TNF+3TC+IP**:9,6%, **ddi+3TC+NAN**:8,1%, **ABC+3TC+NAN**:8,1%, **ABC+3TC+IP**:7,4%, **AZT+3TC+ABC**: 4,4%, **IP+rt**: 4,4%(6). Las mutaciones de resistencia más frecuentes según la línea de tratamiento fueron: **TNF+FTC+NAN** → 48%(12)K103N, 48%(12)M184V, 20%(5)Y181C; 16%(4)G190A/S, 16%(4)K65R; **TNF+FTC+IP** → 19,05%(4)M184V, 4,76%(1) L90M, 4,76%(1)82T. **TNF+3TC+NAN** → 35,71%(5)K103N, 28,57%(4)M184V. **ABC+3TC+NAN** → 36,36%(4)K103N, 36,36%(4)M184V, 36,36%(4)Y181C, **ABC+3TC+IP** → 10%(1)65R, 20%(2)184V, 10%(1)50V.

CONCLUSIONES: Las mutaciones detectadas con más frecuencia en los pacientes en fracaso del primer régimen terapéutico fueron la K103N y M184V, especialmente en los tratamientos con fármacos no análogos de nucleósidos, mientras que la selección de mutaciones a fármacos inhibidores de proteasa ocurrió en menor proporción.



O16. Cuantificación de las cuasiespecies virales en pacientes primoinfectados y naives de duración desconocida mediante secuenciación masiva de genomas únicos

¹Chueca, N. ²Martínez, NM., ¹Álvarez, M., ¹López, J., ¹Mérida, MD., ¹García García, F.
¹Hospital Clínico San Cecilio, Servicio de Microbiología, Granada, España. ²Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara. España.

Introducción: Actualmente las nuevas tecnologías de secuenciación masiva nos permiten cuantificar cada una de las cuasiespecies de VIH-1 circulantes en plasma de los pacientes infectados. En la primoinfección, se ha postulado que una sola cepa es la que finalmente instaura la infección y se la considera la cepa fundadora de todas las demás cepas que irán emergiendo tras la presión inmune y farmacológica a la que se someterá el virus.

Objetivo: determinar el grado de variabilidad de las diferentes cuasiespecies encontradas en pacientes primoinfectados y en naives amplificando y pirosecuenciando 4 regiones del gen *pol*.

Pacientes y métodos: Se estudian muestras de plasma de 10 pacientes primoinfectados [contacto de riesgo (10/10) y/o seroconversión de Acp24 (3/10) y/o presencia de Agp24 (9/10) y/o serología VIH negativa previa (2/10)] y 16 pacientes naïve de duración desconocida. Se amplifican 4 regiones del gen *pol*: proteasa entera (RTP-A: 183-465nt) y la RT en tres fragmentos (RTP-B: 414-714nt, RTP-C: 623-939nt, RTP-D: 897-1206nt). Los amplificados posteriormente se cuantifican y purifican para poder secuenciar un pool de 2x10⁶ moléculas en un secuenciador GS Junior. Las secuencias se analizan utilizando Amplicon Variant Analyzer (AVA). La mayor/menor variabilidad se mide calculando el porcentaje de la secuencia única mayoritaria.

Resultados: Se ha obtenido una mediana de 8924 secuencias por paciente (RIQ= 6036-10140). La mediana de la carga viral de los pacientes naives fue de 143186 c/ml y de los primoinfectados de 507000 copias/ml. La variabilidad observada para las 4 regiones de *pol* para pacientes naïve es: región RTP-A de 24.55 (RIQ= 16.4-37.2), región RTP-B de 33.03 (RIQ=11,36-39,5), RTP-C de 23.57 (RIQ=13,4-36,6), RTP-D de 27.3 (RIQ=12,59-41,18). En los pacientes primoinfectados la mediana de porcentaje de secuencia única es para RTP-A: 80.04 (RIQ=73-85,47), RTP-B; 79.36 (RIQ=70,7-84,66), RTP-C; 72.37 (RIQ=66,09-79,68) y para RTP-D: 75.45 (RIQ=68,9-79,55). Las diferencias entre grupos han sido estadísticamente significativas para todos los fragmentos analizados (P<0,0002)

Conclusiones: Los porcentajes altos de secuencia única, >75% de homología, ayuda en la detección de casos de primoinfectados. Con las técnicas de secuenciación masiva se pone de manifiesto el “microviroma” presente en el paciente.



POSTERS



P01. Diseño e implantación de un método de control de calidad de las placas de Mueller Hinton agar para difusión en agar.

Ballestero Téllez, M*; Muñoz Nuño, E; López-Cerero L; Domínguez Alavis, C; Pascual, A.

Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla

Objetivos: Un problema frecuente en nuestro laboratorio para el control de calidad del método de antibiogramas de difusión en disco era la detección de halos de inhibición superior al esperado. Esto era debido a un volumen de agar Mueller Hinton comercial inferior al recomendado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). El objetivo de este estudio fue establecer un método de control de calidad sencillo y práctico para evaluar que las placas comerciales de Mueller Hinton contienen la cantidad de agar necesaria, y asegurar así la fiabilidad de los resultados.

Métodos: Se realizó un estudio comparativo durante 20 días entre el peso de 22 cajas de Mueller Hinton agar tal y como eran suministradas por la casa comercial (medido con la balanza de precisión Sauter) el grosor medio del agar de las placas en su interior y los resultados obtenidos al testar discos de diferentes antibióticos con las cepas patrón ATCC 25922 *E. coli* y ATCC 25923 *S. aureus* según el método recomendado por el CLSI.

Resultados: De todas las cajas pesadas, 17 (77%) tuvieron un peso superior a 760 gr, un grosor medio de 38mm (DS= 0,22). Al hacer el antibiograma en estas placas, los halos estuvieron dentro de los estándares en un 75% de los antibióticos testados. Sólo 13 antibióticos (25%) tuvieron halos superiores al valor esperado (con una media de 2.5mm DS= 0,7). Por otra parte, 5 cajas dieron un valor inferior a 760 gr y el grosor de las placas era de media 3mm (DS= 0,4) 21 de los antibióticos testados (53%) tuvieron halos superiores al valor esperado (media 5,4 mm DS=2).

Conclusiones: 1) Las cajas de agar Mueller Hinton comerciales que pesan menos de 760 gr contienen placas con grosores de agar inferiores a 4mm, que no permiten la adecuada realización de antibiogramas mediante difusión; 2) hemos logrado establecer un mecanismo de control rápido y sencillo que nos permite descartar las placas de Mueller Hinton que no cumplen los estándares de calidad propuestos por el CLSI.



P02. Rendimiento del uso de placas cromogénicas en el cultivo de muestras de orinas

M.C. Gómez Sánchez*, M.C. Domínguez Jiménez, M.E. Roldan Fontana.

Laboratorio de Microbiología, U.G.C. de Laboratorios Clínicos. Hospital de La Merced. Á.G.S. de Osuna.

Objetivos: El objetivo de nuestro estudio fue analizar el ahorro económico y de tiempo que ha supuesto para el laboratorio de Microbiología la introducción de placas cromogénicas, en el cultivo de muestras de orina durante este último año.

Métodos: Se han estudiado las muestras de orinas para cultivo recibidas desde Septiembre de 2012 a Septiembre de 2013. Estas muestras se sembraron en Agar Sangre (AS) (Biomeriéux) y en un medio cromogénico denominado chromID CPS (Biomeriéux) que permite identificar los principales patógenos urinarios sin necesidad de usar tarjetas de identificación. Anteriormente al periodo de estudio, las muestras de orina se sembraban en AS y CLED (Biomeriéux) y los patógenos urinarios aislados se identificaban mediante tarjetas de identificación Vitek2 (Biomeriéux). En ambos casos, se realizó el estudio de sensibilidad usando tarjetas N-244 (Vitek2, Biomeriéux). Se incluyeron sólo las muestras de orina en las que se aisló *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, que se identificaban en el medio chromID CPS como colonias rosas y amarillas respectivamente. Se calculó el coste total del cultivo de las muestras de orina usando CPS, comparándolo con el coste cuando se usaba CLED + tarjeta de identificación y el ahorro económico que supone esta modificación.

Resultados: Durante el periodo de estudio se recibieron 16.533 muestras de orina para cultivo. Se sembraron 10.388 (63%) muestras. Se aislaron 2.189 patógenos urinarios, de los cuales 1.487 (68 %) fueron *Escherichia coli* y 94 (4%) *Proteus mirabilis*. El coste total de las muestras de orina usando AS + CPS fue de 9.786,4€ (incluida la tarjeta de sensibilidad) y si se hubiera usado AS + CLED + tarjeta de identificación de 17.665,5€ . El uso de CPS aumenta el gasto de la siembra en 658,3 €/ año, pero se ahorra en el uso de las tarjetas de identificación 8.537,4€/ año, por lo que se ha ahorrado 7.879,1€ al año sin perder calidad en el trabajo de dichas muestras. También supone una disminución de trabajo técnico en la preparación de las tarjetas, y un adelanto de 24h en la identificación de la bacteria productora de la infección del tracto urinario.

Conclusiones: La incorporación en la siembra de orinas de este medio cromogénico ha supuesto un ahorro económico importante en el laboratorio de Microbiología, además de una disminución de trabajo técnico en la preparación de las tarjetas de identificación de patógenos urinarios y de un adelanto de 24h en la emisión del informe preliminar.



P03. Valoración de la citometría de flujo como método de cribaje para el estudio de infecciones urinarias en pacientes ancianos de atención primaria.

Guillermo Martín-Gutiérrez*, Ana Porras González, María del Mar Redero Gascón, Carlos Martín Pérez, José Antonio Lepe Jiménez, Javier Aznar Martín.

Objetivo: Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son un problema común en la población ≥ 65 años. El diagnóstico precoz con alta sensibilidad es esencial para la instauración de una antibioterapia adecuada. El objetivo de este estudio es evaluar y optimizar el uso del citómetro de flujo (Sysmex UF1000i®) como cribado para las ITUs en pacientes ≥ 65 años procedentes de Atención Primaria.

Material y métodos: Se estudiaron 346 orinas de pacientes ≥ 65 años con sospecha de infección urinaria, enviadas al Hospital Universitario Virgen del Rocío, durante el periodo enero-mayo 2013. Las muestras se estudiaron mediante citometría de flujo y cultivo cuantitativo en medio cromogénico (gold standard).

Se evaluaron diferentes puntos de corte para bacterias y leucocitos en función del área bajo la curva ROC, calculándose la sensibilidad (S), especificidad (E), el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) para cada punto de corte.

Los datos fueron analizados con el programa STATA v11.

Resultados: Se incluyeron 346 pacientes, cuya edad media fue de $76,70 \pm 0,75$ años. De las 346 muestras 113 (32,65%) fueron positivas, 214 (61,84%) negativas y 19 (5,49%) contaminadas.

El área bajo la curva ROC utilizando el número de bacterias (0,98) fue mayor que para los leucocitos (0,82), existiendo diferencias significativas entre ellas ($P < 0,01$). El estudio conjunto de bacterias y leucocitos no supuso ninguna mejora, por lo que se utilizaron distintos umbrales basados en el número de bacterias. Los valores de S, E, VPP y VPN con el umbral de 100 bacterias/ μl fueron: 100%, 73,8%, 66,9% y 100%, mientras que con el umbral de 200 bacterias/ μl fueron 99,1%, 87,4%, 86,2% y 99,5% y con 300 bacterias/ μl , 93,8%, 92,5%, 86,9%, 96,6%. El punto de corte óptimo (S 93,8% y E 93,9%) el sería de 338 bacterias/ μl , pero proponemos 200 bacterias/ μl con el obtenemos los valores más altos de sensibilidad y VPN, que consideramos los parámetros exigibles a esta prueba de cribaje.

Conclusiones: La citometría de flujo es un sistema eficiente y rápido para la detección de infección urinaria en ≥ 65 años, pudiéndose establecer como punto de corte 200 bacterias/ μl . Además, permite el cribaje de las muestras a cultivar y obtener un resultado negativo en un breve periodo de tiempo, evitando administrar tratamientos empíricos innecesarios.



P04. Analisis de hemocultivos contaminados en un periodo de cinco meses (noviembre 2012-marzo 2013)

Patricia Jimenez Aguilar, Pilar Aznar Marín, Iria Jesus de la Calle, Alberto Romero, Kathlyn Rodiere, Santiago Perez Ramos.

Hospital Universitario de Puerto Real.

Objetivos:

Los hemocultivos son una herramienta fundamental para el diagnóstico de las bacteriemias y cuadros sépticos. Su contaminación constituye un problema para la práctica clínica diaria, ya que supone retrasos en el diagnóstico, incremento innecesario de carga de trabajo en el laboratorio e invalidez de los resultados obtenidos. La toma de la muestra y el procedimiento de extracción constituyen uno de los principales motivos responsables de la contaminación de la muestra. El objetivo de nuestro estudio es conocer el porcentaje de hemocultivos contaminados durante un periodo de 5 meses (desde noviembre de 2012 hasta marzo de 2013) así como su procedencia para poder establecer medidas preventivas al respecto.

Material y métodos:

La extracción de sangre para hemocultivos se realizó por venopunción y fue inyectada en frascos BD BACTEC™ Plus anaerobic, aerobic /F medium (Becton Dickinson Diagnostic) e incubados en el sistema automatizado BD BACTEC™ (Becton Dickinson Diagnostic). Se recogieron diariamente los datos de hemocultivos contaminados durante 5 meses (desde noviembre de 2012 hasta marzo de 2013), así como procedencia del hemocultivo, microorganismo aislado, y antibiograma. Se realizó la valoración de los resultados de hemocultivos positivos por el microbiólogo y del significado clínico por el especialista del servicio de infecciones.

Resultados:

En el periodo comprendido entre noviembre de 2012 y marzo de 2013 se recogieron 572 hemocultivos de los cuales 89 (15.55%) fueron contaminaciones. El género más comúnmente aislado fue *Staphylococcus*, siendo la especie *S. epidermidis* la más frecuente (38.46%) seguida de *S. hominis* (26.37%), *S. capitis* (13.18%), *S. haemolyticus* (8.79%), *S. auricularis* (4.39%) y otros microorganismos contaminantes (8.79%). Con respecto a la procedencia de los hemocultivos contaminados se observó que 33 (37.07%) de ellos procedían del Servicio de Medicina interna, 34 (38.20%) de Urgencias, 4 (4.49%) de Cirugía, 3 (3.37%) de Pediatría, 4 (4.49%) de UCI, y 11 (12.35%) procedentes de diversos Servicios hospitalarios.

Conclusiones:

El porcentaje de contaminación de hemocultivos en nuestro centro hospitalario en un periodo comprendido en 5 meses es del 15.55%, siendo el microorganismo más frecuentemente aislado como contaminante *S. epidermidis*. La mayoría de los hemocultivos contaminados procedían de Urgencias y de Medicina Interna. Creemos que se deberían realizar más jornadas informativas y didácticas para la toma de hemocultivos en dichas áreas hospitalarias.



P05. Evaluación preliminar de una técnica molecular para el diagnóstico bacteriológico de sepsis. Estudio comparativo hemocultivo-magicplex sepsis.

R. Tejero, M. Causse *, I. Gracia, F. Solís, F. Rodríguez , M. Casal .

Servicio de Microbiología. H.U. Reina Sofía. Córdoba.

Objetivos: La elevada morbimortalidad de la sepsis requiere terapia empírica inminente, el retraso es un determinante de mortalidad. La detección temprana del patógeno es crucial. Se evalúa una PCR a tiempo real para la detección cualitativa de microorganismos relacionados con la sepsis frente al cultivo.

Material y Métodos: Se estudian las muestras recibidas con sospecha de sepsis, con la técnica PCR a tiempo real Magicplex sepsis. El hemocultivo se procesa siguiendo el procedimiento habitual del laboratorio. La técnica molecular consistía en PCR a tiempo real con el kit comercial Magicplex sepsis®, que incluye un screening previo de microorganismos grampositivos y gramnegativos-hongos, detecta 90 patógenos (73 bacterias grampositivas, 12 bacterias gramnegativas y 6 hongos) y 3 genes de resistencia (vanA, vanB y mecA). Se analiza la concordancia entre la técnica molecular y el cultivo.

Resultados: Se procesan 70 muestras, una por paciente con sus hemocultivos. Se valoró la recepción de la muestra con una fecha cercana entre las técnicas con ± 2 días para el estudio. La PCR fue positiva en un 24(34,3%), negativa en un 45(64,3%) e invalidada 1(1,4%) de las muestras. Fue positiva para un solo aislamiento, 5 *E. faecalis*, 3 *E.coli*, *S. epidermidis* y *E. gallinarum* 2 respectivamente y 1 de *S. pyogenes*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, SAMS, y *E. faecium* respectivamente y con varios aislamientos 8 casos. El cultivo fue positivo en 25(35,7%) y negativo en 45(64,3%). Positivo para *S. epidermidis* 5, *S. hominis* 4, *E. coli* 3, *K. pneumoniae* 2, y 1 de *S. pyogenes*, *P. multocida*, *A. baumannii*, *B.cepacia*, *E. faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *E. faecium* y *Candida glabrata* respectivamente y con varios aislamientos 3 casos. Coincidió en 4 casos la PCR con el hemocultivo: 2 casos de *E.coli*, 1 *S. pyogenes* y 1 *A. baumannii*. De los cultivos positivos con PCR negativa, *P. multocida* y *B.cepacia*, no son identificados por la técnica molecular, 4 *S. epidermidis* y 2 *S. hominis* fueron considerados contaminantes por ser aislados en una sola toma. Fueron positivos en el cultivo (con PCR negativa) en más de dos tomas el aislamiento de 2 *K. pneumoniae* y 1 *E. faecalis* y en una toma 1 *Candida glabrata* y 1 *Streptococcus sanguis* y *K. pneumoniae* respectivamente. Se aisló *E. coli* en dos tomas en el caso de la PCR invalidada. De los resultados de varios aislamientos coincidió la PCR con cultivo en *Candida albicans* + MSSA, *A. baumannii* + *E. faecalis* en PCR y el aislamiento sólo de *A. baumannii* en cultivo y MSSA + *S. epidermidis* en PCR y el aislamiento sólo de *S. epidermidis* en el cultivo.

Conclusiones: Es una técnica rápida, de fácil realización, que puede adecuar el tratamiento empírico a uno dirigido al microorganismo. En esta serie debido a las limitaciones del estudio y de las técnicas los resultados han sido discordantes en el uso cotidiano en el laboratorio. Se necesita estudios con más comparadores para establecer su validez.



P06. Impacto de la identificación directa desde hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF sobre el manejo clínico de los pacientes.

B. Pérez Rodríguez*, M.J. Artacho Reinoso, A. Ruíz Castillo, J.A. Lepe Jiménez, I. Vázquez Barba, J. Aznar Martín.

Servicio de Microbiología-UCEIMP. Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Objetivo. La identificación directa de microorganismos a partir de hemocultivos positivos utilizando espectrometría de masas (MALDI-TOF) puede optimizar el manejo antibiótico en pacientes con bacteriemia. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto de esta nueva tecnología en el tiempo de informe de los hemocultivos positivos y en la adecuación del tratamiento antibiótico de los pacientes con bacteriemia.

Métodos. Estudio observacional prospectivo de enero a septiembre de 2013 para evaluar la calidad de identificación en 227 hemocultivos positivos frente a las técnicas convencionales (Microscan o API), así como el impacto sobre el tiempo de informe de hemocultivos positivos y en el manejo clínico en una muestra de 81 pacientes. Las muestras analizadas procedían de botellas aerobias y anaerobias positivas procesadas en BACTEC Fx y se procesaron mediante el Sepsityper (Bruker Daltonics) analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics). El impacto sobre el manejo antibiótico de los pacientes se evaluó retrospectivamente en base a la historia clínica.

Resultados. La concordancia de la identificación directa desde 227 botellas de hemocultivos positivos frente a la identificación convencional fue del 93,6%. En los 81 pacientes analizados, la mediana de tiempo en protocolo de informe fue de 18 horas y 35 minutos. Mediante el estudio clínico sobre los 81 pacientes se identificó un porcentaje de 6% de *Streptococcus spp*, 5% de *Enterococcus spp*, 4% bacterias anaerobias, 18% de *Staphylococcus spp*, 9% de bacilos gran negativos no fermentadores y un 54% de enterobacterias. En 47 pacientes (57% de los casos) el informe rápido se tradujo en una adecuación del manejo clínico, principalmente mediante cambios o adecuación del tratamiento antibiótico. Esta adecuación se realizó en base al planteamiento de infección relacionada con el catéter en los aislamientos de *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos, la posibilidad de separación entre *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, la adecuación de tratamiento en *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp*, *Enterobacter spp* y *Citrobacter spp*, no incluidos generalmente en la terapia empírica y el desescalamiento en muchas de las infecciones por *E. coli* o *K. pneumoniae*. También supuso en algunos casos el paso de tratamiento combinado (terapia empírica) a monoterapia.

Conclusiones. La identificación directa desde botellas de hemocultivo mediante espectrometría de masas aporta un importante valor añadido en el manejo antibiótico de los pacientes.



P07. Protocolo simplificado de identificación bacteriana directa de hemocultivos positivos mediante técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF)

I. Guerrero-Lozano, F. Galán-Sánchez, A. García-Tapia, P. Marín-Casanova, C. Fernández-Gutiérrez del Álamo, P. García-Martos y MA. Rodríguez-Iglesias.

UGC de Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Objetivo

Evaluar los resultados de la identificación directa a partir de hemocultivos positivos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Soria Melguizo) usando un nuevo protocolo de trabajo simplificado.

Material y Método

Se analizaron un total de 57 hemocultivos positivos (Bactec Plus Aerobic, Anaerobic, Peds; Becton Dickinson, EEUU) obtenidos consecutivamente durante un periodo de dos meses, correspondientes a 57 pacientes. Tras la tinción de Gram, se procesaron los frascos en los que se observaron bacilos gram negativos, cocos gram positivos en cadenas/parejas ó levaduras (tanto si se trataba de una sola botella positiva o de varias). En el caso de cocos en racimos, sólo se analizaron aquellos con al menos 3 frascos positivos. A partir de 5 ml de sangre del frasco de hemocultivo, se centrifuga 10 minutos a 1000rpm. El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo y se vuelve a centrifugar 15 minutos a 4000 rpm. Tras eliminar todo el sobrenadante se recoge del sedimento con el extremo contrario de un asa y colocar en dos círculos de la placa de muestras de MALDI-TOF. Se deja secar y se añade 1 µl de ácido fórmico al 70% y 100% en cada pocillo. Una vez secado se añade 1 µl de matriz y se realiza la lectura.

Resultados

De los 57 hemocultivos analizados 53 (93%) resultaron positivos y 4 (7%) negativos. El 75,5% (40) de los hemocultivos fueron positivos con ácido fórmico al 70 y al 100%, mientras que un 13,2% (7) de las muestras sólo fueron identificadas con ácido fórmico al 100% y un 11.3% (6) sólo con ácido fórmico al 70%. Los 53 microorganismos identificados fueron los siguientes: Enterobacterias (25), *Staphylococcus spp* (9), BGNNF (8), *Streptococcus spp* (4), Anaerobios (4), *Candida spp* (2) y *Corynebacterium sp* (1). Existió correlación con identificación según metodología habitual, excepto para *Raoultella ornithinolytica*, identificada por Wider como *Klebsiella oxytoca*. De los 4 resultados negativos, 2 fueron *S. aureus*, y ambas muestras estaban muy hemolizadas.

Conclusiones

Esta sencilla técnica nos permite la identificación, en un 93% de los casos, directamente del frasco de hemocultivo, de una amplia variedad de microorganismos responsables de bacteriemia. Consideramos necesario el uso de ácido fórmico al 70% y 100%. La rapidez del método presenta una gran ventaja a la hora de informar al clínico responsable del paciente. Resaltamos su facilidad y bajo coste por lo que podría resultar de gran interés para los laboratorios de Microbiología.



P08. Evaluación de un medio cromogénico para la identificación y aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ballesteros, M*; Salamanca, E; Batista, N; Pascual, A.

Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla.

Objetivo: Evaluación del medio cromogénico Agar chromID *P.aeruginosa*[®] (PAID, bioMérieux) para aislar e identificar *P.aeruginosa* en esputos de pacientes con fibrosis quística (FQ) y bronquiectasias (BQ).

Métodos: Se inocularon placas PAID y se incubaron a 37°C con lecturas a las 24, 48 y 72 horas registrando el tiempo de crecimiento, aparición de color violeta y aspecto de las colonias.

Se hicieron 3 ensayos:

- 1) Con cepas control: *P.aeruginosa* (ATCC 27853), *B.cepacia* (ATCC 25608), *P.stutzeri*, *B.putida* y *P.aeruginosa* (Control SEIMC)
- 2) Con aislados clínicos: *S.marcescens* (1), *S.maltophilia* (2), *A. xylooxidans* (2) y *P.aeruginosa* de fenotipos mucoso (1), puntiforme (1) y no metálica (1).
- 3) Cultivo directo de 47 muestras de esputo: 12 de pacientes con FQ y 35 con BQ. En este apartado se valora además la inhibición de la flora habitual orofaríngea (FH) y de patógenos distintos a *P.aeruginosa* en comparación con las mismas muestras sembradas en medio MacConkey, agar sangre y agar chocolate.

Resultados: Ensayo 1 y 2: Todas las cepas y aislados estudiados crecieron entre 24 y 48 horas pero solamente *P.aeruginosa* generó pigmento violeta, independientemente de su fenotipo.

Ensayo 3: En el medio PAID no se detectó en ningún caso crecimiento de FH, patógenos respiratorios habituales (6), *S.aureus* (15) o bacilos gram negativos no fermentadores (5), que sí crecieron en agar MacConkey. Solamente se detectó crecimiento de *E.cloacae* en un caso, pero de color distinto al esperado.

Conclusiones: 1) El medio cromogénico Agar chromID *P.aeruginosa*[®] se comporta como un buen medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *P.aeruginosa*, tanto de cepas, aislados o muestras directas. 2) Nos permite aislar e identificar este patógeno en 24-48 horas sea cual sea su fenotipo, sin necesidad de pruebas adicionales. 3) A pesar del escaso número de muestras estudiadas, el medio parece útil para la detección de las cepas mucosas de *P.aeruginosa*, relacionadas con la gravedad de la clínica en FQ, aunque necesitan más tiempo de incubación del descrito por el fabricante para el fenotipo metálico. 4) La introducción del uso del medio PAID en la rutina de trabajo para muestras de pacientes con FQ o BQ supondría un gran ahorro de tiempo de trabajo y reactivos en el laboratorio.



P09. Impacto del consumo de linezolid en las unidades de Medicina Intensiva y Reanimación.

Sena Corrales. G*; Dayaldasani Khialani. A; Garcia Lopez. V; Dominguez Rivas. Y;
Odero Bernal. V; Gallegos Merino. JM; Ortega Torres. M; Clavijo Frutos. E. Servicio de Microbiología y
Parasitología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Málaga).

Introducción: Linezolid es un antibiótico del grupo de las oxazolidinonas. Se utiliza como tratamiento de infecciones graves causadas por patógenos grampositivos resistentes a varios antibióticos. Desde su aprobación, se ha observado un aumento de su resistencia, principalmente en estafilococos coagulasa negativos(ECN).

Objetivo: Conocer el consumo y número de cepas resistentes a linezolid en una Unidad de Medicina Intensiva(UMI), Reanimación(RECU) y resto del hospital. Describir las características clínicas-epidemiológicas de los aislamientos en un periodo de tres años.

Material y métodos: Estudio retrospectivo del consumo de linezolid 2009-agosto 2013. Para comparar el consumo de linezolid se ha realizado el cálculo de la Dosis Diaria Definida(DDD)/100 estancias. Estudio descriptivo 2011-agosto2013: Se recogieron las características clínicas-epidemiológicas de pacientes que presentaron aislamientos de ECN resistentes al linezolid(CMI>4). Identificación y estudio de sensibilidad: Sistema MicroScan Walk-Away(Siemens®), tiras E-Test(Biomerieux®).

Resultados:

Consumo de linezolid: 2009:1227(47%)/2010:1335(62,64%)/2011:1945(74,03%)/2012:1803(53,09%)/2013:1465(49,81%) → UMI+RECU

2009:1382(53%)/2010:796(37,36%)/2011:682(25,97%)/2012:1593(46,91%)/2013: 1476(50,19%) → Resto hospital

DDD/100 estancias:

2009:11,92/2010:12,99/2011:19,72/2012:18,24/2013:28,45 → UMI+RECU

2009:0,64/2010:0,39/2011:0,37/2012:0,89/2013:1,20 → Resto

Resistencia a linezolid:

2009:2,3%/2010:1,92%/2011:4,71%/2012:5,39%/2013:5,77% → Total

2011:11,95%/2012:16,24%/2013:17,9% → UMI+RECU

2011:2,64%/2012:2,25%/2013:2,07% → Resto

Estudio descriptivo 2011-agosto 2013: Presentaron resistencia a linezolid 142 aislamientos(94 pacientes), 66(70.2 %) hombres. Edad media: 59.9 años. 92.3% casos intrahospitalarios: servicio más frecuente UMI(59.9 %), seguido de RECU (10.6%). Muestras más frecuentes: hemocultivos(68.3 %) y exudados(10.6%). Se observó resistencia conjunta a daptomicina en el 3.5% de los casos y a teicoplanina en 2.8%. Observamos diferencias estadísticamente significativas al comparar la resistencia del resto del hospital frente UMI+RECU(p=0,046) y en las DDD/100 estancias(p=0,05).

Conclusiones: Al comparar las DDD/100 estancias de UMI+RECU con respecto al resto del hospital observamos como la presión antibiótica y el consumo especialmente elevado de linezolid en estos servicios han favorecido el aumento de resistencia de cepas de ECN resistentes a linezolid.



P10. Resistencias antibiótica en aislamientos de muestras invasivas

Casas-Ciria Fco Javier*, Sanchez-Porto Antonio, García-Navarrete Africa.

Microbiología. Hospital de La Línea

Objetivos: Comparación de resistencia para aislamientos invasivos del hospital de La Línea.

Método: Extracción de datos del sistema informático del laboratorio comparado con resultados obtenidos en España y en Europa reflejados en el informe “Antimicrobial Resistance Surveillance in Europa 2011” disponible en la web a través del ECDC.

Resultados y Conclusiones: De todos los gráficos obtenidos se deduce que para los bacilos Gram negativos, los aislamientos del Hospital de La Línea presentan, en general, menos resistencias que los aislamientos del resto de España.

En el caso de *Escherichia coli*, los porcentajes de resistencias están en valores intermedios, por debajo de porcentajes del resto de España, pero por encima de la media Europea.

Igual aparece para *Pseudomonas aeruginosa*, menor resistencia en general para los aislamientos del Hospital de La Línea, con ausencia de cepas resistentes para Piperacilina/tazobactam. Si hay una mayor resistencia en los valores de aislamientos del Hospital de La Línea respecto de los aislamientos del resto de España para Aminoglucósidos y Carbapenemas. El caso de los Carbapenemas puede explicarse por su uso frecuente en situaciones graves en ausencia de aislamientos bacterianos

Para *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* tenemos en el Hospital de La Línea menos resistencias frente a metilicina y gentamicina de alto nivel respectivamente.

Para *Klebsiella pneumoniae*, las resistencias en Europa son demasiado elevadas. En España y en La Línea son menores a las resistencias europeas pero teniendo el Hospital de La Línea porcentajes de resistencias a Cefalosporina de 3ª generación y Carbapenem más altas que el resto de España, quizás por un uso excesivo de estos fármacos en el Hospital de La Línea.

Cuando se estudia la evolución para *Klebsiella pneumoniae* se observa un enorme aumento en la resistencia para las cepas hospitalarias entre 2010 y 2012 para todos los antibióticos menos fosfomicina. En las cepas ambulatorias se detecta se observa descenso importante de resistencias a cefalosporinas, manteniéndose el nivel de resistencias de fosfomicina y aumento de resistencias de amoxicilina/clavulánico y trimetoprim/sulfametoxazol. Esta aparente disparidad es sólo reflejo de prescripción de un perfil distinto de antibióticos indicando la necesidad de mejorar la prescripción de antibióticos en los dos niveles.



P11. Aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en dos periodos de tiempo de 2012 y 2013

L. Del Gigia Aguirre*, S. García Muñoz, I. Reche Molina, I. Alférez García, W. Sánchez-Yebra Romera, M.J. Martínez Lirola, A. Reyes Bertos, M. Morales Torres

Complejo Hospitalario Torrecárdenas, Almería.

Objetivo:

Comparar los aislamientos hospitalarios de CPBL (*E.coli* y *K.pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido) en los dos primeros cuatrimestres de 2012 y 2013 y establecer su relación con el consumo de cefalosporinas y carbapenemas.

Métodos:

Para ello, solo consideramos el primer tipo diferente de CPBL por paciente adulto hospitalizado en el Hospital Torrecárdenas (número de ingresos en 2012, 17126 y en 2013, 17543), comparando los periodos: enero-agosto 2012 y enero-agosto 2013 (fuente: SIL UGC Biotecnología); así como los consumos de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, imipenem y meropenem expresados en DDD/100 estancias (fuente: registro de Farmacia).

Resultados:

Se aislaron un total de 217 CPBL procedentes de 208 pacientes, 94 en 2012 (53 *E.coli*, 41 *K.pneumoniae*) y 123 en 2013 (73 *E.coli*, 50 *K.pneumoniae*), procedentes de 214 muestras, 92 en 2012 (orinas 35; respiratorias 14; sangre 3 y ex./líq.biológicos 40) y 122 en 2013 (orinas 59; respiratorias 24; sangre 9 y ex./líq.biológicos 30). Los aislamientos procedían de servicios quirúrgicos (23 en 2012 y 33 en 2013), médicos (49 en 2012 y 72 en 2013) y de UCI/Reanimación (22 en 2012 y 18 en 2013).

Consumos de antibióticos expresados en DDD/100 estancias (2012/2013): cefotaxima 1.04/1.94, ceftazidima 0.87/1.12, ceftriaxona 9.17/7.48, cefepima 0.65/0.88; imipenem 3.37/3.33; meropenem 3.29/ 4.13.

Conclusiones:

1. Se observó un incremento del 31% de CPBL, tanto de *E.coli* como *K.pneumoniae*, entre 2012 y 2013, debido fundamentalmente al incremento de aislamientos urinarios de *E.coli* de servicios médicos y quirúrgicos.
2. El consumo total de cefalosporinas de tercera y cuarta generación se mantuvo estable entre ambos periodos de tiempo, observándose, sin embargo, importantes variaciones individuales: incremento de cefotaxima del 86.53%, de ceftazidima del 28.73%, de cefepima del 35.38% y disminución de ceftriaxona del 18.42%.
3. El consumo de carbapenemas entre ambos periodos de tiempo se incrementó un 12% a expensas de meropenem.



P12. Caracterización de un episodio de colonización por *Klebsiella pneumoniae* productor de SHV-2 en la unidad de Neonatología.

*López-Cerero L, Serrano L, Salamanca E, Romero C, Luna S, Rodríguez-Baño J, Pascual A.

Unidad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.
España

Objetivo: En enero de 2013, en un control rutinario de la Unidad de Neonatología, se detectaron neonatos colonizados por *K. pneumoniae* productor de BLEE (KPBLEE). El objetivo del estudio fue caracterizar el determinante de resistencia y la relación clonal entre los aislados, así como analizar la eficacia de las intervenciones de control.

Material y Métodos: para estudiar el impacto de las medidas implantadas, se tomaron muestras de: 1) frotis rectales (n = 56) semanales de todos los niños ingresados durante 8 semanas; 2) muestras ambientales de superficies de la unidad (n = 25) y 3) muestras de agua de los sifones y frotis de los desagües de los lavabos de la unidad antes (n = 8) y después (n = 8) de la desinfección. Todas las muestras se inocularon en agar Mac Conkey suplementado con 4 mg/l de cefotaxima. Los aislados se identificaron mediante pruebas bioquímicas y el despistaje de BLEE se realizó mediante doble disco. La caracterización de la BLEE se realizó mediante PCR con cebadores específicos de cada grupo de enzimas y posterior secuenciación. La relación clonal se analizó mediante PFGE con *XbaI* y se compararon con aislados detectados previamente en la Unidad.

Resultados: En total se detectaron 33 niños colonizados hasta la semana 5 y a partir de ese momento se continuó el despistaje de portadores hasta completar 3 semanas con todas las muestras negativas. Sólo hubo un caso de infección en un neonato que llevaba 15 días ingresado. Se detectaron aislados de KPBLEE en dos lavabos y un dispositivo móvil. Las medidas de control incluyeron limpieza terminal semanal de la unidad, formación del personal, vigilancia de las medidas de aislamiento de los niños colonizados, vigilancia de la higiene de manos, desinfección de todos los lavabos con lejía e implantación del lavado diario de los niños con botellas de agua individuales. Las muestras de los lavabos fueron negativas tras la desinfección. Todos los aislados producían SHV-2 y mostraban un mismo pulsotipo (>95% de similitud) y estaban relacionados con un paciente colonizado detectado en diciembre, que se consideró el caso índice. Estos aislados no estaban relacionados con clones detectados previamente en el centro.

Conclusiones: 1) El control mensual de portadores de enterobacterias productoras de BLEE que se realiza en la Unidad de Neonatología permitió detectar de forma precoz la diseminación de un clon productor de SHV-2; 2) Las medidas implantadas permitieron erradicar la contaminación.



P13. Caracterización de un brote de *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido en una Unidad de Cuidados Intensivos.

M. C. Serrano¹, M. Ramírez¹, M. Chávez¹, A. Barrero², S. Expósito³, L. Azañedo⁴, A. Vindel⁴, V. Bautista⁴, D. Saez⁴, J. Oteo⁴, M. Vaquero¹, M.D. de Luchi¹, A. Galloso¹.

¹Sección Microbiología. Servicio Laboratorio. ²Unidad de Cuidados Intensivos, ³Servicio de Medicina Preventiva, Hospital San Juan de Dios del Aljarafe. Sevilla. ⁴Centro Nacional de Microbiología, ISCIII.

Introducción/Objetivos: En enero de 2011 se instauró un protocolo de vigilancia epidemiológica multidisciplinar (UCI, Medicina Preventiva y Microbiología) en la UCI para el control de la incidencia de gérmenes multirresistentes. Gracias a este protocolo, detectamos en el 2012 un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Material y Métodos: Aislados: los aislamientos procedían de muestras para vigilancia epidemiológica (exudado perineal, incluyendo orina, aspirado bronquial y/o exudado de herida/úlceras, en caso de sondaje, ventilación mecánica y/o presencia de solución de continuidad en la piel). Identificación y sensibilidad: Las muestras se sembraron en medio cromogénico chromID™ ESBL de BioMérieux. La identificación se realizó con el sistema Vitek2 compact (BioMérieux) y la confirmación de BLEE con discos combinados de ceftazidima y cefotaxima/ácido clavulánico. Caracterización molecular: Se estudió la epidemiología molecular mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Los genes que codificaban las BLEE se estudiaron mediante amplificación por PCR y secuenciación.

Resultados: Durante Mayo-Julio 2012, se recuperaron en 10 pacientes 33 aislamientos de *K. pneumoniae* con características fenotípicas de BLEE. Dieciocho de exudados perineales, 13 en muestras respiratorias, 1 en orina y 1 en absceso. En 8/10 pacientes, se detectó un clon mayoritario productor de BLEE CTX-M-15 (PFGE). En el resto de pacientes, las cepas fueron diferentes entre sí, y respecto al clon mayoritario. El primer paciente en el que se aisló la cepa clonal, fue en la quinta semana de rastreo, en 2 durante la segunda semana y en 5 en la primera. Todos los casos fueron colonizaciones, excepto en un paciente en el que se consideró co-infección. Se alertó a la UCI y al Servicio de Medicina Preventiva, procediéndose a la limpieza terminal de la unidad.

Conclusiones: 1. Instaurado el brote en la UCI, los pacientes de nuevo ingreso, son susceptibles de colonizarse precozmente por la cepa clonal. 2. Son necesarias medidas de descontaminación activa y global de la Unidad para erradicar el brote. 3. Las medidas de vigilancia epidemiológica activa rutinaria y multidisciplinarias, son eficaces para detectar precozmente cepas multirresistentes así como brotes asociados a las mismas.



P14. Detección de carbapenemasas en enterobacterias en la zona este de Málaga.

A. DayaldasaniKhialani*, V. Odero Bernal, MV. García López, L Mora Navas, C. Conejo, E. Clavijo Frutos.

Servicio de Microbiología y Parasitología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Málaga).

Introducción

En los últimos años se ha producido gran preocupación por la dispersión de bacilos gramnegativos resistentes a carbapenémicos, en los que el mecanismo implicado es la producción de β -lactamasas, capaces de hidrolizar este grupo de antibióticos.

Objetivos

Estudio de las carbapenemasas producidas por enterobacterias aisladas durante un periodo de 6 meses en nuestro hospital, así como descripción de sus características clínicas y epidemiológicas.

Material y método

Se estudiaron todas las cepas con sospecha de carbapenemasas con resistencia a ertapenem, aisladas desde enero a julio del 2013 en nuestro hospital. La identificación y estudio de sensibilidad se realizó mediante el sistema MicroScan Walk-Away® (Siemens); para la determinación del fenotipo de carbapenemasas se utilizó el test de Hodge y el estudio genotípico (KPC, OXA-48-like, VIM, IMP y NDM) se llevó a cabo mediante PCR en el Hospital Virgen Macarena de Sevilla.

Resultados

Se estudiaron 13 cepas de 13 pacientes de los cuales el 54% eran hombres, con edad media de 75 años [43-90 años]. El 53,8% de las muestras fueron de origen extrahospitalario. Las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria fueron las más frecuentes (53,8%) seguidas de las nosocomiales (38,5%). El 69,2% de los pacientes eran portadores de sonda urinaria, y la media de índice de Charlson fue de 7,3. El tipo de infección más frecuente fue la cistitis/prostatitis (53,8%), seguida de neumonía (15,4%), y el 38% sepsis. El 92,3% de los pacientes habían recibido antibióticos previamente (β -lactámicos 55% y quinolonas 55%). Se trataron el 61,5%, siendo este tratamiento adecuado en el 50% de los casos. La mortalidad cruda fue del 30,8%.

Las muestras de orina fueron las más frecuentes (46,2%), seguidas de las respiratorias (23,1%), sangre (15,4%), y exudados de herida (15,4%). El germen más frecuentemente aislado fue *K. pneumoniae* (92,3%), mostrando sensibilidad a aminoglucósidos, fosfomicina, imipenem y tigeciclina. Tras el estudio genotípico, el 92,3% de las cepas mostró una carbapenemasa tipo OXA-48 y solo una tipo VIM.

Conclusiones

En nuestra área el germen productor de carbapenemasas más frecuentemente aislado fue *K. pneumoniae*, siendo mayoritariamente el tipo OXA-48.

La mayoría de las infecciones fueron relacionadas con la asistencia sanitaria siendo la cistitis/prostatitis la clínica más frecuente.



P15. Estudio de carbapenemasas por espectrometría de masas en Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*

Yannick Hoyos Mallecot, Carmen Liebana Martos, Jorge Julio Cabrera Alvargonzalez, Ines Perez Zapata, Maria Dolores Rojo Martín, Socorro Yaguez Jimenez, Encarnacion Valverde, Consuelo Miranda Casas, Jose Maria Navarro Marí

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada)

Objetivo

Evaluar un nuevo método para la detección de carbapenemasas mediante espectrometría de masas comparándolo con métodos moleculares de PCR.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 44 cepas clínicas (29 *Pseudomonas aeruginosa* y 15 *Enterobacterias*) categorizadas como no sensibles a ertapenem, imipenem y/o meropenem, aisladas en nuestro laboratorio durante el periodo noviembre 2011 – diciembre 2012. La identificación a nivel de especie y la sensibilidad antibiótica se realizó mediante los sistemas WIDER , Microscan y/o E-test. La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a los criterios del CLSI. La caracterización de carbapenemasas se realizó mediante PCR Multiplex descrita por Mendes et al para los genes *bla* que codifican β -lactamasas de las familias IMP y VIM, y para los genes *bla* KPC se empleo la PCR descrita por Cole et al. Para el estudio de carbapenemasas por MALDI-TOF se siguieron las indicaciones descritas por Sparbier et al. Las cepas se hicieron crecer 18-24h en Mueller-Hinton agar y la cantidad correspondiente a un asa de 1 μ l se incubó en agitación a 37°C durante 4 horas en 50 μ L de una solución de ertapenem 0.25 mg/ml (Invanz, Merck Sharp&Dohme, NJ, USA) diluida en un buffer (20 mM Tris-HCl, 0.01% sodium dodecyl sulfate [SDS], pH 7.0; Sigma- Aldrich). Tras la incubación, los tubos fueron centrifugados 2 min a 12.000 x g, por último se aplico 1 μ l del sobrenadante y 1 μ l de la solución Matriz HCCA sobre la tarjeta. La presencia de carbapenemasas se evidencio por la perdida de los picos moleculares del ertapenem: [M + H] a 476.5 Da, y [M + Na⁺] a 498.5 Da, debido a la hidrólisis del compuesto.

Resultados

De las 44 cepas, 39 (25 *P.aeruginosa* y 14 *Enterobacterias*) fueron catalogadas como no productores de carbapenemasas y 5 (4 *P.aeruginosa* y 1 *E.cloacae*) como productoras de VIM basándonos en los resultados de la PCR. Maldi-TOF detecto las 5 cepas productoras de carbapenemasas. Solo hubo 2 discrepancias entre los dos métodos utilizados, las cuales correspondieron a dos *Pseudomonas aeruginosa* categorizadas mediante PCR como no productoras y como productoras de carbapenemasas por la espectrometría de masas.

Conclusiones

Los resultados están en concordancia con los trabajos publicados, que otorgan una buena fiabilidad del Maldi-TOF para la detección de carbapenemasas. Este método no detecta otros mecanismos de resistencia a carbapenemes como perdida de porinas y/o bombas de eflujo.



P16. Efecto de la coexpresión de diferentes genes *qnr* sobre la sensibilidad a quinolonas en *Escherichia coli*.

J Machuca^{1*}, P Díaz de Alba¹, A Briales², JM Rodríguez-Martínez², A Pascual^{1,2}

¹H. U. Virgen Macarena. UGC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Sevilla ²Dpto. Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

Objetivo: Se han descrito cepas de enterobacterias que expresan varios mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, incluyendo genes *qnr*. No está claro el papel de la convergencia de estos mecanismos y su efecto sobre la resistencia a quinolonas. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la coexpresión de diferentes genes *qnr* sobre la sensibilidad a quinolonas en un modelo en *E. coli*.

Métodos: La cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como fondo genético. El gen *qnrA* se clonó en los vectores pACYC184 y pBK-CMV (estos vectores son compatible en un mismo fondo genético y presentan diferentes marcadores de selección), mientras *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS* se clonaron en el vector pBK-CMV. Mediante electroporación en *E. coli* ATCC 25922 se obtuvieron nuevas cepas portadoras de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* y combinaciones de *qnrA* con el resto de genes *qnr*. También se transformó la cepa ATCC 25922 con los vectores vacíos, tanto por separado como en combinación. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de ciprofloxacino (CIP) se obtuvo mediante microdilución estándar.

Resultados: La CMI a CIP de las diferentes cepas se recoge en la siguiente tabla:

Cepa	CMI de CIP (µl/ml)
ATCC 25922	0,004
ATCC 25922 (pBK-CMV)	0,004
ATCC 25922 (pACYC184)	0,004
ATCC 25922 (pACYC184+pBK-CMV)	0,004
ATCC 25922 pACYC- <i>qnrA</i>	0,125
ATCC 25922 pBK- <i>qnrA</i>	0,125
ATCC 25922 pBK- <i>qnrB</i>	0,125
ATCC 25922 pACYC- <i>qnrA</i> pBK- <i>qnrB</i>	0,125
ATCC 25922 pBK- <i>qnrC</i>	0,064
ATCC 25922 pACYC- <i>qnrA</i> pBK- <i>qnrC</i>	0,125
ATCC 25922 pBK- <i>qnrD</i>	0,032
ATCC 25922 pACYC- <i>qnrA</i> pBK- <i>qnrD</i>	0,125
ATCC 25922 pBK- <i>qnrS</i>	0,125
ATCC 25922 pACYC- <i>qnrA</i> pBK- <i>qnrS</i>	0,125

Conclusiones: La presencia de *qnrA* y otro gen *qnr* no produce efecto aditivo o sinérgico sobre la CMI de CIP. Los genes *qnr*, solos o en combinación producen bajo nivel de resistencia a quinolonas. Estos datos apoyan la limitación de este mecanismo de resistencia para producir resistencia de nivel clínico por sí mismo.



P17. Aportación de Insta Gene™ Matrix en la PCR del laboratorio de Microbiología.

N. Chueca*; R. Camacho; M. Álvarez; V. Guillot; JA Sánchez; C. Pérez; F. García
Hospital Clínico San Cecilio, Servicio de Microbiología, Granada.

Objetivos: En Microbiología molecular clínica se están imponiendo técnicas rápidas para el manejo de las decisiones clínicas. A pesar de que ya existen pruebas de PCR para muestra directa en las que no hay que realizar ningún procesamiento previo, para la mayoría de las determinaciones aun se requiere realizar procedimiento de extracción de ácidos nucleicos. Nosotros nos planteamos emplear “resinas” para minimizar y abaratar el procedimiento de extracción de ADN tanto de células bacterianas como de linfocitos de sangre periférica. La misión de estas resinas sería la de atrapar los cationes divalentes y así las DNAsas presentes en las muestras se inactivan.

Métodos: Se emplearon colonias de bacterias de diferentes especies, grampositivas y gramnegativas, aerobias y anaerobias, para estudio por PCR de genes implicados en resistencias a carbapenemas, así como para amplificación de ADN16S. También se emplearon pellet de linfocitos de sangre periférica (LSP) previamente ficoleados y congelados.

Una colonia/pellet se resuspende en 200 μ l de InstaGene™ Matrix (BioRad), se incuba a 56°C 15 min seguido de 8 min a 99°C. Se centrifuga a 13000 rpm 2 min y el sobrenadante resultante se emplea como ADN diana de las PCR. Para los estudios de comparación de técnicas, la segunda técnica fue QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Resultados: Se realizaron duplicados de las PCR utilizando 15 colonias de diferentes aislados de bacterias gramnegativas para estudio de genes de carbapenemasas y en 15/15(100%) se obtienen idénticos resultados para tiempo-real. 20 colonias de bacterias diferentes de Enterobacteriaceae, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Actinomyces spp*, *Aerococcus spp*, *Ruminococcus spp* se emplean para estudio de PCR universal ADN16S: 25/25 (100%) amplifican y se obtienen secuencias de ADN16S. 4 muestras de colonias se emplean para secuenciación directa de ADN16S por método Sanger y 3n 4/5 obtenemos un fragmento de 500 nucleotidos que se interpretan en BLASTn. 5 muestras de pellet de LSP se tratan con InstaGene™ Matrix para amplificación de la región V3 del gen env del VIH en ADN proviral: 5/5 (100%) se obtiene resultados.

Conclusiones: InstaGene™ Matrix es una herramienta rápida y segura para obtención de ADN de muestras de colonias bacterianas, así como de pellet de LSP, tanto para amplificación como para secuenciación directa.



P18. Cambios en poblaciones bacterianas y colonización de cepas probióticas aisladas de heces de adultos sanos mediante técnicas de pirosecuenciación.

N. Chueca^{1*}; J. Plaza-Díaz²; F. García¹; L. Campaña-Martín²; A. Gil²; L. Fontana²

¹Hospital Clínico San Cecilio, Servicio de Microbiología, Granada. ²Dept. Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad de Granada.

Objetivos: La microbiota intestinal ha comenzado a ser considerada parte importante de la salud humana. Recientemente, se estudió la seguridad de 3 cepas probióticas (*L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 and *L. rhamnosus* CNCM I-4036), en un estudio clínico, doble ciego y aleatorizado en 100 individuos sanos durante 30 días. Se observó que las cepas probióticas no producían ningún malestar, pero después de su administración se modificaban ligeramente las poblaciones bacterianas en las heces de los voluntarios medidas mediante FISH. La administración de *B. breve* CNCM I-4035 resultó en un aumento del contenido de IgA. IL-4 e IL-10 aumentaron, mientras que IL-12 se redujo en el suero de los voluntarios tratados con alguna de las cepas. Se demostró que su consumo era seguro y ejercían efectos inmunomoduladores. El objetivo del presente estudio fue evaluar si existía colonización de las cepas y algún cambio en las poblaciones bacterianas en las heces de los adultos sanos que las consumieron durante 30 días, mediante técnicas de pirosecuenciación.

Métodos: Los pacientes sanos fueron sometidos a un período de lavado de 15 días (t_0), después del cual se dividieron aleatoriamente en 5 grupos que recibieron diariamente: un placebo, una cápsula que contenía una de las 3 cepas o una cápsula que contenía una mezcla de dos cepas durante 30 días (t_1). Seguido por otro período de lavado de 15 días (t_2). Los pacientes no consumieron ningún producto fermentado a lo largo del estudio. La extracción de ADN fue realizada en las heces de los pacientes en los tres tiempos mencionados.

Resultados: Se analizaron las muestras de 23 pacientes que pertenecían a cada uno de los 5 grupos del estudio. Existen algunos cambios en las poblaciones bacterianas de los voluntarios que recibieron las cepas. En general, sobre la abundancia relativa sólo los voluntarios que recibieron *L. rhamnosus* CNCM I-4036 mostraron un aumento en la abundancia relativa de la cepa finalizada la intervención. Además, luego del segundo lavado se observó que la abundancia fue mucho mayor a la del inicio del estudio. Los voluntarios que recibieron *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 y la mezcla no mostraron algún aumento en la presencia de la cepa.

Conclusiones: Se confirmó la colonización de *L. rhamnosus* CNCM I-4036 en los voluntarios estudiados, adjudicando los efectos mencionados a la administración de la cepa.



P19. Evaluación de una técnica de PCR comercial para detección rápida de *Staphylococcus aureus* en exudados nasales

M.L. Serrano, C. Riazzo*, C. Miranda, P. Polo, M.I. de las Heras, E. Martín, J.M. Navarro

Servicio U.G.C.de Microbiología. H. U. Virgen de las Nieves. Granada.

Objetivos:

La colonización asintomática por *S. aureus* (SA) constituye un factor de riesgo para una posterior infección en poblaciones seleccionadas. La detección rápida de SA, principalmente de SA resistente a meticilina (SAMR) es fundamental para el control de la infección nosocomial. El desarrollo de técnicas de PCR a tiempo real permite acortar y simplificar la detección de portadores.

El objetivo del trabajo fue evaluar las características de un método comercial de PCR, GenomEra CDX™ MRSA (Alere Healthcare SLU) para detección rápida de *S. aureus* y SAMR en exudados nasales, comparándolo con el cultivo convencional.

Métodos:

El estudio se llevó a cabo en 109 pacientes de nuestro hospital, entre octubre de 2012 y Mayo de 2013. El exudado nasal se recogió introduciendo una torunda impregnada en solución salina estéril en una coana y después en la contralateral. De cada paciente se recibieron 2 muestras, una en escobillón Copan seco para la técnica de PCR y otra en escobillón Copan con medio de transporte Amies para el cultivo en agar sangre, agar chrom ID MRSA (bioMerieux) y agar manitol salt (Difco), incubándose todos a 35°C durante 48 horas. La identificación y sensibilidad se realizó mediante MicroScan WalkAway (Siemens), Slidex Staph-Kit (bioMerieux) y técnica de difusión con disco de cefoxitina de 30µg, siguiendo las recomendaciones del CLSI. La preparación de la muestra para PCR se realizó con el procedimiento del fabricante para escobillones secos. Tras la preparación, la muestra se carga en un microchip y la detección se realiza en 50 minutos.

Resultados:

Por cultivo se aisló SA en 31 muestras, 24 fueron sensibles a meticilina (SASM) y 7 fueron SARM. GenomERA CDX™ MRSA identificó correctamente los 7 SAMR. De los 24 SASM, 10 los identificó como SASM, 12 como SARM (en estas muestras coexistía SASM con estafilococos coagulasa negativo resistentes a meticilina) y 2 como negativos. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica de GenomERA CDX™ MRSA para SA fue 93%, 92% 82% y 97% y para SAMR 100%, 88%, 36% y 100%.

Conclusiones:

GenomERA CDX™ MRSA es una técnica fácil de realización y adecuada por su sensibilidad y especificidad para la detección rápida de SA en muestras nasales. Su elevada sensibilidad en la detección de SAMR la hace especialmente útil como método de *screening* de este microorganismo lo que permitiría descartar directamente sin cultivo las muestras con resultado negativo.



P20. Determinación de la actividad *in vitro* de la ceftarolina frente a *Staphylococcus aureus* meticilin resistentes.

A. Tenorio-Abreu*, A. Domínguez Castaño, A. Márquez Sanabria, J. Gil Tomás, A. Ávila Alonso, JA Pérez Cáceres, JM Saavedra Martín, A. de la Iglesia Salgado, M. de la Iglesia Salgado.

Unidad de Gestión Clínica Microbiología. Complejo Hospitalario de Huelva.

Introducción

Ceftarolina fosamil es un nuevo antibiótico de última generación del subgrupo de las cefalosporinas aún no comercializado en España. Es el primer beta-lactámico que presenta actividad frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

Objetivo

El objetivo del presente estudio ha sido determinar los valores *in vitro* de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de ceftarolina frente a cepas de SAMR.

Material y métodos

Se trata del primer estudio multicéntrico preclínico realizado en España para la determinación de la actividad *in vitro* de la ceftarolina frente a cepas SAMR. Participaron el Complejo hospitalario de Huelva, Hospital Clínico Universitario de Valladolid y el Hospital Universitario de la Ribera (Alcira-Valencia). La CMI y CMB se determinaron mediante el método de referencia de microdilución en caldo. Los puntos de corte de sensibilidad se consideraron los recomendados por el CLSI (sensible ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, intermedio 2 $\mu\text{g/ml}$ y resistente ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$).

Resultados

Se analizaron un total de 95 cepas de SARM (49 de Huelva, 36 de Valladolid y 10 de Valencia). La sensibilidad bacteriana a ceftarolina reveló una CMI media de 0.343 $\mu\text{g/ml}$ (DE= 0.180), y un rango de entre 0.06 y 1 $\mu\text{g/ml}$. En las 95 cepas analizadas, todos los valores de CMI se encontraron dentro de la categoría de sensible (valor ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$), no detectándose ninguna cepa intermedia ni resistente. Las CMI₅₀ y CMI₉₀ mostraron unos valores medios de 0.25 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. La CMB media fue de 0.502 $\mu\text{g/ml}$ (DE= 0.239), con un rango que osciló entre 0.25 y 1 $\mu\text{g/ml}$.

Conclusión

Ceftarolina muestra una excelente actividad *in vitro* frente a SARM, por lo que podría presentarse como una alternativa prometedora en el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria.



P21. Fenotipos de resistencia a macrólidos y lincosamidas en aislados de *Streptococcus agalactiae*.

Franco-Álvarez de Luna, F., Santos Rosa, C., García Vela, J.H.

Unidad de Microbiología, UGC Laboratorios Clínicos.

Hospital General de Riotinto. Área Sanitaria Norte de Huelva.

Objetivo: *Streptococcus agalactiae* (EGB) es el agente etiológico más prevalente de enfermedad invasiva en el recién nacido (sepsis, neumonía y meningitis), además de tener un papel importante en fiebres puerperales e infecciones del tracto urinario. El objetivo de nuestro trabajo es conocer la resistencia a macrólidos y lincosamidas, en aislados de exudados vagino-rectales y orina de mujeres embarazadas.

Material y Método: Durante un periodo aproximado de año y medio (desde enero de 2012 hasta septiembre de 2013) se aislaron un total de 172 cepas de EGB, 151 (13,5%) en muestras de exudado vagino-rectal y 21 (6,5%) cepas de EGB en muestras de orina. Se realizó estudio de sensibilidad a 56 aislamientos (46 procedentes de exudado vagino-rectal y 10 de orina).

La identificación de los aislamientos, se realizó por métodos bioquímicos y serológicos convencionales, a partir de colonias con morfología característica, beta-hemólisis en agar sangre, y pigmentación característica en medio Granada. En los casos dudosos, se demostró la presencia de antígeno capsular de tipo B (Slide Strepto kit plus, Biomerieux®).

La determinación de fenotipos de resistencia a macrólidos, se realizó mediante el test de inducción con discos de eritromicina (15 mg) y clindamicina (2 mg) separados 20 mm entre sí, en medio de Müller-Hinton sangre.

Resultados: De las 56 cepas a las que se les realizó estudio de sensibilidad, 13 (23%) fueron resistentes a eritromicina y 14 (25%) a clindamicina. Todas las cepas resistentes a eritromicina, presentaron el fenotipo MLSB constitutivo.

Tipo de muestra	N	Sensibles (%)	Resistentes (%)	Fenotipo M	Fenotipo MLSBc	Fenotipo MLSBi
Exudado vagino-rectal	46	38 (82,6)	8 (17,4)	0	8	0
Orina	10	5 (50)	5 (50)	0	5	0

Conclusiones: La tasa de resistencia a macrólidos de *S. agalactiae* aislados de muestras de orina y exudado vagino-rectal de mujeres gestantes fue del (23,21%).

El Fenotipo de resistencia predominante es el fenotipo MLSBc, no detectándose los Fenotipos M y Fenotipos MLSBi.

Nos parece importante hacer estudios periódicos del estado de resistencia a macrólidos en *S. agalactiae* para detectar cambios en la evolución de la misma.



P22. Sepsis por *Streptococcus equi*: diagnóstico rápido mediante MALDI-TOF directo del hemocultivo positivo

F. Galán-Sánchez, I. Guerrero-Lozano, N. Caro-Gómez*, A. García-Tapia, P. Marín-Casanova, C. Fernández-Gutiérrez, P. García-Martos y M.A. Rodríguez-Iglesias.

UGC de Microbiología, *UGC de Medicina Interna. Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Objetivo

Describir un caso de sepsis diagnosticado en 16 horas mediante MALDI-TOF directo de los hemocultivos positivos.

Caso clínico

Varón de 65 años, intervenido en Mayo de 2013 de sustitución valvular mitral y aórtica con prótesis mecánica. Al ingreso presentaba fiebre acompañada de escalofríos. El paciente refiere estar en una romería el día previo a la aparición de los síntomas, en la cual había numerosos caballos, aunque no tuvo contacto directo con ellos, ni ingirió leche no pasteurizada.

En urgencias se extrajeron dos series de hemocultivos, antes del inicio de la antibioterapia. Posteriormente, y por presentar también clínica de meningitis, se realizó punción lumbar en la que se obtuvo un LCR con bioquímica compatible de meningitis bacteriana. Se inició tratamiento empírico con ampicilina, vancomicina y ceftriaxona. El cultivo y las tinciones de Gram y Naranja de Acridina en el LCR fueron negativos. Sin embargo, los 4 frascos de hemocultivo, resultaron positivos antes de las 10 horas de incubación. Al Gram se observaron pequeños cocos gram positivos, redondos, en cadenas cortas e incluso pequeños racimos. Se realizó técnica de MALDI-TOF directa simplificada a los frascos. El resultado fue *S. equi* subsp. *zoepidemicus*. Con el resultado del hemocultivo positivo para *Streptococcus equi*, se modificó a bencil penicilina durante cuatro semanas, con evolución favorable y sin secuelas neurológicas. A las 24h crecieron colonias grandes muy mucosas, catalasa negativa, con una gran beta-hemólisis en agar sangre y que aglutinaron al grupo C. Presentó sensibilidad in vitro a penicilina, ampicilina, cefotaxima, eritromicina, levofloxacin, meropenem y vancomicina; y resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol, clindamicina y tetraciclina.

Se les realizó API 20 Strep (bioMérieux) que identificó también como *S. equi* subsp. *zoepidemicus*. Para su completa caracterización el gen ARNr 16s fue amplificado usando una PCR convencional. La secuencia analizada obtuvo un porcentaje de similitud del 99% con *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum*, subespecie muy similar a *zoepidemicus*.

La extracción inmediata de hemocultivos al ingreso, resultó imprescindible en el diagnóstico y debe ser pues una práctica habitual ante una clínica de meningitis.

Aunque el hallazgo de *S. equi* en el hombre es excepcional, cuando se trata de infecciones invasivas es necesario realizar un diagnóstico diferencial, y el uso de MALDI-TOF directo del hemocultivo positivo es un método excelente y rápido para su identificación.



P23. Sensibilidad de aislados de *S. pneumoniae* en muestras de origen respiratorio en el año 2012.

Sena Corrales. G*; Odero Bernal. V; Ortega Torres. M; Vicina Ramos. I, Mora Navas. L; Clavijo Frutos. E.
Servicio de Microbiología Y Parasitología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Málaga.

Introducción/Objetivos:

S. pneumoniae es el agente causal más frecuente de NAC, con una prevalencia del 20%-65% y de hasta el 35% de los casos de NAC que requieren hospitalización. Se considera sensible a antibióticos pero se han publicado cepas con resistencia moderada-elevada.

Objetivo: describir la sensibilidad de neumococos aislados de muestras respiratorias en pacientes hospitalizados y ambulatorios.

Material y Métodos:

Estudio retrospectivo de cepas de *S. pneumoniae* procedentes de muestras respiratorias aisladas del 1 de enero-31 de diciembre del 2012 en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Málaga). Cultivo e identificación de *S. pneumoniae*: se utilizaron los medios y métodos habituales. Se testó la sensibilidad a penicilina y ciprofloxacino mediante tiras E-test (Biomérieux®); eritromicina, clindamicina, y trimetoprim/sulfametoxazol mediante discos de sensibilidad (Becton Dickinson®) según los criterios del CLSI. Para el estudio de resistencia a macrólidos y lincosamidas realizamos el ensayo de inhibición por doble disco difusión en agar (D-Test).

Resultados:

Se aislaron 51 cepas de *S. pneumoniae*: 24(47,05%) muestras de esputo, 21(41,18%) broncoaspirado y 6(11,76%) exudado ótico pertenecientes a 49 pacientes: 32(65,30%) hombres. Edad media: 51 años. Fueron de origen extrahospitalario 28(54,90%) aislamientos y 23(45,10%) de origen intrahospitalario. Rango CMI: Penicilina [$<0,016-8$], Ciprofloxacino [0,125-4]. CMI₅₀₋₉₀ Penicilina: [0,032-0,75], CMI₅₀₋₉₀ Ciprofloxacino: [1-2].

Sensibilidad antimicrobiana: 50(98,04%) sensibles a penicilina, 50(98,04%) ciprofloxacino, 42(82,35%) clindamicina, 35(68,62%) eritromicina y 32(62,74%) trimetoprim/sulfametoxazol.

Resistencia cepas extrahospitalarias: penicilina: 1(1,96%), ciprofloxacino: 1(1,96%), clindamicina: 7(77,7%), eritromicina: 9(56,25%) y trimetoprim/sulfametoxazol: 12(63,15%).

Resistencia cepas intrahospitalarias: clindamicina: 2(22,3%) eritromicina: 7(43,75%) y Trimetoprim/Sulfametoxazol: 7(36,84%). Resultados del estudio D-test: 9 aislamientos fenotipo cMLS_B, 7 fenotipo MS_B y ninguno fenotipo iMLS_B.

Conclusiones:

Penicilina y quinolonas son los antibióticos con mayor actividad frente a *S. pneumoniae*. Encontramos un mayor porcentaje de resistencia a eritromicina, clindamicina y trimetoprim/sulfametoxazol en cepas de origen ambulatorio en comparación con cepas intrahospitalarias. En cuanto a la resistencia a macrólidos y clindamicina no se observó ninguna cepa con el fenotipo iMLS_B.



P24. *Lactococcus garviae*: como sospechar este microorganismo ante aislamientos atípicos de *Enterococcus faecium*

F. Galán-Sánchez, I. Guerrero-Lozano, A. García-Tapia, M. Rodríguez Iglesias.

UGC Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

Objetivo: El género *Lactococcus* fue separado del género *Streptococcus* en 1985, pero a menudo se identifica erróneamente como una variante de *Enterococcus spp.* *Lactococcus garviae* se considera un patógeno oportunista humano que causa principalmente endocarditis. Nuestro objetivo es describir las características *L. garviae*, en dos aislamientos clínicos, especialmente aquellas que permitan sospechar esta especie ante aislamientos atípicos de *Enterococcus faecium*.

Métodos: Las dos cepas se aislaron de muestras de orina, la cepa 1 de un paciente varón con sintomatología urinaria y en recuento de incontables UFC/ml, y la cepa 2 de una mujer con síntomas de cistitis y en recuento de 5.000 UFC/ml. La identificación inicial y la sensibilidad antimicrobiana se realizaron mediante el sistema automatizado Wider (Soria Melguizo). Para la identificación definitiva se utilizó el sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Soria Melguizo) y la secuenciación del gen del ARNr16S.

Resultados: Ambas cepas crecieron en agar CLED y agar sangre a las 24 horas de incubación en atmósfera ambiente, con una morfología muy similar a la de *Enterococcus spp* (colonias transparentes en agar CLED y grises y no hemolíticas en agar sangre). Fueron identificadas por el sistema Wider como *Enterococcus faecium* con un 97.6% de probabilidad, siendo la no fermentación de la arabinosa la única diferencia con el perfil bioquímico tipo. Ambas cepas fueron resistentes a quinupristina/ dalfopristina (CMI>2) y sensibles a penicilina y ampicilina (perfil atípico en *E.faecium*). Ante estos hallazgos se procedió a su procesamiento mediante MALDI-TOF, identificándose los dos aislados como *Lactococcus garviae*, resultados confirmados posteriormente por secuenciación.

Conclusiones: La diferenciación entre *Enterococcus* y *Lactococcus* es difícil, debido a la similitud de sus características morfológicas en cultivo y de sus perfiles bioquímicos. La no fermentación de la arabinosa en un aislamiento de *E.faecium*, unido a un perfil de sensibilidad atípico debe hacernos sospechar de la presencia de una cepa de *Lactococcus garviae*. El sistema MALDI-TOF es una herramienta útil para identificar este patógeno.



P25. Evaluación de un nuevo inmunoensayo monoclonal por quimioluminiscencia en muestras de heces para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*

J. Vargas Romero^{1*}, M. López Sánchez¹, M. Pabón², E. Lamas², M. Parra¹, M. Castro Fernández² y E. Martín Mazuelos¹

¹Unidad de enfermedades infecciosas y microbiología. ²Unidad de enfermedades digestivas. Hospital Universitario de Valme. Sevilla.

Objetivo: La prueba del aliento con ¹³C-urea (UBT) es el mejor método no invasivo para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* pero alternativamente puede ser usada una prueba de antígeno fecal (SAT). Nuestro objetivo ha sido evaluar el nuevo test LIAISON[®] *H. pylori* SA (DiaSorin, Italia) en heces y también su correlación con la prueba Rapid Hp StAR test (Oxoid Ltd, UK). Se utilizó el UBT (UBtest 100 mg, Otsuka Pharmaceutical, UK) como “gold standard”.

Métodos: Hemos realizado un estudio prospectivo con 144 pacientes dispépticos (86 mujeres y 58 hombres, 18-78 años, mediana 41 años). El estado de infección se basó en el UBT (se consideró positivo un Delta Over Baseline (DOB) ≥ 2.5). Se recogieron muestras fecales, una por paciente, y dos SATs monoclonales fueron determinados: El LIAISON[®] *H. pylori* SA, un nuevo test automatizado de quimioluminiscencia (CLIA) para la determinación de antígeno de *H. pylori* en heces (se consideró positivo un índice ≥ 1.0) y el Rapid Hp StAR, que es un test inmunocromatográfico (IC) con lectura visual. Asimismo se extrajo sangre para estudio de anticuerpos IgG en suero mediante VIR-ELISA anti-HP IgG (Viro-Immun, Germany). El análisis estadístico se realizó con el software SPSS v19 y el acuerdo entre pruebas mediante Kappa de Cohen.

Resultados: De los 144 pacientes, el UBT fue positivo en 72 casos (50%): de éstos el CLIA fue positivo en 54 y la IC en 53. En los 72 casos con UBT negativo: 5 pacientes tuvieron los dos SAT positivos, 1 fue positivo sólo por CLIA y 2 fueron positivos sólo por IC. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para CLIA e IC fueron 75%, 91.7%, 90%, 78.6%, y 73.6%, 91.7%, 89.8%, 77.6% respectivamente. La concordancia del CLIA con UBT fue del 83.3% (kappa 0.67), con 24 discordancias (18 con UBT + y 6 con UBT-). En los 18 UBT+: los DOB oscilaron entre 2.5-12 y los anticuerpos IgG fueron negativos en 8 casos. La comparación entre los dos SATs demostró una concordancia del 94.4% (Kappa 0.89), con sólo 8 discordantes. En 5 casos la IC fue positivo débil.

Conclusiones: LIAISON[®] *H. pylori* SA test es útil para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Ambos SATs muestran muy buena concordancia pero el CLIA ofrece una interpretación más objetiva y por su automatización es mejor para los laboratorios que procesan un mayor número de muestras. La sensibilidad observada (75%) nos lleva a una evaluación individual de los casos discordantes entre SATs y UBT.



P26. Relación entre el dolor abdominal en Atención Primaria y la presencia de *Helicobacter pylori* y parásitos en heces

V Heras*, I Pérez, C Rizzo, E Cuadros, D Sánchez, J Gutiérrez, JM Navarro.

Servicios de Microbiología y Digestivo, H.U. Virgen de las Nieves. Granada

Objetivo: Conocer la prevalencia de la infección por *H. pylori* y parásitos intestinales en muestras de heces procedentes de sujetos atendidos en atención primaria con dolor abdominal.

Material Y Metodo: Entre septiembre de 2010 y agosto de 2013 se analizaron un total de 1240 muestras para el estudio de infección de *H. pylori* y 2503 para la investigación de parásitos. El diagnóstico de *H. pylori* se llevó a cabo mediante la detección de antígenos en heces (*H. pylori* Card Letitest) por inmunocromatografía. El estudio de parásitos intestinales se hizo mediante visualización en fresco del concentrado, y además se investigaron los antígenos de *Giardia* y *Cryptosporidium* por inmunocromatografía (CerTest *Crypto/Giardia* Card) en 607 heces que no fueron duras o en pacientes VIH +. En caso de reacción positiva para *Cryptosporidium*, éste se visualizó mediante tinción de ácido alcohol resistencia parcial.

Resultados:

El	Períodos	<i>H.pylori</i>				Parásitos					
		(+)	%	(-)	%	N	(+)	%	(-)	%	N
	1/9/10 – 31/12/10	27	29.35%	65	70.65%	92	9	3.4%	257	96.6%	266
	1/1/11 – 31/12/11	52	15.85%	276	84.15%	328	39	4.98%	743	95.02%	782
	1/1/12 – 31/12/12	88	20.37%	344	79.63%	432	33	3.8%	834	96.2%	867
	1/1/13 – 31/8/13	59	15.2%	329	84.8%	388	34	5.8%	554	94.2%	588
		226	22.3%	1014	77.3%	1240	115	4.6%	2388	95.5%	2503

parásito intestinal más común en nuestro medio fue *G.lambliia* (54.8%), seguido de *B.hominis* (18.2%), *C.parvum* (11.3%), *A.lumbricoides* (6.9%), *E.vermicularis* (4.3%), *S.stercolaris* (1.7%), *T.trichura*, *H.nana* y las uncinarias (0.9%). De las muestras en las que se estudió el antígeno de *Giardia* (607), los resultados fueron: antígeno y fresco positivo en 35; antígeno y fresco negativo en 556; en 15 casos solo se detectó el antígeno en heces; y en 1 el antígeno fue negativo y el fresco positivo. Respecto a *C.parvum*, el antígeno y la tinción fueron positivas en 8; en 5 muestras solo se detectó el antígeno; no hubo casos de antígeno negativo y observación microscópica positiva. No se observó ninguna situación en la que los antígenos fueran positivos en presencia de otro parásito.

Conclusion: *H. pylori* y la parasitosis intestinal pueden justificar la sintomatología de dolor abdominal en nuestro medio, siendo más relevante la infección por el primero.



P27. Estudio descriptivo de sensibilidad de cepas de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* mediante difusión con disco

I. Pérez Zapata, C. Liébana Martos, E. Cuadros Moronta, I. Sampedro de la Torre, J. Gutiérrez Fdez., J.M. Navarro Marí. Servicio de Microbiología HVN, Granada.

Introducción/Objetivos: *Campylobacter spp.* es uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis bacteriana. La especie fundamentalmente implicada es *C. jejuni*, seguido por *C. coli*. La mayoría de estas infecciones son leves y autolimitadas, pero en algunos casos como inmunodeprimidos o de enfermedad grave puede requerir tratamiento antibiótico. El objetivo de este trabajo es conocer los patrones de sensibilidad a antibióticos de las cepas de *Campylobacter sp.* aisladas en nuestro laboratorio.

Métodos: Se recogieron 100 cepas de *Campylobacter sp.* aisladas en muestras heces recibidas durante el año 2012 en el laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. La identificación se realizó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS, Bruker Diagnostic®) y se confirmó mediante tinción de gram y las pruebas bioquímicas de oxidasa e hidrólisis del hipurato. La sensibilidad frente a antimicrobianos se estudió mediante la técnica de difusión con disco-placa en agar Müller-Hinton sangre (BD®) incubado a 42°C en atmósfera de microaerofilia, utilizando discos de eritromicina (15 µg), ciprofloxacino (5 µg) y tetraciclina (30 µg) (BD®). Los puntos de corte utilizados para la interpretación de los resultados fueron los del CLSI, EUCAST y los propuestos por Gaudreau et al. (2007) para eritromicina y ciprofloxacino, mientras que para tetraciclina se utilizó el punto de EUCAST y los propuestos por Gaudreau et al. (2008).

Resultados: Se obtuvieron 86 *C. jejuni* y 14 *C. coli*. La siguiente tabla recoge las tasas de resistencias encontradas según cada uno de los puntos de corte considerados:

	Eritromicina			Ciprofloxacino			Tetraciclina		
	CLSI ¹	EUCAST ²	Gaudreau ³	CLSI	EUCAST	Gaudreau	CLSI	EUCAST	Gaudreau
<i>C. jejuni</i> (n=86)	3%	3%	3%	63%	87%	87%	-	90%	87%
<i>C. coli</i> (n=14)	21%	21%	21%	86%	100%	100%	-	93%	93%
<i>Campylobacter spp.</i> (n=100)	6%	6%	6%	66%	89%	89%	-	90%	88%

¹ CLSI, 2010

² EUCAST, 2013

³ Gaudreau C, et al. Antimicrob. Agents Ch.2007; 51: 1524–6. 2008; 52: 4475–7.

Conclusiones: Dada la mayor tasa de aislamientos de *C. jejuni* y su bajo nivel de resistencia, el tratamiento empírico con eritromicina seguiría siendo el recomendado. En caso de identificarse *C. coli* se recomendaría el tratamiento según antibiograma, ya que se muestra más resistente frente a los antimicrobianos coincidiendo con lo descrito en la bibliografía.



P28. Actividad de los antibióticos de segunda línea en el tratamiento de la infección por *Campylobacter coli*

Ana Ruiz, María José Artacho, María José Torres y Javier Aznar

Servicio de Microbiología – UCEIM - Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla)

Objetivos

Dadas las altas tasas de resistencia a ciprofloxacino y eritromicina, tratamientos habituales de la infección por *Campylobacter coli*, es necesario estudiar la actividad de antibióticos alternativos frente a este microorganismo. Además, se han comparado los perfiles de resistencia entre las cepas sensibles y resistentes a eritromicina.

Material y Métodos

Se estudiaron 43 aislamientos clínicos provenientes de episodios de enteritis por *C. coli*. La identificación de los aislamientos se realizó por espectrometría de masas (Buker) y negatividad en la prueba de hidrólisis del hipurato. El estudio de sensibilidad antibiótica se realizó por Epsilon-test en placas de Mueller Hinton con sangre. Los antibióticos probados fueron: ciprofloxacino, eritromicina, amoxicilina-clavulánico, tetraciclina, tobramicina, clindamicina e imipenem. La interpretación se realizó en base a los criterios de la SFM (Sociedad Francesa de Microbiología) para ciprofloxacino, eritromicina, amoxicilina-clavulánico, tetraciclina y tobramicina. Para imipenem la interpretación se basó en los puntos de corte para “especies no relacionadas” y para clindamicina los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF), definidos por EUCAST.

Resultados

Un 49% (21) de los aislamientos fueron sensibles a eritromicina y un 2% (1) a ciprofloxacino. Los resultados de sensibilidad obtenidos para el resto de los antibióticos probados fueron los siguientes: 21% de sensibilidad (9 cepas) a tetraciclina; 67% (29 cepas) en el caso de tobramicina; 54% (23 cepas) para amoxicilina-clavulánico; 84% (36 cepas) para clindamicina y encontramos un 100% (43 cepas) de actividad en el caso de imipenem. En el subgrupo de aislamientos no sensibles a eritromicina, los porcentajes de resistencia antibiótica son mayores que entre las cepas sensibles. Estas diferencias pueden observarse con tobramicina, clindamicina y amoxicilina-clavulánico. En el primer grupo imipenem es el único antibiótico con actividad frente a todas las cepas.

Conclusiones

En base a los perfiles de sensibilidad obtenidos, el tratamiento de la infección por *C. coli* debería ser planteado en base al antibiograma. En los casos de cepas resistentes a eritromicina, clindamicina (84% de cepas sensibles) sería una alternativa adecuada en los casos de enteritis. En caso de infección extraintestinal, imipenem, (100% de sensibilidad) y/o tobramicina (67% de sensibilidad) serían los antibióticos con mejor actividad.



P29. Evaluación de la sensibilidad antimicrobiana de *Neisseria gonorrhoeae*.

Redero* MM., Martín-Gutiérrez G., Vidal R; Cantos A.; Aznar J. Servicio de Microbiología-UCEIMP. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Introducción

El progresivo aumento de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae*, unido a la disminución de las sensibilidades antibióticas y la disminución de la actividad de cefalosporinas de tercera generación, hacen de la infección gonocócica un problema de salud pública.

Objetivo

Analizar la evolución de las sensibilidades antimicrobianas que presentó *Neisseria gonorrhoeae* en el período comprendido entre enero de 2010 y agosto de 2013 en el H.U. Virgen del Rocío.

Material y Métodos

El estudio incluyó 88 cepas de *N. gonorrhoeae* entre enero 2010 y agosto de 2013. Las cepas se aislaron en agar Thayer-Martin; se identificaron mediante paneles HNID de Microscan® y/o espectrometría de masas (MALDI-TOF) y se estudió la sensibilidad antibiótica mediante los métodos disco-placa y E-Test® e interpretados según criterios CLSI. Se determinó la CMI por E-Test® a 46 cepas. Los datos se registraron y analizaron mediante programa OMNIUM®.

Resultados

- En el 2010 se aislaron 10 cepas, y han ido ascendiendo a 23 en 2011, 31 en 2012 y 24 hasta agosto de 2013. De los 88 de aislados de *N. gonorrhoeae*, 72 se obtuvieron en exudados uretrales, 7 en exudados anales, y 2 en exudados endocervicales.

- En este estudio las cepas de *N. gonorrhoeae* presentaron el siguiente patrón de sensibilidades antimicrobianas:

	% S	CMI50	CMI90
Penicilina	20,45%	0,38	1,8
Ciprofloxacino	34%	8	32
Ceftriaxona	100%	0,028	0,094
Espectinomicina	100%	12	16

- 4 cepas (8.7%) presentaron una "CMI elevada" a ceftriaxona (CMI de 0.125mg/L) .

Conclusiones

En los últimos 3 años los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* han aumentado considerablemente en nuestra área. Ha disminuido la sensibilidad a penicilina, y ciprofloxacino. Todas las cepas son sensibles a ceftriaxona y espectinomicina, y un 8.7% presentan CMI elevada a ceftriaxona.

Es muy importante incrementar y mejorar los sistemas de vigilancia de resistencias antimicrobianas y la detección de cepas con sensibilidad disminuida a cefalosporinas.



P30. Es necesario realizar un cribado de *Chlamydia trachomatis* en pacientes con infección VIH con prácticas homosexuales ?

J.M. Gallegos, I. Pérez, MV García, R Palacios, J Santos, M Ortega, MV Odero, G Sena, E Clavijo.

Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Hospital Virgen de la Victoria, Málaga.

Antecedentes: La infección por *Chlamydia trachomatis* (CT)) es frecuentemente asintomática, y se ha descrito una elevada prevalencia en pacientes con infección con el VIH.

Objetivos: Conocer la prevalencia de infección asintomática por CT y cuál es la muestra más idónea para su diagnóstico, en pacientes varones homosexuales (HMX) con infección VIH que acuden a consulta rutinaria de control.

Método: Estudio transversal de prevalencia de una cohorte consecutiva de pacientes asintomáticos con infección por VIH en seguimiento ambulatorio habitual entre Octubre de 2012 y Julio de 2013. A todos se les realizó triple toma (faríngea, rectal y urinaria). Las muestras rectal y faríngea se recogieron con torundas específicas y la muestra de orina se recogió en un contenedor estéril estándar. El estudio microbiológico se realizó con la técnica de amplificación de ácidos nucleídos a tiempo real para detección de CT y *Neisseria gonorrhoeae* (NG) (Sistema COBAS c4800 CT/NG. Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La prueba utiliza la amplificación del fragmento de ADN objetivo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, usando sondas con marcadores fluorescentes que permiten detectar la acumulación de productos de PCR mediante la supervisión de la señal de fluorescencia emitida durante el proceso de la amplificación.

Resultados: De los 211 pacientes a los que se les propuso la realización del cribado, 209 aceptaron participar. De estos, 15 (7.2%) presentaron un resultado positivo para CT. Doce (80%) con muestra rectal positiva, uno (6,7%) con muestras rectal y faríngea positivas, uno (6,7%) con muestra rectal y de orina positiva y un paciente (6,7%) con solamente muestra de orina positiva. La infección asintomática por NG fue del 1.5%.

Conclusiones: La prevalencia de infección asintomática de *Chlamydia trachomatis* en varones homosexuales VIH en nuestro medio es del 7,2%. El cribado en pacientes asintomáticos podría estar justificado en esta población. La muestra más idónea para diagnóstico es el exudado rectal.



P31. Detección de linfogranuloma venéreo (LGV) en exudados rectales de pacientes atendidos en el Centro de Infecciones de Transmisión Sexual de Sevilla mediante PCR a tiempo real.

Parra-Sánchez M¹, Palomares JC¹, Bernal S¹, Sivianes N¹, Pérez L¹, Pueyo I², Martín-Mazuelos E¹.

1. Laboratorio de Microbiología Molecular. Unidad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Hospital Universitario de Valme (Sevilla).
2. Centro de Infecciones de Transmisión Sexual de Sevilla (CITS).

Objetivos:

El LGV es causado por las serovariedades L1, L2 y L3 de *Chlamydia trachomatis* (CT). Estudios recientes han documentado una proporción significativa de infecciones asintomáticas en HSH y mujeres que pueden persistir durante semanas. Por el interés epidemiológico y clínico de esta enfermedad (duración tratamiento más prolongado), se ha iniciado la puesta a punto de la técnica de detección de LGV mediante PCR a tiempo real (RT-PCR).

Pacientes y métodos:

Durante el periodo comprendido entre el 1/1/2013 y el 30/6/2013 se han analizado un total de 2096 muestras de pacientes atendidos en el CITS de Sevilla. La distribución de las muestras fue: orinas (50%), exudados cervicales (30,6%), rectales (15,8%) y faríngeos (3,6%). La población era mayoritariamente masculina (67,3%) y la mediana de edad 29 años [Q1-Q3: 24-37]. Las muestras fueron analizadas con el kit Cobas CT/NG (Roche) en el equipo cobas 4800. En las muestras rectales CT positivas con sospecha de LGV se realizó la detección de las serovariedades L mediante el protocolo descrito por Rodríguez-Domínguez (CMI, 2013) en el equipo LightCycler 480 (Roche).

Resultados:

Un total de 128 muestras (9,5%) resultaron positivas para CT. De ellas, 28 (21,9%) eran exudados rectales. Nueve de estas muestras fueron reanalizadas para la detección de serovariedades L de CT por alta sospecha clínica de LGV. Tres de ellas (33%) resultaron positivas para LGV.

Conclusiones:

1. La técnica de detección de LGV ha permitido la confirmación de 3 casos de LGV en los 6 meses de estudio.
2. Ante la sospecha clínica y cuando la detección de CT sea positiva, creemos necesario que se realice la detección de las serovariedades L de CT por las implicaciones epidemiológicas y la necesidad de prolongar el tratamiento.
3. Sería necesario extender este estudio al resto de muestras para conocer la prevalencia real de LGV en la población de riesgo, incidiendo en los casos asintomáticos.



P32. ¿Es responsable el cambio de estrategia de cribado de Sífilis del aumento de incidencia?

P. Cantudo Muñoz*, C. Amores Antequera, Laura Gómez Fernández
Hospital S. Agustín. Linares

Objetivo: Desde Abril de 2012 el diagnóstico de Sífilis se realiza mediante detección de anticuerpos treponémicos confirmando los positivos con prueba no treponémica. Anteriormente la estrategia era realizar técnica no treponémica como prueba de cribado y confirmación con prueba treponémica. Observamos que durante el año 2012 el número de positivos se ha incrementado con respecto a años anteriores. Nos planteamos comparar los positivos del año 2012 con los obtenidos en años anteriores tratando de establecer si este incremento es debido a un aumento en la incidencia o al cambio de estrategia.

Métodos: Estudio retrospectivo de pacientes con serología positiva a Sífilis desde el año 2008 hasta 2012. Los pacientes proceden tanto de atención primaria (AP) como especializada.

A los sueros remitidos desde 2008 hasta Marzo de 2012 se les realizó RPR (Cromatest. Linear Chemical) con confirmación de los positivos con TPPA (Syphilis Fast. Dienes diagnóstica). Cuando el diagnóstico era compatible con sífilis terciaria se realizaba TPPA aunque el RPR fuera negativo. Se consideró caso positivo: a)pacientes con RPR+ y TPPA+ y b)pacientes con RPR- y TPPA+. Desde Abril de 2012 el cribado se realiza con prueba treponémica automatizada (CMIA. Architect Abbott) confirmando los positivos con RPR ó TPPA. Se consideró caso positivo: a)pacientes con CMIA+ y RPR+ y b)pacientes con CMIA+/RPR-/TPPA+. Se han considerado sólo los pacientes con nuevos diagnósticos de Sífilis.

Resultados: -En 2008 hubo 7 pacientes positivos de 2.400 (0,3%). 57% hombres.

-En 2009 hubo 7 pacientes positivos de 2.338 (0,3%). 57% hombres.

-En 2010 hubo 4 pacientes positivos de 2.409 (0,2%). 50% hombres

-En 2011 hubo 8 pacientes positivos de 2.240, (0,36%).75% hombres

-En 2012 hubo 20 pacientes positivos de 2.089 (0,95%). 80% hombres. (5 con protocolo antiguo y 15 con protocolo nuevo). La procedencia fue: AP(13); M. Interna(3); Oftalmología(1); Dermatología(1); Urología(1); Urgencias(1). Los diagnósticos fueron: sospecha de lúes o ETS(12); deterioro cognitivo(2); uveítis(1); Fiebre(2); Gestante(1); No informado(2)

De los 15 pacientes positivos con protocolo nuevo, 5 fueron RPR negativos y ninguno de ellos tenía diagnóstico de Sífilis o compatible con Sífilis terciaria por lo que se nos hubieran escapado con el protocolo antiguo. Los otros 10 pacientes también los hubiéramos detectado con el protocolo antiguo (0,72%).

Conclusiones: En 2012 el número de diagnósticos de Sífilis se ha triplicado respecto a años anteriores. El cambio de estrategia podría explicar en parte este aumento, aunque creemos que no del todo, ya que, eliminando aquellos pacientes que se nos hubieran escapado con el protocolo anterior, la incidencia se habría duplicado respecto a años anteriores. Los nuevos diagnósticos se han producido mayoritariamente en hombres, procedentes de AP con sospecha de Sífilis o ETS.



P33. Incidencia de sífilis en el Área Hospitalaria JR Jiménez (2002-2013)

A Domínguez*, A Márquez, J Fernández-Liger, J Saavedra, A Tenorio, M Iglesia.
UGC Microbiología. CH Huelva

Introducción/Objetivos:

Desde comienzos de la pasada década estamos asistiendo a un incremento de las infecciones de transmisión sexual (ITS). La sífilis es una enfermedad sistémica compleja causada por la espiroqueta *Treponema pallidum*, subespecie *pallidum*. Se diagnostican 12 millones de casos nuevos al año en el mundo. Nos planteamos conocer la evolución de los casos de esta enfermedad diagnosticados en el Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva en los últimos doce años.

Método:

Estudio retrospectivo y descriptivo de las muestras de pacientes con sospecha clínica de sífilis mediante la realización de RPR (BioSystem) y enzimoimmunoanálisis (IgG e IgM) (Diesse) desde agosto 2002 a septiembre 2013.

Resultados:

En el periodo de tiempo estudiado el número total de casos de sífilis es de 192, distribuidos por año: 5 (2002), 6 (2003), 7 (2004), 8 (2005), 13 (2006), 14 (2007), 18 (2008), 26 (2009), 26 (2010), 18 (2011), 16 (2012) y 35 (2013). Presentan coinfección VIH un 23,1 % de pacientes (periodo 2002-2005), 14,2 % (periodo 2006-2009) y 10,5% (periodo 2010-2013). Sin embargo, en los dos últimos años (2012-2013) es del 19,6%. En cuanto al sexo, el porcentaje de mujeres infectadas es de 30,8% (periodo 2002-2005), 19,4% (periodo 2006-2009) y 26,3% (periodo 2010-2013). Con respecto a la edad no se aprecian diferencias en los periodos estudiados, siendo la media de 34 años. De los casos diagnosticados un 15,4% corresponden a extranjeros en el primer periodo, un 20,9% en el segundo y un 22,1% en el tercer periodo.

Conclusiones:

- Seguimos detectando aumento del número de casos en el último periodo analizado (2010-2013) en comparación con los anteriores.
- Aunque el porcentaje de pacientes coinfectados con VIH sigue disminuyendo en el último periodo, se ha producido un incremento en los dos últimos años.
- La infección sigue siendo más frecuente en hombres, apreciándose un discreto aumento en extranjeros.



P34. A propósito de un caso de *Myroides odoratus*

V. Odero Bernal, A. Dayaldasani Khialani*, L. Mora Navas, G. Sena Corrales, V. García López, I. Viciano Ramos, E. Clavijo Frutos.

Servicio de Microbiología y Parasitología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Málaga).

Introducción

Myroides odoratus, conocido anteriormente como *Flavobacterium odoratum* es un bacilo gramnegativo, no fermentador, aerobio estricto y de pigmentación amarilla que presenta un característico olor afrutado. No suele considerarse patógeno, y raramente produce infección clínica, aunque se ha aislado en muestras de orina, sangre, exudados de herida y secreciones respiratorias tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos.

Caso Clínico

Varón de 82 años con antecedentes de hipertensión, diabetes mellitus II, hiperuricemia, valvuloplastia mitral, aórtica y tricuspídea, insuficiencia cardiaca congestiva e hipertrofia benigna de próstata que ingresa por alteración de consciencia, disartria, empeoramiento del estado general, de un mes de evolución, con aumento de su disnea y ortopnea habitual. Tras las pruebas complementarias se observaron signos de fracaso cardíaco. La analítica mostró alteraciones de coagulación, gasometría y hemograma, observándose valores de LDH 236 UI/L y PCR 157,12 mg/L indicativo de posible sepsis bacteriana. Se extrajeron hemocultivos y realizó antigenuria de *Legionella* y *Pneumococcus* tras su ingreso en la Unidad de Medicina Interna, siendo éstas negativas. Los hemocultivos fueron incubados en el sistema BacT/Alert 3D (Biomérieux®), siendo positivos a los 3 días de incubación. La tinción de gram directa de los frascos de hemocultivos, mostró bacilos gramnegativos. La muestra se sembró en agar sangre y chocolate en CO₂ y MacConkey en aerobiosis a 37°C. Tras 24 horas de incubación en medios de agar sangre y chocolate se observó crecimiento de colonias con pigmento amarillento y característico olor afrutado; en agar MacConkey apenas hubo crecimiento. Se realizó la identificación de la especie bacteriana mediante el sistema automatizado MicroScan Walkaway® (Siemens) cuyo resultado fue *Myroides* spp. Se realizaron pruebas bioquímicas manuales siendo la especie bacteriana no fermentadora de azúcares, urea positivo, indol negativo y oxidasa positivo. El microorganismo fue identificado como *Myroides odoratus*. En el estudio de sensibilidad, la cepa fue resistente a betalactámicos y aminoglucósidos, y sensible a carbapenémicos, quinolonas y trimetoprim/sulfametoxazol. A pesar del tratamiento, el paciente falleció a los 5 días de ingreso por fallo multiorgánico.

Conclusiones

Aunque *M. odoratus* no se suele considerar patógeno, ni se aísla con frecuencia, su virulencia puede ser mayor de lo que se piensa debido a su resistencia antibiótica.



P35. Análisis descriptivo de los casos de infección por *Clostridium difficile* en el Hospital de Jerez.

JC Alados Arboledas*, S. López Cárdenas, P. Villanueva Rodríguez, MD López Prieto.
UGC Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Hospital de Jerez (Cádiz).

Objetivos.

Analizar los datos clínico-epidemiológicos de los casos confirmados de infección por *Clostridium difficile* (CD) e investigar si existe relación entre gravedad del cuadro y metodología diagnóstica utilizada.

Material y Método.

Estudio prospectivo de casos de infección por CD desde enero-2012 a junio-2013 confirmados mediante detección de antígeno GDH y toxina (Techlab® C. DIFF QUICK CHEK COMPLETE®, Alere) o mediante GDH y detección por PCR del gen toxigénico (Xpert® C. difficile, Cepheid). El análisis estadístico se hizo con SPSS 19.0.

Resultados.

Se diagnosticaron 30 casos en 30 pacientes (53,3% mujeres) de edades comprendidas entre 19 y 92 años (media 64). En el 40% la sintomatología derivada de la infección fue la que motivó el ingreso. Todos presentaban algún factor predisponente: 28 (93,3%) antibioterapia en los días previos e inhibidores de la bomba de protones; 16 (53,3%) neoplasia; 5 (16,7%) antecedentes de enfermedad colónica y 11 (36,7%) habían recibido corticoides; 1 (3,3%) embarazo. Los antibióticos relacionados con la infección con mayor frecuencia fueron betalactámicos (33,3%) y cefalosporinas (26,7%). En 6 (20%) la adquisición de la enfermedad fue extrahospitalaria. Hubo constancia de recurrencia en 2 casos tras haber recibido antibioterapia específica. Tres pacientes presentaron enfermedad severa pero sin complicación relevante. Todos los pacientes recibieron antibioterapia con metronidazol (50%) o vancomicina (50%). Solo en un caso se sustituyó el metronidazol por vancomicina por fracaso del primero. Sólo el 33,3% de los casos se diagnosticaron por detección de toxina, ninguno presentó cuadro severo. Los 2 casos en los que hubo recurrencia fueron diagnosticados mediante detección de toxina. Se llegó al diagnóstico por detección de GDH y PCR (no detección directa de toxina) en 20 casos. En 3 de estos la enfermedad era severa sin relación temporal ni en parámetros clínicos entre los casos.

Conclusiones.

- 1 - La infección por *C. difficile* aparece relacionada siempre con algún factor predisponente, mayoritariamente el uso de antibióticos betalactámicos
- 2 - La determinación del antígeno GDH ha aumentado notablemente la sensibilidad diagnóstica respecto a la detección de toxina. La detección por PCR del gen toxigénico de *C. difficile* ha aportado la especificidad a la detección del antígeno.
- 3 - En nuestra serie de casos no existe diferencia en cuanto a la severidad de los casos en función de si se ha detectado directamente la toxina o no.



P36. Introducción de nuevas técnicas de detección de antígeno y toxina de *Clostridium difficile*: Consecuencias para el diagnóstico.

C. Martínez Rubio*, C. Freyre Carrillo, K. Rodière, S. Pérez Ramos.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Puerto Real, Cádiz.

Objetivo:

Analizar las repercusión de la incorporación de una nueva técnica de detección de antígeno y toxina de *Clostridium difficile* en el diagnóstico de la diarrea producida por este microorganismo.

Métodos:

En Julio de 2012 se incorporaron a la cartera de servicios del Laboratorio de Microbiología del Hospital de Puerto Real, dos técnicas: Un EIA de membrana (C Diff Quik Chef Complete. Alere), que permite la detección simultánea (por enzimoimmunoensayo de membrana) de antígeno (GDH) y de toxinas de *C difficile* A y B) (ToxGDH), y una técnica de PCR a tiempo real en muestra directa (GenExpert), que detecta 3 dianas: Toxina B, *cdtA* y *tcdC* deleción, así como el ribotipo hipervirulento O27 NAP 1 B1. A partir de ese momento, a las muestras recibidas solicitando este estudio, se les realizó el EIA de membrana. Si el resultado del GDH era positivo se realizaba PCR. Se tuvieron en cuenta además las características organolépticas de las muestras.

Resultados:

Se estudiaron 54 muestras correspondientes a 48 pacientes. De las 49 muestras en las que la toxina fue Negativa, en 8 fue Positivo el GDH y en 5 de ellas también fue Positiva la PCR. En un total de 9 casos, la PCR fue Positiva. En 5 de ellos había sido Positivo el GDH (55.5%) y en los otros 4 también la toxina (44.4%) (ToxGDH). Si solo se hubiera determinado la toxina mediante (ToxGDH), hubiéramos informado como falso Negativo en 4 de los 9 casos (44.4%). Si no hubiéramos realizado PCR, hubiéramos informado como falso Positivo (33.3%) 3 casos de GDH Positiva con PCR Negativa.

Considerando las características organolépticas de las muestras, observamos que todas las muestras PCR Positiva se describen como "verdes líquidas o pastosas". Además, en dos casos, la prueba no había sido solicitada y se realizó en función de la muestra, resultando Positiva la PCR.

Conclusiones:

Aunque en nuestro estudio hay en este momento pocas muestras, sí nos sirve para proponer lo siguiente:

- 1.- Las características de la muestra deben ser tenidas en cuenta para realizar el estudio de la presencia de toxina (ToxGDH o PCR) y/o GDH.
- 2.- La PCR podría ser considerada como la primera determinación en los casos de muestra sospechosa, aunque no se haya solicitado por el facultativo.
- 3.- Siempre hay que realizar detección de toxina mediante PCR, en los casos en que la GDH sea positiva. Con ello se podría comprobar si se trata de un portador o efectivamente es un verdadero productor de toxina.



P37. Úlcera genital dolorosa sin prácticas sexuales de riesgo

Alejandro Peña Monje, Natalia Chueca Porcuna, Jon Badiola, Santiago Perez Parra, Raquel Camacho Luque, Jose Luis Cabrera Alarcon, Jose Liebana Ureña, Federico Garcia Garcia

Hospital Clínico San Cecilio, Servicio de Microbiología, Granada.

Objetivo: Varón de 29 años que presenta una úlcera única dolorosa en el pene, sin relaciones sexuales en los últimos 3 meses, que no presentaba ninguna otra sintomatología.

Método: Las muestras obtenidas para el estudio bacteriológico fueron inoculadas en diversos medios de cultivo, aislándose colonias grises aisladas no hemolíticas de pequeño tamaño (2-5 mm), las cuales fueron identificadas como *Actinomyces urogenitalis* por espectrometría de masas MALDITOF-MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). La confirmación posterior de la identificación fue realizada por análisis de la secuencia génica del ADNr 16S. La extracción del ADN se realizó a través del kit TRUGENE CLIP SEQUENCING CORE REAGENT (Qiagen), usando los primers universales 27F y 534R que nos permite obtener secuencias de la región V1-V3 del ADN16S. La sensibilidad antibiótica fue determinada a través de E-test en placas de Miller Hinton agar, siguiendo las instrucciones de la CLSI (M24-A2),

Resultado: La identificación fue realizada por espectrometría de masas Mauditof, obteniéndose como resultado: *Actinomyces urogenitalis*. Dicha identificación fue confirmada a través de métodos moleculares antes descritos. La secuencia completa en formato fasta se presenta en la FIGURA 1. La sensibilidad antibiótica del aislado de *Actinomyces urogenitalis* fue determinada a través de tiras en E-test en placas de Miller Hinton agar, obteniéndose el siguiente resultado: Microorganismo sensible a: penicilina(CMI 0.75), claritromicina(CMI 1), imipenem(CMI 0.25); y ciprofloxacino resistente(CMI 4).Las serologías de VIH y sífilis solicitadas fueron negativas, la PCR para VHS-1 y VHS-2 fue negativa y destacaba el crecimiento de *Actinomyces urogenitalis* en el cultivo.

Conclusiones: El crecimiento de *Actinomyces urogenitalis* en el cultivo de la úlcera nos hizo plantearnos el papel de esta bacteria. Aunque es probable que esta bacteria se haya aislado como simple colonizadora en el contexto de un chancroide no podemos descartar que este patógeno sea la causa de la infección. En los próximos años habrá que estar atentos a los aislamientos de *Actinomyces* en mucosa genital y al papel que juega en dichas infecciones.



P38. Extracción automática de ADN mediante bolas magnéticas (GenoXtract®) como alternativa a la extracción manual recomendada en el ensayo speed-oligo® direct mycobacterium tuberculosis (SO-DMT).

M. J. Muñoz-Dávila, M. A. Cejudo-García, I. Segura Díaz, E. Leiva-Tápiá, M. J. Martínez-Lirola.
U.G.C. de Biotecnología. Complejo Hospitalario Torrecárdenas. Almería.

Objetivo: el ensayo SO-DMT facilita la detección de AN de micobacterias en muestras clínicas, diferenciando *M. tuberculosis* complex (MTC) de otras micobacterias (MNT). La extracción manual de AN propuesta por el fabricante se realiza mediante rotura celular mecánica y química (agitación fuerte de la muestra en vial de lisis con "beads"). Nuestro objetivo fue comprobar si el extractor de AN automático GenoXtract®, basado en la captura bacteriana en bolas magnéticas, podía ser una alternativa equivalente a la extracción mas laboriosa del fabricante.

Métodos: diseño: prospectivo ciego. Periodo: 10 meses (Septiembre-2012 a Junio-2013). Muestra: 81 muestras respiratorias descontaminadas (NOH-AC4%) y cultivo-positivo (bact/ALERT MP y/o LJ), estratificadas según carga bacilar (UV-fixed-thick-blotch Auramine (JCM 2013)): 60(74.1%) multibacilares (≥ 1 BAAR/campo [20x]) ($\uparrow\uparrow\acute{o}\uparrow$) y 21(25.9%) paucibacilares (< 1 BAAR/campo) ($\downarrow\acute{o}\downarrow\downarrow$). Cultivo de micobacterias positivos: 60 (74.1%) con MTC y 21 (25.9%) con MNT. Análisis: concordancia, I. Kappa, sensibilidad (S), y falsos negativos (FN) (%).

Resultados: en las 81 muestras seleccionadas detectamos AN de micobacterias: en 73 con extracción manual (SO-DMT) (S: 0.90) y en 67 (S: 0.83) con automática (GenoXtract®) –concordancia: 0.92, I. Kappa: 0.69-. Las S del ensayo en el subgrupo de muestras paucibacilares (n:21), fueron: con extracción automática S:0.57 (FN: 9) y con la manual S:0.76 (FN: 5). Considerando los resultados globales de ambos métodos de extracción, el ensayo SO-DMT fue más eficiente en la detección de MTC (S:0.87) que en la de MNT (S:0.60). No se produjo ningún error diagnóstico (identificación de MTC como MNT y viceversa).

Conclusiones: ambos sistemas de extracción son equivalentes en muestras respiratorias con alta carga bacilar y presencia de MTC, pero en muestras paucibacilares y en aquellas con MNT, el sistema de extracción combinado lisis-ruptura mecánica de Vircell® (V-x) es superior al automático de captura bacteriana en bolas magnéticas GenoXtract® (G-x) -Tabla 1- .

Muestras respiratorias con cultivo positivo	Total de muestras con cultivo positivo (n: 81)				Muestras con MTC(n: 60)				Muestras con MNT (n: 21)			
	$\uparrow\uparrow\acute{o}\uparrow$ (n:60)		$\downarrow\acute{o}\downarrow\downarrow$ (n:21)		$\uparrow\uparrow\acute{o}\uparrow$ (n:46)		$\downarrow\acute{o}\downarrow\downarrow$ (n:14)		$\uparrow\uparrow\acute{o}\uparrow$ (n:14)		$\downarrow\acute{o}\downarrow\downarrow$ (n:7)	
Tipo de extracción	V-x	G-x	V-x	G-x	V-x	G-x	V-x	G-x	V-x	G-x	V-x	G-x
Sensibilidad	0.95	0.92	0.76	0.57	1	1	0.86	0.64	0.78	0.64	0.57	0.43
FN n (%)	3 (5)	5 (8)	5 (24)	9 (43)	0	0	2 (14)	5 (36)	3 (22)	5 (36)	3 (43)	4 (57)
Concordancia	0.96		0.8		1		0.78		0.86		0.86	
Kappa	0.73		0.59		1		0.46		0.66		0.72	

$\uparrow\uparrow\acute{o}\uparrow$: multibacilares (≥ 1 BAAR/campo [20x]).

$\downarrow\acute{o}\downarrow\downarrow$: paucibacilares (entre < 1 BAAR/campo y 1 BAAR/30 campos)



P39. Diagnóstico de *Micobacterium tuberculosis* complex empleando la técnica de FluoroType® MTB: utilidad en la práctica clínica de un hospital de tercer nivel.

Artacho. MJ*, González-Galán. V, Perez-Rodriguez B, Terrones. R, Aznar. J. Servicio de Microbiología-UCEIMP. Hospital Universitario Virgen del Rocío. IBIS/CSIC/Universidad de Sevilla.

Objetivos: evaluar el rendimiento de la técnica FluoroType® MTB (HainScience, Nehren, Alemania) para la detección de complejo *M. tuberculosis* (MTB) en muestras extra-pulmonares y comparar con las técnicas convencionales de tinción y cultivo para el estudio de MTB.

Material y métodos: en el periodo comprendido entre marzo del 2012 hasta agosto del 2013 se estudiaron 70 muestras extrapulmonares pertenecientes a 57 pacientes con alta sospecha de TBC. A todas las muestras se les realizó la tinción de auramina modificada y se sembraron en medio de cultivo sólido Lowenstein-Jensen (Difco) y medio líquido empleando el sistema BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System (Becton, Dickinson and Company, USA) y. La identificación de las cepas aisladas se realizó con el sistema GenoType® Mycobacterium (HainScience, Nehren, Alemania)

Resultados: se detectó crecimiento de *Mycobacterium* spp en 18(25,7%) muestras, de las cuales 14/18 (77,8%) fueron identificadas como *M. tuberculosis* y 4/18(22,2%) no pertenecientes al complejo (1 *M. malmoense*, 1 *M. fortuitum* y 2 *M. avium* pertenecientes al mismo paciente). Se detectó ADN del complejo *M. tuberculosis* en 20 (28,6%) muestras. No se detectó en 41 (58,6%) muestras y en 9 (12,8%) muestras la técnica fue inválida. La sensibilidad de Fluorotype para la detección de MTB frente al cultivo fue de 69,2%, y la especificidad de 81,8%. El valor predictivo positivo fue de 52,9% y el valor predictivo negativo de 90%. Tras revisión de las historias clínicas, y según antecedentes, la técnica muestra una sensibilidad de un 83% y 97% de especificidad. La muestra inválida en la que creció *M. tuberculosis* era un líquido ascítico hemático que interfiere con la detección. Todos los fluorotype positivos y cultivos negativos tenían antecedentes de TBC, por lo que eran TBC latentes o en tratamiento, salvo un jugo gástrico de una niña, que se decide tratar, porque la clínica era sugestiva de TBC.

Conclusiones: la técnica del fluorotype muestra mejor rendimiento que la tinción de auramina para el diagnóstico de TBC en muestras extra-pulmonares. Presenta una menor especificidad frente al cultivo, debido a que la detección de ADN de MTB no implica enfermedad activa y no la diferencia de la TBC latente. En pacientes con muy alta sospecha de infección por evidencias clínicas y radiológicas con Cultivo y auramina negativos, la positividad del fluorotype acorta los tiempos de respuesta al clínico permitiendo la instauración precoz del tratamiento

Tabla 1. Relación entre las técnicas.

	Cultivo+ MTBC		Cultivo + MNT		Cultivo -		Total
	Tinción+	Tinción-	Tinción+	Tinción-	Tinción+	Tinción-	
Fluorotype+	3	6	1	2	0	8	20
Fluorotype-	0	4	0	1	0	36	41
Fluorotype invalido	0	1	0	0	0	8	9
Total	3	11	1	3	0	52	70



P40. Identificación de Micobacterias en la práctica clínica mediante Maldi-tof MS.

Camacho Luque, R^{1*}; Peña Monje, A¹; Álvarez Estévez, M¹; Chueca Porcuna, N¹; Guillot Suay, V¹; Román Ureña, J¹; Barbancho, A²; Montiel, N²; García, F¹.

1. Servicio Microbiología Hospital Universitario San Cecilio de Granada.
2. Servicio Microbiología Hospital Costa del Sol de Marbella.

Objetivo: El diagnóstico infecciones por micobacterias se basa en la utilización de técnicas bioquímicas y cromatográficas, con frecuencia complementadas mediante técnicas moleculares, más complejas y de alto coste económico. Valoramos la utilidad de MALDITOF MS en el diagnóstico etiológico de infecciones causadas por micobacterias.

Métodos: Utilizamos 75 aislados clínicos de micobacterias procedentes de cultivo en medio sólido Lowenstein-Jensen. 50 *M. tuberculosis* complex, 10 *M. avium* y 15 micobacterias atípicas (4 cepas de *M. kansasii*, 3 cepas de *M. chelonae*, 4 cepas de *M. gordonae*, 3 de *M. fortuitum*, y una cepa de *M. marinum*). El diagnóstico se realizó por PCR e hibridación inversa: GenoType Mycobacterium CM y GenoType Mycobacterium AS. De forma paralela, las cepas se inactivaron y degradaron para su identificación mediante MALDITOF MS, siguiendo un proceso de extracción mediante acetonitrilo y ácido fórmico. Para identificar los espectros obtenidos en cada aislado se utilizó la librería de micobacterias V 1.0 de MaldiTof Biotyper (173 MSPs).

Resultados: De 50 aislados de *M. tuberculosis* complex (MTC), 43 fueron identificados por MALDI-TOF MS como MTC con score >2,0; 5 con score 1.8-2.0 y 2 no fueron identificados por no detectarse picos por el sistema. En cuanto a micobacterias atípicas: 8 cepas *M. avium* fueron identificadas por el espectrómetro de masas con un score superior a 2,0 y el resto con score 1.6-1.9; los aislados de *M. fortuitum* fueron identificados con score >2.0; de 4 cepas de *M. kansasii*, 3 fueron identificadas correctamente con score 1.8-2.0 y 1 fue identificada como *M. lentiflavum* con score 1.6, siendo catalogada como error de identificación a través de MALDITOF MS. De las 3 cepas de *M. chelonae*, 2 fueron identificadas correctamente con un score de 1.7-2.0 y otra no fue identificada. Las cepas de *M. gordonae* fueron identificadas correctamente con score 1.7-2.1, al igual que el caso de *M. marinum*. La concordancia global de resultados entre la identificación por PCR y la tecnología MALDI-TOF fue del 97%, con un coeficiente kappa de correlación: 0.929.

Conclusiones: La identificación de micobacterias mediante MALDI-TOF MS es un método rápido y sencillo, y muestra muy buena correlación de resultados respecto a las técnicas moleculares "gold standard". Concluimos que esta tecnología podría considerarse como otra opción válida para el diagnóstico identificativo de micobacterias.



P41 Infección por *Mycobacterium fortuitum* asociada a un dispositivo. Utilidad de la espectrofotometría de masas.

MJ Artacho*, JA Lepe, V González-Galan, R Terrones, J Aznar.

Servicio de Microbiología-UCEIMP. Hospital Universitario Virgen del Rocío. IBIS/CSIC/Universidad de Sevilla.

Introducción: las bacteriemias relacionadas con catéter por Micobacterias de rápido crecimiento (RGM) son infrecuentes pero no raras, y generalmente están asociadas a pacientes inmunodeprimidos.

Objetivo: descripción de un caso de micobacteriosis por *M. fortuitum* asociado a un dispositivo subcutáneo en un niño con un linfoma no Hodgkin

Material y métodos: se realizaron al paciente dos tandas de hemocultivos, 4 frascos: 2 BD BACTEC™ Plus Aerobic/F y 2 BD BACTEC Plus Anaerobic/F Medium, por vía periférica y un set a través del sistema de Porth-a-cath. Tras la incubación se detectó crecimiento en los frascos y se procedió a realizar para la identificación: tinción de gram, tinción de Kinyoun modificado, espectrometría de masas [Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry] (MALDI-TOF MS- Bruker®), PCR- hibridación reversa GenoType® Mycobacterium CM (Hain Science, Nehren, Alemania). El antibiograma se realizó mediante e-test (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) y la interpretación clínica se basó en los criterios establecidos por CLSI. Los datos clínicos del paciente fueron recogidos del programa SIDCA.

Resultados: el tiempo de positividad del Porth-a-cath fue de 4 días y 10 minutos, mientras que el de la sangre periférica se alargó en 24 horas. En el Gram directo de la muestra se observaron bacilos gram positivos con tinción irregular, mientras en la tinción de Kinyoun modificado sobre la misma impronta se observaron BAAR. La identificación mediante MALDI-TOF fue de *M. fortuitum* con un score de 1,5 (-) y a las 48 h del pase en Agar Columbia con Sangre de Carnero (Oxoid, Thermo Scientific), creció *M. fortuitum* que fue identificado de nuevo por MALDI-TOF con score de 1,9 (+). Adicionalmente fue identificado mediante la técnica de PCR-hibridación reversa como *M. fortuitum* (banda en posición 7 y 14). El antibiograma de *M. fortuitum* mostró que la cepa era sensible a todos los antibióticos probados (amikacina, cotrimoxazol, imipenem, claritromicina, ciprofloxacino, doxiciclina)

Conclusiones: la presencia de BGP irregularmente teñidos en el Gram de un hemocultivo de un paciente con clínica compatible, nos debe hacer sospechar la presencia de RGM, que se confirmaría con la tinción de Kinyoun. Ésta y la identificación por MALDI-TOF, permitió una rápida identificación del patógeno responsable: *M. fortuitum*. El uso del MALDI-TOF en este caso acertó el tiempo de identificación del patógeno responsable y posibilitó un cambio total en el enfoque global del manejo de esta infección en su abordaje terapéutico.



P42. Brote de tuberculosis en el distrito sanitario Málaga

V.Odero Bernal, L. Mora Navas, N. Montiel Quezel-Guerraz, MJ López Fernández, M. Ortega Torres, J.M. Gallegos, , E. Clavijo Frutos.

Servicio de Microbiología H. Virgen de la Victoria. Servicio de Microbiología H.Costa del Sol (Centro de Referencia de Micobacterias de Andalucía). Servicio de Medicina Preventiva H. Virgen de la Victoria. Málaga.

Objetivo: Descripción de un brote de tuberculosis pulmonar (TB) resistente a isoniacida en nuestra área sanitaria.

Metodología: A partir de un caso de TB multirresistente se realizó el estudio epidemiológico por parte del servicio de Medicina Preventiva. El cultivo, identificación y estudio de sensibilidad se realizaron según el procedimiento habitual de nuestro laboratorio. El estudio epidemiológico a nivel molecular se realizó mediante una técnica REP-PCR en el sistema automático Diversilab (Bio-Merieux) en nuestro centro de referencia.

Resultados: Presentamos un brote de cinco pacientes con tuberculosis pulmonar. El caso índice es un paciente de 35 años diagnosticado de TB en mayo de 2011, la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* presentó resistencia a isoniacida y rifampicina; se estudiaron tres convivientes no identificándose nuevos casos. En febrero de 2012 fue diagnosticado de TB un paciente de 37 años; se estudiaron cuatro convivientes y se identificó un nuevo caso en un varón de 43 años; en ambos casos las cepas presentaron resistencia a isoniacida. La historia clínica permitió establecer la relación epidemiológica con el caso índice y se confirmó la relación entre las tres cepas mediante método molecular. En agosto de 2011 fue diagnosticada de TB una mujer de 36 años, la cepa presentó resistencia a isoniacida; se estudiaron seis convivientes no identificándose nuevos casos. La paciente completa el tratamiento y en febrero de 2013 de nuevo es diagnosticada de TB; esta cepa presentó resistencia a isoniacida y rifampicina; en la encuesta epidemiológica se estableció relación con el caso índice, demostrándose igualmente la relación epidemiológica molecular con las tres cepas anteriores. En abril de 2013 un conviviente del segundo y tercer caso es diagnosticado de TB resistente a isoniacida, demostrándose de nuevo la relación epidemiológica molecular con las cuatro cepas anteriores. Desde este momento no se ha detectado ningún otro caso. La cepa presentó sensibilidad al resto de los fármacos de primera y segunda línea.

Conclusiones: El estudio de convivientes solo ha permitido la identificación de uno de los casos. La escasa colaboración del caso índice ha retrasado la identificación de los nuevos casos que solo han podido relacionarse posteriormente. Solo el estudio mediante técnicas de epidemiología molecular nos ha permitido establecer la relación filogenética precisa entre las cepas.



P43. Tuberculosis multirresistente: descripción de un caso clínico en la Región de Murcia.

M. J. Muñoz Dávila*, M. L. Núñez Trigueros, A. Marín Cervantes.

Laboratorio de Microbiología, Hospital General Universitario Reina Sofía, Murcia.

Objetivo: presentamos un caso clínico de MDR-TB pulmonar y su manejo terapéutico en un paciente de la Región de Murcia.

Métodos: en Mayo de 2013 acude a la puerta de urgencias de nuestro hospital un varón fumador autóctono de 46 años que refiere dos semanas con tos de escasa expectoración blanquecina, disnea de moderados esfuerzos, sensación distérmica no termometrada y escalofríos. Refería no haber viajado nunca fuera del país. En la radiografía de tórax, se observa una lesión cavitada en vértice pulmonar derecho. Ante sospecha de TB se solicita a microbiología estudio de micobacterias en tres muestras de esputo seriadas.

Resultados: tras informe de baciloscopia positiva en las tres muestras consecutivas (tinción de auramina en esputos descontaminados (NOH-AC4%)) se inicia tratamiento con I, R, pirazinamida y etambutol. El paciente persiste con febrícula y con tos y expectoración, sin demostrar mejoría clínica. El informe de susceptibilidad de la cep MTC aislada (Nonradiometric MGIT 960 Automated system) demostró resistencia a todos los fármacos de primera línea. Por ello, el 17/06/2013 se modifica el tratamiento a cicloserina, etionamida, levofloxacin y protionamida. La cepa en cuestión fue remitida a un laboratorio de referencia en el que se determinó la presencia de mutaciones en los genes *rpoB*, *katG*, *embB* y *gyrA*, asociadas con resistencia a I, R, etambutol y fluoroquinolonas (Genotype MTBDRplus y GenoType MTBDRsl, Hain, Germany). En el estudio de actividad *in vitro* de fármacos de segunda línea (Nonradiometric MGIT 960 Automated system), amikacina, capreomicina, etionamida y linezolid demostraron una excelente actividad mientras que ofloxacin, moxifloxacin y levofloxacin no presentaron actividad *in vitro*. Por ello, el 21/08/2013 se sustituyó el linezolid por levofloxacin en la pauta de tratamiento. En Junio, Julio y Agosto de 2013, las muestras respiratorias de este paciente persisten con resultado de baciloscopia positivo y aislamiento de MTC. El paciente continúa en seguimiento y dada la afectación radiográfica pulmonar, la resección quirúrgica no es una aproximación terapéutica posible.

Conclusiones: aún sin cumplir con los criterios de XDR-TB, este caso de MDR-TB con resistencia adicional a estreptomicina, pirazinamida y etambutol entre los fármacos de primera línea y a fluoroquinolonas entre los de segunda línea ha planteado un reto en su aproximación terapéutica en una región en la que su prevalencia es muy baja.



P44. Estudio del nuevo kit doble a tiempo real Anyplex plus MTB/NTM-MDR-TB para la detección genotípica de resistencias a Rifampicina e Isoniazida en *M. tuberculosis*

Cause, M., Gutierrez-Aroca, JB., Ruiz, P., Casal, M.

Laboratorio de Referencia de Micobacterias.Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba)

Objetivos:

Debido a la detección de cepas de *M.tuberculosis*, resistentes a fármacos de primera línea, fundamentalmente a Rifampicina e Isoniazida (MDR-TB) se han venido desarrollando sistemas capaces de detectar mutaciones que confieren resistencias a dichos antituberculosos. De esta manera no hay que esperar a los resultados fenotípicos, que podrían alargarse en el tiempo varias semanas, en las cuales el paciente puede estar siendo tratado con fármacos ineficaces. El objetivo de el estudio fue evaluar el nuevo kit doble a tiempo real Anyplex plus MTB/NTM-MDR-TB (Seegene, IZASA) comparándolo con el estudio fenotípico en Bactec MGIT 960.

Método:

El estudio se compuso de 91 cepas. Se procesaron 55 cultivos de *M:tuberculosis* procedentes de pacientes del Hospital Universitario en los que el estudio fenotípico había presentado resistencias a Rifampicina y/o Isoniazida y 36 cultivos que habían resultado sensibles ambos fármacos. Se realizó una extracción automatizada en el sistema EZ1 tras inactivación a 95º 15 minutos. Se procesaron las muestras siguiendo el protocolo de la técnica en el Cfx96 (Biorad).

Resultados:

Las 22 resistencias fenotípicas a Rifampicina fueron detectadas por Anyplex. Entre las 69 fenotípicamente sensibles a este antituberculoso, en dos casos se detectaron mutaciones no expresadas fenotípicamente. Entre los 49 cultivos con resistencia fenotípica a Isoniazida se detectaron mediante Anyplex mutaciones en 35 cultivos, mientras que en 14 cultivos resultó genotípicamente sensible. Entre las 42 cepas sensibles a Isoniazida no se encontraron mutaciones en 40 cepas por ambas técnicas. En los dos cultivos restantes se detectó mutación en la región promotora del inh-A.

En porcentaje	Rif sensibilidad	Rif especificity	Rif PPV*	Rif NPV	INH sensibilidad	INH especificity	INH PPV	INH NPV
Anyplex MTB/NTM MDR-TB	100	97	92	100	71	95	95	74

Conclusiones:

Anyplex plus MTB/NTM-MDR-TB (Seegene, IZASA) parece una técnica fiable a la hora de detectar mutaciones que confieren resistencia a Rifampicina e Isoniazida, siendo una técnica a tiempo real que evita el proceso postPCR de otras técnicas similares.



P45. Evolución de las resistencias a antituberculosos de 1ª línea en Córdoba.

Gutierrez-Aroca, J.B.*; Ruiz-Martinez, P.; Causse, M.; Bañón, R.; Casal, M.
Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Introducción

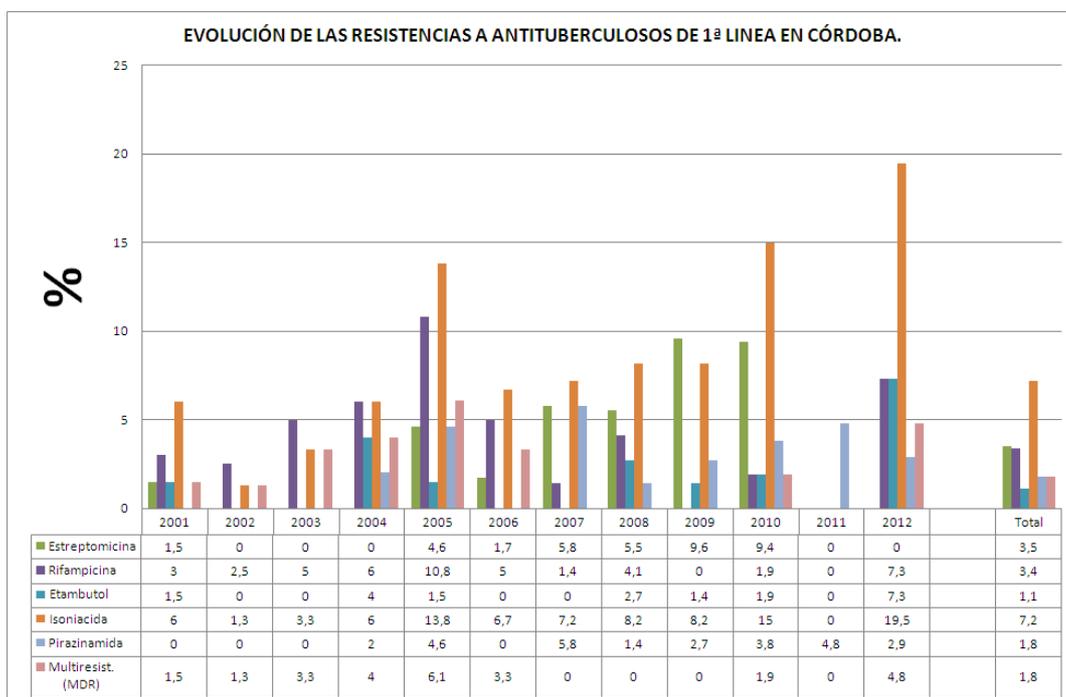
La Tuberculosis sigue siendo en nuestro país un problema de salud pública, a pesar del evidente descenso, en gran parte debido a la mejora del nivel socioeconómico. En la actualidad la endemia se mantiene en parte por los pacientes inmunodeprimidos (VIH positivos sobre todo) y por las resistencias a los fármacos específicos. Por estas razones queremos saber el grado de resistencia a los antituberculosos, que hace ineficaces los regímenes terapéuticos.

Material y métodos

El estudio abarca un periodo de 12 años, desde 2001 hasta el 2012. Se estudiaron un total de 49.674 muestras clínicas de pacientes con sospecha de tuberculosis, de estas resultaron 737 cepas de M. tuberculosis a las que se les hizo el estudio de resistencias; todas fueron aisladas para descartar mezclas, e identificadas mediante procedimientos de Accuprobe o Genotype. A todas ellas se les realizó estudio de sensibilidades a Estreptomina (SM), Rifampicina (RF), Etambutol (EB), Isoniacida (INH) y Pirazinamida (PZ), según los protocolos BACTEC 960 TB (MGIT).

Resultados

Se expresan en la tabla y gráfica.



Conclusiones

A la vista de los resultados se observa un incremento en las resistencias, en los últimos años, sobre todo a la estreptomina, isoniacida o rifampicina, siendo no obstante bajos.

No se observan unos porcentajes elevados frente a la Multirresistencia (MDR).



P46. Aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fármacos de segunda línea

P.Ruiz-Martinez; J.B. Gutierrez; M. Causse; M. Casal

Centro de Referencia de Micobacterias. Facultad de Medicina. Hospital Reina Sofía . Córdoba

Objetivo:

La incidencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes y la aparición de cepas extremadamente resistentes, requiere que se hagan estudios de sensibilidad in vitro con fármacos distintos a los de primera línea. Hoy en día con los métodos rápidos es mucho más fácil. Nuestro objetivo es presentar la incidencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con resistencias a fármacos de segunda línea, detectadas en los cultivos recibidos en nuestro Centro en los últimos 12 años.

Materialy Métodos:

En este periodo, hemos realizado estudios de sensibilidad in Vitro a 990 cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*, tanto en medio sólido como líquido. Todas fueron aisladas para descartar mezclas e identificadas mediante procedimientos bioquímicos, HPLC, Accuprobe ó Genotype. A todas ellas se les realizó el estudio de sensibilidad a Estreptomicina (SM), Rifampicina (RIF), Etambutol (EB), Isoniazida (INH) y Pirazinamida (PZA). según protocolo Bactec y MGIT 960 y a los fármacos de segunda línea Amikacina (AMK) 1.0 µg/ml , capreomicina (CAP) 2.5 µg/ml , kanamicina (KAN) 1µg/ml , etionamida (ETH) 5.0µg/ml , rifabutina (RFB)0.5 µg/ml , rifapentina (RFP) 5 µg/ml , ofloxacina (OFX) 2.0 µg/ml, ciprofloxacina (CIP) 2.0 µg/ml, moxifloxacina (MOX) 2.0 µg/ml, levofloxacina (LVX) 4.0 µg/ml , linezolid (LZD)1.0µg/ml , cicloserina (CYC) 75 µg/ml y PAS 50µg/ml . Para ellos tambien se utilizó el mismo protocolo.

Resultados:

De los 990 cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* estudiados, 141 (14,24%) presentaron resistencia a alguno de los fármacos estudiados. Se detectaron 59 cepas (5,95%) resistentes a algún fármaco de primera línea y 74 cepas (7,4%) fueron resistentes a alguno de segunda línea. Hubo 8 cepas resistentes a quinolonas y sin resistencia a primera línea. Se detectó multiresistencia en 53 cepas (5,35%). De ellas 40 (75,47%) fueron tambien resistentes a algún fármaco de segunda línea, predominando la resistencia a RB+RP (32,5%) . 24 cepas (45,28%) no multiresistentes , presentaron resistencia a algún fármaco de segunda línea. Hubo 2 cepas consideradas como Pre-XDR y 5 cepas XDR .

Conclusion:

La resistencia a fármacos de segunda línea en tuberculosis, hace que sean necesarios los estudios de sensibilidad in vitro. Consideramos el sistema BACTEC MGIT 960, como un método rápido y fiable para la determinación de sensibilidad a estos fármacos.



P47. Micobacterias del complejo *avium-intracellulare* aisladas en Cádiz durante 15 años

I. Guerrero-Lozano, L. García-Agudo, F. Galán-Sánchez, P. Aznar-Marín, P. García-Martos, M. Rodríguez-Iglesias.

UGC de Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Objetivos

Con el fin de conocer la incidencia, distribución y etiología de la infección por micobacterias del complejo *avium-intracellulare* (MAI), hemos revisado los casos diagnosticados en el área sanitaria de Cádiz durante los últimos 15 años.

Material y métodos

Revisamos retrospectivamente las historias clínicas de los pacientes diagnosticados mediante cultivo microbiológico de micobacteriosis por *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*, en el Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz. El diagnóstico microbiológico se realizó mediante tinción de Ziehl-Neelsen/auramina y cultivo en medios de Löwenstein-Jensen y Middlebrook 7H9. La identificación de las cepas se llevó a cabo por hibridación de sondas de ADN. De los pacientes con micobacteriosis se recogieron datos referentes a sexo, edad, enfermedad de base y forma clínica de presentación.

Resultados

Durante el período de estudio se registraron un total de 16 pacientes con infección por micobacterias del complejo MAI. De estos, 12 (75,0%) presentaron infección por *Mycobacterium avium* y 4 (25,0%) por *Mycobacterium intracellulare*. Los pacientes eran 13 (81,2%) adultos de edad comprendida entre 15 y 83 años (media 48,8 años) y 3 (18,9%) niños del sexo femenino, de 1 a 5 años. De los pacientes adultos, 12 (75,0%) eran hombres. Todos los niños eran sanos y presentaban linfadenitis por *M. avium*. De los adultos, 7 (53,8%) estaban infectados por el VIH con infección diseminada; el resto, cursó con un cuadro pulmonar, a excepción de un paciente de 15 años que tenía una infección diseminada.

Conclusiones

La infección por micobacterias del complejo MAI no es muy frecuente en nuestra zona. Se relaciona estrechamente con pacientes en un estadio de la infección por VIH y con pacientes adultos del sexo masculino. La infección diseminada es la manifestación más habitual en adultos; la infección pulmonar acontece en pacientes con enfermedad respiratoria crónica sin otra evidencia de alteración inmunitaria. En niños, la forma clínica observada es la linfadenitis cervical. En nuestra serie *M. intracellulare* se aisló en infección diseminada en pacientes VIH y en infección pulmonar en pacientes no VIH.



P48. *Candida glabrata*: resistencia a fluconazol cruzada con otros azoles y/o equinocandinas.

Marín Martínez EM*, Romero A, Zakariya- Yousef Breval I., Martín-Mazuelos E.

Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Hospital U. Valme. Área Sanitaria Sevilla Sur.
Sevilla.

Objetivo:

Las equinocandinas son un grupo de antifúngicos que actualmente son considerados cómo primera elección en el tratamiento de las candidiasis invasivas (CI) en casos de sepsis grave, en pacientes que previamente han estado tratados con azoles y/o en aquellos infectados por *C. glabrata*. En una reciente publicación (Pfaller M.A. et al. J. Clin. Microbiol. 2012, 50(4):1199.), donde se describe que las cepas de *C. glabrata* resistentes a fluconazol pueden mostrar de alguna manera resistencia a otros azoles y/o a otros antifungicos como las equinocandinas, nos ha hecho plantearnos el estudio de sensibilidad de las cepas de *C. glabrata* en nuestra área sanitaria, así como el análisis de la sensibilidad de los aislados resistentes a fluconazol frente a otros azoles y/o equinocandinas.

Material y Métodos:

Estudiamos retrospectivamente la sensibilidad "in vitro" a caspofungina, micafungina, anidulafungina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosina, mediante el método de microdilución Sensititre Yeast One (Izasa®. España) de 230 cepas de *C. glabrata* aisladas de diversas muestras clínicas, para comprobar su patrón de sensibilidad, seleccionando aquellas que mostraron resistencia a fluconazol. Analizamos la sensibilidad de estas al resto de antifúngicos. Utilizamos los puntos de corte epidemiológicos recomendados por el CLSI (Para equinocandinas, fluconazol y voriconazol utilizamos el Documento M27-S4, para itraconazol y 5-Fluorocitosina el M27-A3 y para posaconazol utilizamos un punto de corte arbitrario: CMI >0,5 µg/ml como resistentes).

Resultados:

De las 230 cepas de *C. glabrata* aisladas, 4 (1.7%) fueron resistentes al fluconazol (CMI > 64 µg/ml. De estas, 2(50%) mostraron resistencia cruzada a otros azoles: itraconazol (CMI 1 y 16µg/ml; voriconazol: CMI 2 y 16µg/ml; posaconazol: CMI 2 y 4µg/ml) respectivamente. Ninguna presentó sensibilidad disminuida o resistencia a equinocandinas.

Conclusiones:

1. Como en otros estudios, existe resistencia cruzada entre fluconazol y otros azoles.
2. Aunque se han descrito localizaciones geográficas con cepas resistentes a fluconazol con resistencia a equinocandinas, nuestra área sanitaria no tiene ninguna.
3. En nuestro medio podemos optar sin riesgo, en el caso de CI por *C. glabrata*, al tratamiento empírico antifúngico con equinocandinas.
4. Sería de gran interés estudiar un mayor número de aislados para poder confirmar nuestros resultados.



P49. Candidemias por especies de *Candida* no albicans poco frecuentes en el Hospital de Valme durante doce años.

Marín Martínez EM*, Aller García A.I., Florez C., Morilla D., Romero A., Zakariya –Yousef Breval I., Martín-Mazuelos E.

Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Hospital U. Valme. Área Sanitaria Sur. Sevilla.

Objetivo:

Estudiar retrospectivamente los episodios de candidemias producidas por especies de *Candida* poco habituales en el área hospitalaria de Valme (Sevilla) desde Enero del 2001 hasta Diciembre de 2012 y su sensibilidad a diversos antifúngicos.

Material y métodos:

Se estudiaron las características de 3 episodios de candidemias por especies de *Candida* poco frecuentes, de nuestro hospital entre los años 2001 y 2012. Todas las cepas fueron identificadas mediante la tarjeta YST del sistema Vitek-2 (BioMerièux® España, S.A.). La sensibilidad a caspofungina, micafungina, anidulafungina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosinan se determinó por microdilución Sensititre YeastOne (Izasa®. España.). La sensibilidad a equinocandinas se determinó a partir 2006. No existen puntos de corte establecidos para estas especies.

Resultados:

Analizamos 109 episodios de candidemias, de los cuales 3(2.8%) por especies de *Candida* poco frecuentes: 1 *C. membranofaciens*, 1 *C. lipolytica* y 1 *C. pulcherrima*. Los pacientes con *C. membranofaciens* y *C. pulcherrima*, presentaban coinfección por VIH, VHC y VHB, eran ADVP y ADVI activos y estaban neutropénicos. El paciente en el que se aisló *C. lipolytica* presentaba como enfermedad de base Diabetes mellitus tipo 2. El episodio por *C. lipolytica* había sido sometido a cirugía recientemente por obstrucción intestinal, y aunque era portador de catéter venoso central llevada solamente 3 días con el. Los 3 pacientes estaban recibiendo tratamiento antibiótico con betalactámicos. En ninguno de los 3 casos se encontró el foco de origen de la candidemia. *C. membranofaciens* y *C. pulcherrima* fueron sensibles a todos los antifúngicos ensayados. *C. lipolytica* presentó una CMI a fluconazol de 64 µg/ml y a itraconazol de 0.5 µg/ml. Los pacientes con aislamientos de *C. membranofaciens* y *C. pulcherrima* fueron tratados con fluconazol. La candidemia por *C. lipolytica* fue tratada con voriconazol. Los 3 pacientes evolucionaron favorablemente.

Conclusiones:

1. En nuestra área las candidemias por Candidas raras suponen sólo un 2.8%.
2. Sólo *C. lipolytica* presentó valores de CMI elevados a fluconazol e itraconazol, como se describe en la literatura.



P50. Estudio comparativo del Sistema de Espectrometría de Masas MALDI-TOF y métodos convencionales en la identificación de especies de *Candida no albicans*

I. Guerrero-Lozano, P. Aznar-Marin, F. Galán-Sánchez, P. Marín-Casanova, P. García-Martos, A. García-Tapia, M. Rodríguez-Iglesias.

UGC de Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Objetivo

Comparar el sistema MALDI-TOF con los métodos convencionales en la rutina diaria para la identificación *Candida no albicans*.

Métodos

Se analizaron 263 cepas de *Candida no albicans* en los últimos ocho meses, aisladas de las muestras remitidas a nuestro laboratorio. Las muestras se sembraron de forma rutinaria en medios habituales y Chromagar. La identificación se realizó en base a sus características fenotípicas (coloración, forma y textura de la colonia), por asimilación de compuestos de carbono (Sistema ID 32C, Bio Merieux) y espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker, Soria Melguizo).

Resultados

De las 263 cepas de *Candida no albicans*, *C. glabrata* (87), *C. tropicalis* (32) y *C. krusei* (24), fueron identificadas por características fenotípicas en medio de Chromagar. Aquellas cepas que no estaban bien definidas en este medio se les realizaron ID32C, con los siguientes resultados: *C. parapsilosis* (82), *C. lusitaniae* (11), *Sacharomyces cerevisiae* (6), *C. kefyr* (5), *C. glabrata* (5), *C. guillermondi* (3), *C. norvegensis* (2), *C. lipolytica* (1) y dos cepas no identificadas.

Paralelamente se realizó espectrometría de masas (MALDI-TOF) en todas las cepas con los siguientes resultados: *C. glabrata* (87), *C. parapsilosis* (79), *C. tropicalis* (32), *C. krusei* (24), *C. lusitaniae* (11), *Sacharomyces cerevisiae* (6), *C. kefyr* (5), *C. nivariensis* (5), *C. guillermondi* (3), *C. norvegensis* (2), *C. orthopsilopsis* (2), *C. metapsilopsis* (1), *C. lipolytica* (1), *C. haemulonii* (1), *Pichia kluyveri* (1).

Las 5 cepas de *C. glabrata* identificadas por ID32C y presentar una coloración blanca en Chromagar, resultaron ser *C. nivariensis* por MALDI-TOF. También con MALDI-TOF se identificaron tres cepas de *C. parapsilopsis* como *C. orthopsilopsis* (2), *C. metapsilopsis* (1) y las dos especies no identificadas fueron *C. haemulonii*, *Pichia kluyveri*.

Conclusiones

El sistema MALDI-TOF identifica un mayor número de especies que el ID32C, siendo más rápida y económico, es útil para identificación de especies relacionadas con el grupo “*silopsis*” y puede ser discriminatoria para *C. glabrata* y *C. nivariensis*. La espectrometría de masas aporta al laboratorio una mayor eficiencia y fiabilidad para la identificación de especies de *Candida no albicans*.



P51. Utilidad del sistema MALDI-TOF para la identificación de levaduras diferentes al Género *Candida*.

F. Galán-Sánchez, P. García-Martos, T. Gómez-Romano, I. Guerrero-Lozano, P. Marín-Casanova, M. Rodríguez-Iglesias.

UGC Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

Objetivo: La eficiencia y fiabilidad del sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación a nivel de especie de los aislados de *Candida albicans* y *no-albicans* se ha demostrado en varios estudios. Sin embargo, su utilidad para las levaduras no *Candida* es menos conocida; por otra parte, algunas de estas especies no se hallan aún incluidas en la base de datos de este sistema. Nuestro objetivo es determinar la utilidad del sistema MALDI-TOF para la identificación correcta de algunas de estas especies, así como su capacidad para discriminar otras especies relacionadas y no incluidas en la base de datos.

Métodos: En el estudio se incluyeron 11 cepas: dos cepas de *Trichosporon mucooides*, una cepa de *Trichosporon jirovecii*, tres cepas de *Trichosporon asahii*, una cepa de *Magnusiomyces capitatus*, una cepa de *Rhodotorula mucilaginosa*, una cepa de *Geotrichum silvicola*, una cepa de *Sacharomyces cerevisiae* y una cepa de *Trichomonascus ciferrii*. Todas estas cepas se seleccionaron de un cepario elaborado con aislamientos procedentes de muestras clínicas, identificadas mediante métodos convencionales y secuenciación de las regiones ITS1, ITS2 y 5.8 rARN con primers ITS-1 e ITS-4. Las cepas se procesaron en el sistema MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Soria Melguizo) utilizando dos protocolos de extracción diferentes (ácido fórmico y ácido fórmico/acetonitrilo).

Resultados: El sistema MALDI-TOF identificó correctamente a nivel de especie *T. mucooides*, *M. capitatus*, *G. silvicola* y *S. cerevisiae*. En el resto de las cepas el resultado fue "Identificación poco fiable". De estas cepas no identificadas, solamente *T. asahii* y *T. ciferrii* se encuentran incluidas en la base de datos. La extracción con ácido fórmico/acetonitrilo no mejoró el porcentaje de identificación fiable comparado con la extracción realizada únicamente con ácido fórmico.

Conclusiones: El sistema MALDI-TOF permite la identificación de la mayoría de las cepas estudiadas e incluidas en su base de datos, y no realiza identificaciones erróneas de las no incluidas. Sin embargo, no identificó las cepas de *T. asahii* ni la cepa de *T. ciferrii*, lo que puede deberse a diversos factores que habrá que analizar en futuros estudios, como características especiales de estas especies o de las cepas estudiadas, defectos en el espectro introducido como referencia o limitaciones del estudio molecular o bioquímico.



P52. *Rasamsonia argillacea* y *Scedosporium apiospermum* en paciente con fibrosis quística. Utilidad de MALDI-TOF en la identificación de estos hongos

C. Riazzo*, M.L. Serrano C. Miranda, Y. Hoyos, V. Heras, E. Martin, J.M. Navarro.

Servicio U.G.C.de Microbiología. H. U. Virgen de las Nieves. Granada.

Objetivo:

La colonización por hongos filamentosos es frecuente en pacientes con fibrosis quística (FQ). *Rasamsonia argillacea* (previamente *Geosmithia argillacea*) se ha asociado recientemente a algunos de estos pacientes. Presentamos el primer aislamiento en el esputo de un paciente con FQ en este hospital de *R. argillacea* en el que simultáneamente se aisló *S. apiospermum*.

Métodos:

El esputo, según el protocolo habitual para aislamiento de hongos filamentosos se sembró en agar Sabouraud y Mycobiotic a 30°C. Para la identificación se consideraron la morfología macroscópica y microscópica con azul de algodón lactofenol y la siembra en Sabouraud líquido para procedimiento de extracción e identificación con MALDI-TOF (Bruker Daltonik Germany). El hongo identificado como *Geosmithia argillacea* se remitió al ISCIII en Majadahonda para identificación definitiva mediante secuenciación del espacio interno transcrito (ITS) y pruebas de sensibilidad.

Resultados:

En Sabouraud se aislaron dos hongos filamentosos morfológicamente diferentes. El crecimiento del aislado 1 reveló una colonia de color crema a beige. En el examen microscópico se observaron características morfológicas similares a las de *Penicillium*. MALDI-TOF lo identificó como *Geosmithia argillacea* (score: 2.264). El ISCIII confirmó que se trataba de *R. argillacea* actual clasificación taxonómica de *G. argillacea*. En el estudio de sensibilidad se obtuvieron las siguientes CMI ($\mu\text{g/ml}$): anfotericina B=1, caspofungina=0.5, itraconazol=4, posaconazol>8, terbinafina=4 y voriconazol>8. Además, la segunda colonia aislada presentó características morfológicas compatibles con *Scedosporium spp.*, MALDI-TOF lo identificó como *S. apiospermum* (score 2.509).

Conclusiones:

Aunque el aislamiento de *R. argillacea* en pacientes con fibrosis quística no es usual, ha de considerarse como un posible colonizador de las vías aéreas en estos pacientes. Su presencia podría haberse infravalorado en años anteriores a la introducción de técnicas moleculares o proteómicas de identificación y podrían haberse identificado como *Penicillium* o *Paecilomyces*, dos géneros con similitudes morfológicas. Como en otros aislamientos de *R. argillacea* la CMI a voriconazol fue elevada. El uso de técnicas proteómicas se presenta como una herramienta útil en el diagnóstico micológico, permitiendo la identificación de hongos con características morfológicas similares.



P53. Evolución de los genotipos del VHP

Gutierrez-Aroca, J.B.*; Bañón, R.; Causse, M.; Casal, M.
Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Objetivos.

Queremos saber la prevalencia y la evolución del Virus del Papiloma Humano, y su relación con el cáncer de cuello de útero.

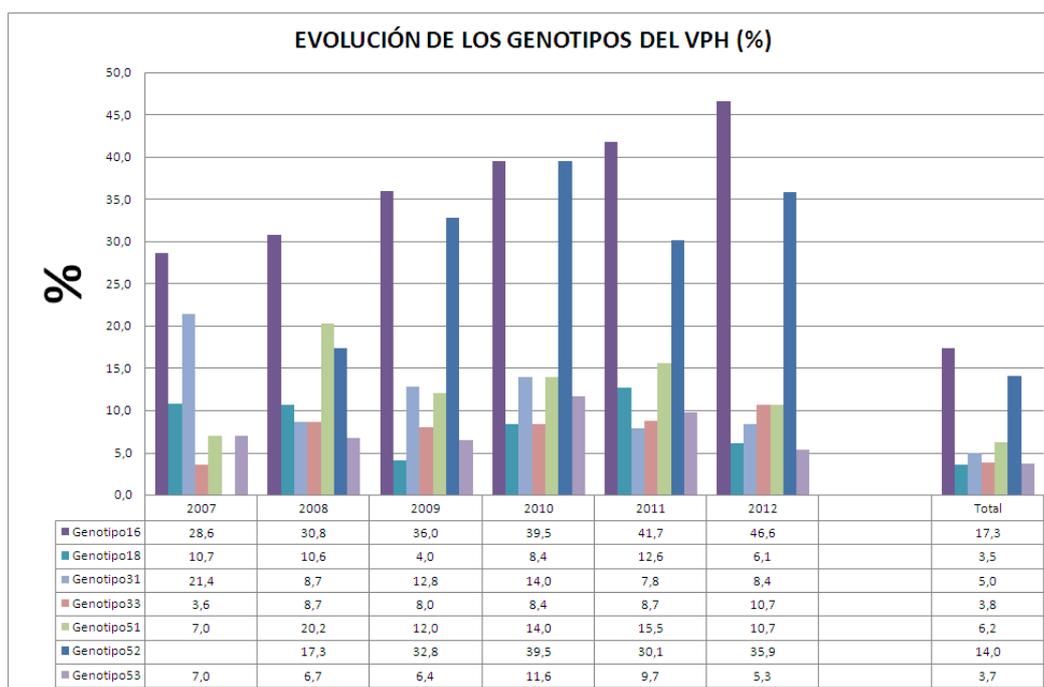
Material y métodos.

Se estudiaron los genotipos de Alto Riesgo de producir Cáncer de cuello de útero, durante 6 años en el periodo comprendido entre el año 2007 y el 2012. Se estudiaron un total de 3961 muestras de Exudado Endocervical de pacientes con sospecha de lesiones, de las que 1584 resultaron positivas.

La sistemática fue doble, microbiológicamente se les hizo directamente el genotipo a todas las muestras por la técnica de InnoLipa HPV Genotyping Extra de Innogenetics. Y por otro lado se les hizo el estudio citológico para determinar el grado de la lesión.

Resultados.

Solamente hemos seleccionado aquellos genotipos cuya incidencia ha sido significativa, y se expresan en la tabla y gráfica.



Conclusiones.

El genotipo que sigue siendo más frecuente en nuestro ambiente es el 16, seguido del 52, siendo el 18 el último de los seleccionados.

El genotipo 16 sigue siendo también el que más aparece en las lesiones más evolucionadas (CIN 3, o Cáncer) cuando van aisladamente, y cuando van asociadas a otros genotipos, las lesiones son menos evolucionadas.

En las lesiones premalignas hemos encontrado un porcentaje mayor con un solo genotipo, que cuando van asociadas a 2 ó más.

Hay pocas diferencias en los distintos genotipos a lo largo de los años.



P54. Estudio inicial de Genotipos de alto riesgo del Virus del Papiloma Humano en el área sanitaria de Ceuta.

J. López-Barba*, MJ. Jiménez, Y. Rodríguez, E. Morales, F. León, S. Hijnao, T. Orgaz, J. Díaz, S. Martínez.
S. Microbiología. Hospital Universitario de Ceuta.

Objetivos: Valorar los genotipos de virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo en mujeres con sospecha de patología de cérvix de causa oncológica. Distinguir por origen cultural (OC) y edad.

Métodos: Se han estudiado las muestras recibidas en los primeros seis meses de puesta en marcha de la técnica de detección y genotipado de HPV mediante prueba de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica utilizada ha sido LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche®). Se ha seguido la clasificación de "Muñoz N, Bosch FX ,et al" para la clasificación de los HPV en alto o bajo riesgo.

Resultado: Se han estudiado 119 muestras de las cuales en 30 (25.21%) se ha detectado al menos un genotipo de HPV de alto riesgo (AR). Las 119 muestras correspondieron a 94 pacientes de OC cristiano (OCC) en las que se detectaron 24 casos de HPV AR (25.21%) y 25 de pacientes de OC musulmán (OCM) en las que se detectaron 7 casos de HPV AR (28%). Los genotipos de HPV AR más frecuentes entre los casos positivos fueron HPV-16 (32.26%), HPV-18 (12.90%), HPV-51 (12.90%) y HPV-33 (12.90%). En pacientes de OCM los genotipos predominantes han sido HPV-16 (83.33%), HPV-35 (33.33%) y HPV-45 (16.66%). En los de OCC destacaron HPV-16 (16.66%), HPV-18. 33 y 51 cada uno de ellos con (13.33%). Las coinfecciones por HPV AR fue más frecuente en pacientes de OCM con un 42.85% de casos con más de un HPV AR, frente al 20.83% en pacientes de OCC. La media de edad de los casos positivos es de 32.25 años en pacientes de OCC y de 39.14 años en OCM.

Conclusiones: aunque el tamaño muestral es pequeño, en esta aproximación parece que los genotipos de HPV AR tienen una frecuencia diferente según el OC, predominando en OCM los genotipos 16,35 y 45 y en OCC los genotipos 16,18,33 y 51. Siendo más frecuente la detección de HPV AR y a una mayor edad en pacientes de OCM. De la misma forma hasta ahora no se contaba con un estudio previo de estas características y será necesario profundizar con un trabajo mucho más extendido para obtener datos definitivos. La correlación con las lesiones histológicas y la evaluación de los HPV de bajo riesgo completarán la futura línea de investigación.



P55. Evaluación preliminar del kit Anyplex HPV28 de Seegene para la detección de genotipos de alto riesgo en muestras de exudado endocervical

Causse, M*. Gutierrez-Aroca, JB. Casal, M.

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba)

Objetivos:

La relación entre el Virus del Papiloma Humano (VPH) y el cáncer de cérvix se ha determinado en muchos estudios; sin embargo no todos los VPH tienen el mismo poder de iniciar la transición de epitelio normal a neoplásico. Son por tanto los clasificados como de alto riesgo los que son de obligada detección en nuestros laboratorios de microbiología

El objetivo del estudio fue evaluar el nuevo kit de Seegene Anyplex HPV28 de PCR a tiempo real asociado a Temperatura de melting (lo que permite en un mismo canal detectar varios patógenos) en la detección de estos VPH de alto riesgo frente al utilizado habitualmente en nuestro laboratorio INNO-LiPA HPV (Imnogenetics) que se realiza en PCR convencional y se detecta en tiras de nitrocelulosa.

Resultados :

Se procesaron 60 muestras siguiendo los protocolos de extracción y PCR de ambas técnicas

22 muestras resultaron negativas para VPH de alto riesgo mediante las técnicas de hibridación reversa de las que en una de ellas resultó positiva el genotipo 39 mediante la PCR de Seegene

La concordancia total en genotipos se dio 21 casos positivos, la mayoría de ellos con varios genotipos concordantes de alto riesgo

En cuanto a las 17 muestras restantes hubo discrepancias entre los virus detectados en cada muestra. Anyplex detectó más genotipos de alto riesgo que INNO-LiPA HPV en 12 casos: tres genotipos 16, tres genotipos 39, tres genotipos 31, un genotipo 33, unos 26- 34 (misma muestra) y otro 66. Mientras que la situación se invirtió en 5 muestras: tres genotipos 52, uno 39, uno 53

Conclusiones:

Anyplex parece ser una técnica válida para la detección de genotipos de alto riesgo. En nuestra serie detectó más genotipos de alto riesgo que INNO-LiPA HPV además de rescatar un paciente que había resultado negativa por la técnica de hibridación reversa. Es una técnica más sencilla y rápida de realizar que INNO-LiPA HPV y evita las contaminaciones no deseadas de esta técnica.



P56. Límite de detección de antígenos de virus respiratorios con el sistema automatizado mariPOC[®]

S. Sanbonmatsu-Gómez*; I. Pedrosa-Corral; A. Lara-Oya; M. Pérez-Ruiz; M.A. Rivera; F. García-Maldonado; J.M. Navarro-Marí.

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada)

Introducción. El sistema automatizado mariPOC[®] (ArcDia, Finlandia) detecta simultáneamente 8 virus respiratorios [gripe A (FluA), gripe B (FluB), virus respiratorio sincitial (VRS), adenovirus (ADV), metapneumovirus humano (hMPV), parainfluenzavirus 1-3 (PIV1, PIV2, PIV3)] a partir de muestras nasofaríngeas. El analizador utiliza la tecnología ArcDIATM TPX para detectar antígenos virales mediante inmunofluorescencia, emitiendo un resultado preliminar a los 20 min para las muestras altamente positivas y el definitivo a las 2 h para las positivas débiles o negativas.

Objetivo. Determinar el límite de detección del sistema mariPOC[®] con cepas tituladas de virus respiratorios.

Material y Métodos. A partir de muestras clínicas se aislaron y propagaron en cultivo celular cepas de: FluA(H1N1y)pdm09 (FluA), FluB, VRS, ADV, hMPV, PIV1, PIV2 y PIV3, se alicuotaron y conservaron en N₂ líquido hasta su uso. Se inocularon por cuatuplicado diluciones de cada cepa en microplacas con líneas celulares adecuadas para cada virus y se titularon mediante el cálculo de la dosis infectiva 50 ("tissue culture infectious dose 50", TCID₅₀), según la fórmula de Spermán-Kärber. Las líneas celulares utilizadas fueron: MDCK-SIAT1 para FluA y FluB, LLC-MK2 para PIV1-3 y hMPV, Hep-2 para VRS y ADV. Se analizaron mediante el sistema mariPOC[®] diluciones decimales seriadas de las cepas tituladas por cuatuplicado (100µL de cepa por determinación), considerándose el límite de detección la mayor dilución en la que se obtenía un resultado positivo en las 4 repeticiones del análisis.

Resultados. Se obtuvo una TCID₅₀ de 10^{4,75} (FluA), 10⁵ (FluB), 10⁴ (VRS), 10⁴ (ADV), 10^{1,75} (hMPV), 10² (PIV1), 10^{6,25} (PIV2) y 10^{7,25} (PIV3). La máxima dilución que detectó MariPOC[®] fue: cepa sin diluir para PIV1 y FluA, 10⁻¹ para PIV2, PIV3, VRS y hMPV, 10⁻² para ADV y FluB, obteniéndose unos límites de detección, expresados en TCID₅₀/100 µL de: 10^{4,75} (FluA), 10³ (FluB), 10³ (VRS), 10² (ADV), 10^{0,75} (hMPV), 10² (PIV1), 10^{5,25} (PIV2) y 10^{6,25} (PIV3). La especificidad de la técnica fue del 100% ya que en ningún caso se detectó un virus distinto al incluido en el tubo de ensayo.

Conclusión. El sistema mariPOC[®] es capaz de detectar simultáneamente antígenos de 8 de los principales virus asociados a infección respiratoria con una elevada especificidad y buena sensibilidad analítica, siendo hMPV el que presentó el límite de detección más bajo, seguido por ADV y PIV1.



P57. Evaluación del sistema automático *Simplexa™ FluA/B&RSV Direct* para la detección molecular de gripe y virus respiratorio sincitial

I. Pedrosa-Corral; S. Sanbonmatsu-Gámez*; M. Pérez-Ruiz; J.M. Navarro-Marí.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada)

Simplexa™ FluA/B&RSV Direct (SPLX, *Focus Diagnostics*) es una técnica comercial de RT-PCR en tiempo real (PCR-TR) diseñada para detectar ARN de los virus de la gripe (Flu) A y B y virus respiratorio sincitial (VRS) directamente y de forma automatizada de escobillones del tracto respiratorio superior.

Objetivo. Evaluar el sistema SPLX para la detección de Flu y VRS en cualquier tipo de muestra respiratoria de pacientes hospitalizados con infección respiratoria aguda.

Métodos. Entre enero y junio de 2013, se realizó SPLX en aspirados (ANF) y exudados nasofaríngeos (ENF) de pacientes hospitalizados con solicitud de estudio de virus respiratorios. En muestras positivas a Flu A se realizó extracción de ácidos nucleicos para subtipado H1/H3 (PCR-TR). Se registraron los Cp (ciclo umbral de detección) de las muestras positivas por SPLX y del subtipado de Flu A.

Resultados. Se realizaron 404 determinaciones por SPLX, siendo 65 positivas a algún virus (16,1%): 45/274 procedían de ANF y 20/130 de ENF. Se detectó Flu A en 23 muestras (5,7%), Flu B en 18 (4,4%) y VRS en 24 (5,9%). El 100% de los casos de Flu A correspondieron al subtipo H1pdm09.

La diferencia media entre el Cp obtenido con SPLX en las muestras positivas a Flu A y el Cp obtenido en el subtipado fue de $0,15 \pm 2,08$.

Se invalidaron 38 SPLX (9,4%): 29 invalidaciones correspondieron a ANF y 9 fueron ENF. Se invalidaron 13/69 (18,85%) muestras directas, 6/27 (22,2%) muestras diluidas con MTV, y 19/308 (6,2%) muestras diluidas con agua.

El tiempo total de obtención de resultados es de aproximadamente una hora para el SPLX, y de unas tres horas para el subtipado.

Conclusiones:

1. *Simplexa™ FluA/B&RSV Direct* puede ser muy útil como determinación de urgencia en el laboratorio de microbiología, para facilitar el manejo del paciente y optimizar recursos, sobre todo durante las epidemias anuales de gripe y/o VRS.
2. SPLX permite detectar ARN de Flu A, Flu B y VRS en muestras respiratorias, tanto ANF como ENF.
3. La dilución de las muestras respiratorias con agua antes de preparar la reacción reduce de forma considerable el número de invalidaciones de la técnica.



P58. Evolución de los genotipos del VHB

Gutierrez-Aroca, J.B*; Bañón, R.; Causse, M.; Casal, M.
Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Objetivos

Queremos saber la prevalencia y evolución de los genotipos del Virus de la Hepatitis B, teniendo en cuenta el interés clínico de los distintos genotipos, desde el punto de vista de la patología, tratamiento y evolución clínica, también por su importancia epidemiológica.

Material y métodos

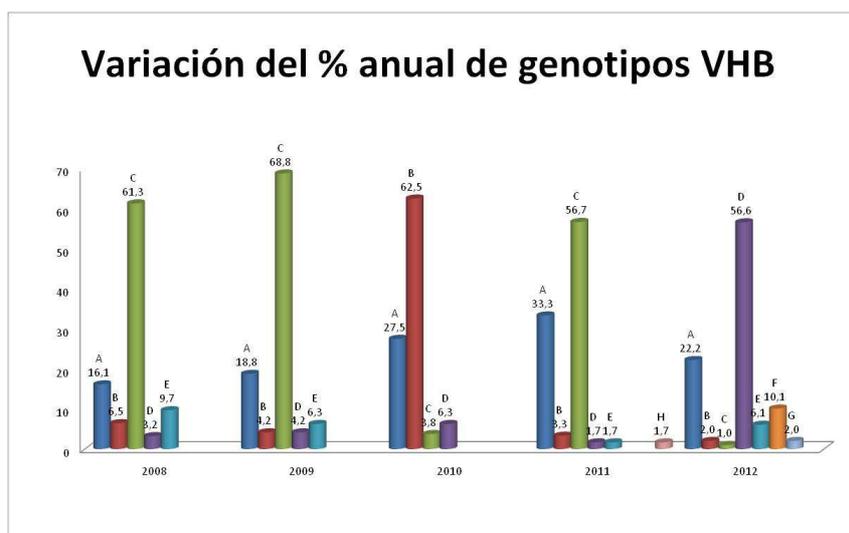
Se estudió un periodo de 5 años que abarca desde el año 2008 al 2012. Se estudiaron 318 genotipos de pacientes portadores del VHB.

Para sus determinaciones se utilizó el InnoLipa HBV Genotyping por la tecnología Innolipa de Innogenetics.

Resultados

Se han seleccionado aquellos genotipos cuya incidencia ha sido más significativa (A, B, C, D, E). Se expresan en la tabla 1 y gráfica 1.

Tabla 1	2008	2009	2010	2011	2012	TOTAL
Genotipos	%	%	%	%	%	%
A	16,1	18,8	18,8	27,5	33,3	24,5
B	6,5	4,2	4,2	62,5	3,3	18,2
C	61,3	68,8	68,8	3,8	56,7	28,3
D	3,2	4,2	4,2	6,3	1,7	20,4
E	9,7	6,3	6,3	0	1,7	4



Conclusiones

El genotipo más frecuentemente encontrado es el C, seguido del D, A y B, y el resto tiene escasa incidencia. Se ha encontrado una variabilidad notable a lo largo de los años estudiados.



P59. Evolución de las mutaciones del VHB a los antivirales

Gutierrez-Aroca, J.B.*; Bañón, R.; Causse, M.; Casal, M.
 Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Introducción.

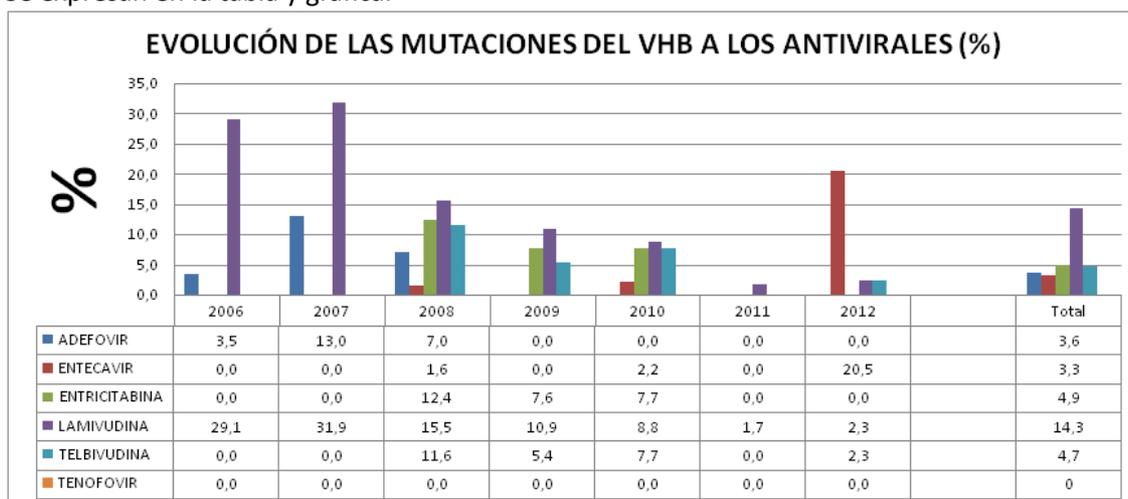
Debido a la cronicidad de la hepatitis por VHB y el consiguiente tratamiento prolongado, y la creación de resistencias a los antivirales habitualmente utilizados en la terapéutica. Es por lo que queremos conocer la incidencia y la evolución de la resistencia a los antivirales, en un periodo de 7 años.

Material y métodos.

Con este fin analizamos 614 muestras enviadas de la Consulta de Hepatología (Servicio de Digestivo) de nuestro hospital procedentes de pacientes con mala respuesta al tratamiento en los años 2006- 2012. Las mutaciones se han detectado mediante hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa con el sistema INNO-LIPA HBV DRv2 (Imnogenetics) utilizando un amplificado obtenido con un Hotstart Taq DNA Polimerasa de Quiagen tras extracción en Cobas Ampliprep con el Total Acid Isolation Kit (Roche).

Resultados.

Se expresan en la tabla y gráfica.



Conclusiones.

En ninguno de los antivirales se observó diferencias significativas en las mutaciones en relación con el año. Respecto a la multiresistencia se observa un incremento del año 2007 al 2008 del doble de cepas VHB que son resistentes a ambos antivirales. Aisladamente el adefovir sigue presentando poca resistencia, así como el tenofovir si lo comparamos con la que se genera frente a la lamivudina o entecavir.



P60. Evolución de los genotipos del VHC

Gutierrez-Aroca, J.B*.; Bañón, R.; Causse, M.; Casal, M.
Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Objetivos

Habida cuenta de la importancia en la clínica de la determinación del genotipo del Virus de la Hepatitis C por su diferente capacidad patógena y la respuesta al tratamiento y pronóstico de la Hepatitis Crónica, es por lo que queremos saber la prevalencia y evolución del VHC.

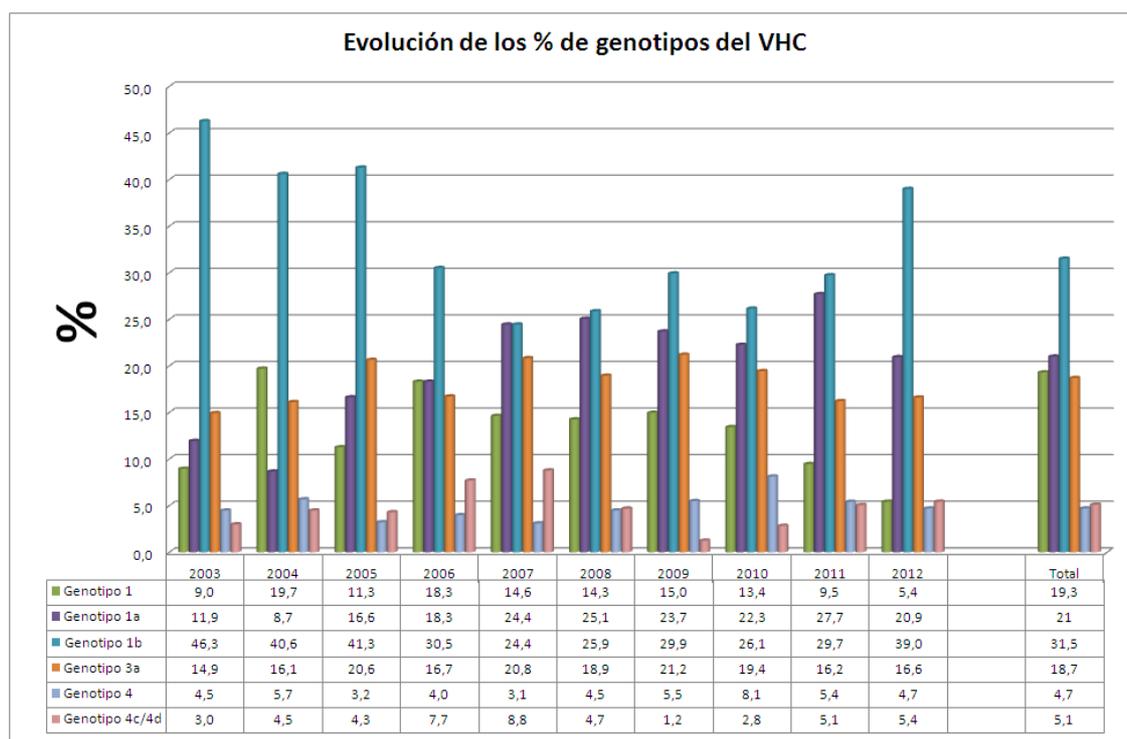
Material y métodos

El estudio abarca un periodo de 10 años, comprendido entre el año 2003 al año 2012, estudiándose los genotipos de 381 pacientes portadores del VHC.

Para su determinación se utilizó VERSANT HCV Genotype, por el sistema Innolipa de la casa Siemens.

Resultados

Solamente hemos seleccionado aquellos genotipos cuya incidencia ha sido significativa, y se expresan en la tabla 1, gráfica 1.



Conclusiones

El genotipo más frecuentemente encontrado es el 1, y dentro de este el subtipo 1b.
No encontramos diferencias significativas en los 10 años estudiados.



P61. Genotipos del virus de la hepatitis C en el área sanitaria del H. U. Virgen del Rocío en el periodo de enero 2010- agosto 2013

J. Liró Armenteros, M.C. Lozano Domínguez, M. Sánchez Agüero, L. Merino Díaz y J. Aznar Martín. Servicio de Microbiología y Parasitología H. U. Virgen del Rocío (Sevilla).

Objetivos: Describir la distribución de los genotipos del virus de la hepatitis C (VHC) en el área sanitaria del hospital Virgen del Rocío, así como la evolución de la demanda de los mismos, durante el periodo comprendido entre enero de 2010 a agosto de 2013, ambos incluidos.

Métodos: La extracción del ARN del VHC se realizó en el sistema COBAS Ampliprep®, la amplificación en el COBAS Amplicor® de Roche Diagnostics y la identificación del genotipo mediante el sistema de hibridación reversa VERSANT® HCV. Todo ello se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante. La obtención de los datos se realizó mediante el sistema Omnium aplicable al sistema informático de laboratorio Omega de Roche.

Resultados: Durante el periodo en estudio se recibieron 3488 solicitudes pertenecientes a 2987 pacientes de las que se realizaron 2013 determinaciones, no procediendo realizarse 1325. En la tabla 1 se refleja la distribución de solicitudes por año.

AÑO	PETICIONES SOLICITADAS	Nº PACIENTES	DETERMINACIONES REALIZADAS	DETERMIANCIONES NO REALIZADAS	NO PROCEDE
2010	1221	1003	717 (58.7%)	65 (5.3%)	439 (35.9%)
2011	1014	941	628 (62%)	34 (3.3%)	351 (34.6%)
2012	852	804	476 (55.9%)	37 (4.3%)	339 (39.8%)
2013	402	386	192 (47.8%)	14 (3.5%)	196 (48.7%)

Tabla 1

La distribución de los genotipos y subtipos por paciente encontrados están en las tablas 2 y 3:

Genotipo	Total
tipo 1	1130 (65%)
tipo 2	27(1.6%)
tipo 3a	334(19%)
tipo 4	240(14%)
Indeterminados	7(0.4%)

Subtipos	
1	46 (2.6%)
1a	442 (25.4%)
1b	634 (36.5%)
1a/1b	8 (0.5%)
2a/2c	26(1.5%)
2b	1(0.06%)
3a	334(19%)
4	17(1%)
4a/4c/4d	223(12.8%)

Conclusiones:

1. El genotipo predominante fue el 1 en un 65%, siendo el 1b el más frecuente con un 36.5%, seguido del 1a, 3a y 4a/4c/4d.
2. Salvo en dos pacientes el genotipo detectado cuando se solicitó por duplicado fue el mismo.
3. Hemos observado una disminución del número de solicitudes del genotipo del VHC así como una sensible disminución de las determinaciones realizadas.



P62. Distribución de los genotipos del virus de la hepatitis C en el Área Sanitaria del Hospital Universitario Puerto Real en un período de 12 años (2001-2012).

K. Rodière*, S. García Valdivia, C. Freyre Carrillo, S. Pérez Ramos.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Puerto Real, Cádiz.

Objetivo:

Conocer la distribución en nuestra área de los genotipos del virus de la hepatitis C (VHC) determinados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Puerto Real, de 2001 a 2012, en pacientes diagnosticados de infección por el VHC.

Métodos:

El estudio retrospectivo se llevó a cabo en 2427 muestras de plasma de pacientes infectados por el VHC atendidos en el área del Hospital Universitario Puerto Real. El diagnóstico de la infección se realizó mediante determinación en suero de anticuerpos anti-VHC con el inmunoensayo quimioluminiscente CMIA Architect anti-HCV (Abbott Diagnostics). Se estudió la carga viral cuantitativa mediante PCR-Taqman a tiempo real Amplilink (Roche Diagnostics). El genotipo VHC se realizó mediante el ensayo INNO-LiPA Versant HCV Genotype 2.0 (Siemens, USA). Los resultados fueron recogidos mediante el sistema Omnimium (Roche), y analizados con Microsoft Access. Se registraron 2964 solicitudes de genotipado, procesándose 2716 tras cribar las pruebas correctamente indicadas. 289 genotipos realizados fueron excluidos del estudio por resultar ser repeticiones de mismos pacientes genotipados anteriormente.

Resultados:

De los 2427 pacientes incluidos se estudiaron 1942, tras descartar 469 que no presentaron una viremia suficiente y 16 cuyo resultado no fue concluyente (genotipo no tipable):

- El genotipo 1 se encontró en 1225 pacientes (63,08%): tipo 1 en 169 (8,7%), tipo 1a en 382 (19,67%), tipo 1b en 628 (32,34%), y tipo 1a/b en 46 (2,37%).
- El segundo en frecuencia fue el genotipo 3 con 393 pacientes (20,24%): 261 tipo 3 (13,44%) y 132 tipo 3a (6,8%).
- Presentaron genotipo 4, 286 pacientes (14,73%): 133 (6,85%) tipo 4, 147 (7,58%) tipo 4a/c/d, y 3 pacientes con tipo 4b (0,15%). Se encontraron respectivamente en 3 pacientes 1 tipo 4e (0,05%), 1 tipo 4f (0,05%), y 1 tipo 4h (0,05%).
- En cuarta posición se situaron 35 genotipos 2 (1,8%): tipo 2 en 15 (0,77%), 2a/2c en 13 (0,67%), 2b en 7 (0,36%).
- El genotipo 5a fue hallado únicamente en un paciente (0,05%), y el genotipo 6a/6b en 2 (0,1%).

Respecto a la evolución de la distribución de los genotipos de 2001 a 2012, no hubo variación significativa de ninguno de los genotipos.

Conclusiones:

En nuestro ámbito asistencial, el genotipo más frecuentemente encontrado de 2001 a 2012 en pacientes con infección por el VHC fue el 1, en concreto el tipo 1b. La evolución de la distribución de los genotipos ha sido estable en el periodo de estudio.



P63. Tasas de resistencia a fármacos antirretrovirales en pacientes VIH-1 en fracaso terapéutico en el área norte de Sevilla (2010 – 2012)

J Machuca*, F Fernández-Cuenca, MI López-Hernández, MJ Ríos, A Pascual
H. U. Virgen Macarena. UGC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Sevilla

Objetivo: Determinar la prevalencia de las mutaciones y las tasas de resistencia a fármacos antirretrovirales en pacientes con infección VIH-1 en fracaso terapéutico atendidos en el área norte de Sevilla en el periodo 2010-2012.

Métodos: Se estudiaron 83 muestras de sangre-EDTA (n=33 en 2010, n=17 en 2011 y n=33 en 2012). La extracción de ARN se realizó con el sistema MagnaPure LC System (Roche). La secuenciación de los genes de la proteasa (PR) y retrotranscriptasa (RT) se llevó a cabo con el sistema TruGene HIV-1 (Siemens). La interpretación de las mutaciones se realizó de acuerdo con la guía de resistencias a los fármacos antirretrovirales de 2013 de la Red Española de Investigación en SIDA (RIS). Para el análisis de las tasas de resistencia a antirretrovirales se consideraron 2 categorías: sensible y resistente (incluye la categoría de resistencia intermedia).

Resultados: En la tabla 1 se recogen los porcentajes de secuencias con mutaciones en los genes de la RT y/o la PR. Las mutaciones más frecuentes en el gen de la PR fueron: 10I/F/V (19 secuencias), 46I/L (10), 71I/T/V (8) y 82A (4), mientras que en el gen de la RT fueron 184I/V (22), 103R/N/S (16), 215F/Y (7) y 181C (6). Como se aprecia en la tabla, los antirretrovirales con menor actividad fueron los ITI. El porcentaje de cepas multirresistentes fue del 2%.

La distribución de resistencias a antirretrovirales por familia y año se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Datos expresados en porcentaje (%).

Año	Mutaciones			Familia de fármacos						
	RT	PR	RT + PR	ITIAN	ITINAN	IP	ITIAN + ITINAN	ITIAN + IP	ITINAN+ IP	ITIAN + ITINAN + IP
2010	76	64	52	55	46	12	33	12	3	0
2011	47	53	29	24	41	0	18	0	0	0
2012	42	58	24	24	24	15	18	9	6	3
Total	57	59	30	36	36	11	24	8	4	2

IP: inhibidores de la PR; ITINAN: inhibidores de la TI no análogos de nucleósidos; ITIAN: inhibidores de la TI análogos de nucleósidos.

Conclusiones:

- 1) La prevalencia de mutaciones de resistencia a antirretrovirales en pacientes con infección VIH-1 en fracaso terapéutico es elevada. La mutación más prevalente fue la 184I/V (gen de la RT) y la 10I/F/V (gen de la PR).
- 2) La resistencia a fármacos AR es también relativamente elevada, particularmente para los ITI (36%), mientras que las tasas de multirresistencia son bajas (2%).



P64. Evaluación de la determinación de resistencias genotípicas de VIH-1 en muestras con carga viral inferior a 1000 copias/ml.

Marta Alvarez, Nieves Coronado, Vicente Guillot, Natalia Chueca, Jose Antonio Sánchez, Carmen Pérez, Federico García

Hospital Clínico San Cecilio, Servicio de Microbiología, Granada

Objetivo: las guías clínicas recomiendan realizar el estudio de resistencias frente a antirretrovirales cuando la carga viral supere las 1000 cp/ml, sin embargo metodológicamente es posible realizarla con valores inferiores. Nuestro objetivo ha sido evaluar la rentabilidad de la determinación de resistencias en pacientes con carga viral <1000 cp/ml.

Pacientes y Métodos: para el estudio genotípico de mutaciones se emplea el sistema de secuenciación: Trugene HIV-1 (Siemens), valorándose las mutaciones de IAS. La interpretación de resistencias se realiza con el algoritmo de Stanford. Al ser muestras con carga viral inferior a 1000 cp/ml se realiza una concentración previa a partir de 2500 µl de muestra. La determinación de la carga viral se realiza con el sistema Taqman HIV v2.0 Roche Assay. Se analizan 256 muestras de pacientes VIH-1 en el período 2011- junio 2013.

Resultados: la mediana de edad fue de 46.68 años [IQR: 41.89-52.35], 78.9% de hombres, 11.8% de subtipos no-B de los que disponen de secuencia. La mediana de carga viral fue 200 cp/ml [IQR: 112.25-362.75] y los tratamientos que recibían eran: 2NRTIs+NNRTI (29.4%); 2NRTIs+IP (27.1%); combinaciones con RTG (17.3%); monoterapia con IP (14%); combinaciones con MRV (6.5%) y naive (5.6%). Del total de las muestras analizadas se consigue amplificar 227 muestras (88.7%). Cuando realizamos un análisis más detallado por intervalos de carga viral (desde <100 hasta >700, registrando intervalos de 100 copias entre cada grupo) observamos una distribución homogénea que varía desde un 83.33% al 100% de éxito en la amplificación. El 28.6% de las secuencias analizadas tenían alguna mutación en la RT, siendo la K103N (15.9%) las más abundante, seguida de M184VI (9.3%), M41L (6.6%), D67N (6.2%), T215YF (4.8%) y K219EQ (4.8%). En la proteasa el 94.72% de las secuencias tenían alguna mutación del listado del IAS, siendo la L63P la más abundante con un 48.5%, seguida de la M36ILV (34.4%) y I64LMV (31.4%). El 19.8% presentan algún grado de resistencia frente a NRTIs, el 22.5% a NNRTIs y el 10.1% a IPs. El porcentaje de pacientes con virus con mutaciones de resistencia en los distintos intervalos de carga viral no presenta diferencias.

Conclusiones: La rentabilidad de la secuenciación empleando un método de concentración previo de la muestra cuando la carga viral es inferior a 1000 es muy buena. En todos los estratos de carga viral por debajo de 1000 se detectan mutaciones que podrían guiar un futuro cambio terapéutico.



P65. Escasa prevalencia de mutaciones de resistencia a Rilpivirina en pacientes naïve del sur de España. Estudio comparado Sanger/Secuenciación Masiva.

Natalia Chueca, Raquel Camacho-Luque, Nora Mariela Martínez, Marta Alvarez, Josefa López, Lina Martín, Federico García

Hospital Clínico San Cecilio, Servicio de Microbiología, Granada. ²Dept. Bioquímica y Biología Molecular II, Universidad de Granada.

Objetivo: Rilpivirina es un no análogo de los nucleósidos con actividad antiviral frente a VIH-1. En nuestro estudio hemos utilizado la tecnología Sanger y 454 GS-Junior para evaluar la prevalencia de mutaciones de resistencia asociadas a Rilpivirina (RAMs) en pacientes recientemente diagnosticados en el sur de España.

Material y métodos: estudiamos 91 pacientes nuevos diagnósticos [96,4% varones, edad media 36 (IQR 31-45), mediana de carga viral de 110.000 copias/ml (IQR 30.141-461.930), mediana de CD4 456 (IQR 325-601)]. Se han evaluado las RAMs a Rilpivirina definidas por el IAS (International Aids Society); estas mutaciones se han estudiado mediante secuenciación Sanger (Trugene, Siemens NAD) y Secuenciación de Nueva Generación (NGS) con tecnología 454 en GS-Junior (Roche Diagnostics). Para el análisis bioinformático de 454-NGS se han utilizado DeepChek[®]-VIH v1.1 y VisibleChek[®] (ABL).

Resultados: utilizando la secuenciación de Sanger, la prevalencia de RAMs a Rilpivirina fue 7,7% (7/91). La mayoría de estos pacientes (5/91-5,5%) presentaron la mutación E138A, una mutación con escaso impacto sobre la actividad de Rilpivirina; un paciente mostró Y188L y otro Y181C, con una prevalencia del 2,2%. Con el ensayo NGS-454 (nivel de detección al 1%) encontramos un aumento en la detección de mutaciones de resistencia asociadas a Rilpivirina en 11 pacientes (12%); con NGS-454 E138A/G/K eran las mutaciones más prevalentes (8/91, prevalencia de 8,8%); se detectaron estas mutaciones con una frecuencia media de 6,5% (1,6 a 80) y con una carga mutacional media de 9.281 copias/ml (562-441810). M230I se detectó en 2 pacientes (2,2%), y M230L y Y188L en 1/91 (1.1% respectivamente). No se detectaron las mutaciones K101P o Y188I/V.

Conclusiones: Hemos detectado una baja prevalencia de resistencia transmitida a Rilpivirina. Esta baja prevalencia se mantiene incluso analizando las muestras mediante secuenciación masiva, usando un punto de corte del 1%. Las mutaciones E138A, mediante secuenciación Sanger, y E138A/G/K, utilizando NGS-454, están presentes en la mayoría de los pacientes en los que se detectan RAMs a Rilpivirina.



P66. Prevalencia de resistencias primarias a los inhibidores de la proteasa, estudiadas mediante secuenciación masiva-UDS en pacientes naïve a tratamiento antirretroviral.

Raquel Camacho-Luque, Natalia Chueca, Marta Alvarez, María Dolores Mérida, Vicente Guillot, Federico García

Hospital Clínico San Cecilio, Servicio de Microbiología, Granada

Introducción: las técnicas de secuenciación masiva de genomas únicos (UDS) han demostrado su utilidad clínica para guiar la elección de un tratamiento de inicio basado en NNRTIs. Los datos disponibles sobre los Inhibidores de la proteasa son controvertidos. En este trabajo presentamos los datos de resistencias en la proteasa en una cohorte de pacientes nuevos diagnósticos y naïve a tratamiento antirretroviral.

Pacientes y Métodos: Se han analizado muestras de plasma de 89 pacientes nuevos diagnósticos de VIH y naïve a tratamiento antirretroviral [edad, mediana 37 (IQR31-45); CD4, mediana 456 (IQR323-600); CV, mediana 5 logs (IQR 4,47-5,66); 92% hombres]. La proteasa se secuenció mediante Sanger (Siemens NAD) y mediante secuenciación masiva-UDS- en un GSJunior (Roche). Para el análisis de las secuencias obtenidas mediante UDS y Sanger, se utilizó el software DeepChek®-HIVv1.2 (ABL-SA). Para el análisis de mutaciones, hemos valorado las mutaciones con una puntuación de Stanford 6.2.0 ≥ 5 evaluando aquellas mutaciones presentes por encima del 1%, 5%, 10% y 15%.

Resultados: Todos los pacientes pudieron analizarse mediante UDS al 15 y al 10%, mientras que 87 fueron evaluables al 5% y 73 al 1%. Mediante secuenciación de Sanger, hemos detectado cualquier mutación con un score ≥ 5 en 5/89 pacientes. Mediante UDS, este número aumentó hasta 6 pacientes al 5% y 14 pacientes al 1%. Tras la interpretación de las resistencias, mediante Sanger, sólo 1 paciente tuvo resistencia intermedia a Atazanavir, y ninguno a Darunavir o Lopinavir. Mediante UDS, los resultados de resistencia se mantienen idénticos tanto al 15 como al 10%. Con el punto de corte del 5%, sólo 1 paciente más mostró resistencia a Atazanavir, y ninguno a Darunavir o Lopinavir. Al 1%, encontramos un total de 6 pacientes con algún grado resistencia: dos pacientes con resistencia intermedia a Darunavir y resistentes a Lopinavir y Atazanavir, dos pacientes con resistencia Intermedia a Lopinavir y Atazanavir, y otros dos pacientes sólo con algún grado de resistencia a Atazanavir.

Conclusiones: la resistencia primaria a los Inhibidores de la Proteasa, aún utilizando técnicas de secuenciación masiva que detecten variantes al 1%, es muy baja en nuestra cohorte. En vista a esta baja prevalencia, la detección de mutaciones de resistencia primaria en la proteasa puede no ser coste efectiva, incluso utilizando técnicas de secuenciación masiva.



P67. Investigación de mutaciones de resistencia primaria a los inhibidores de la integrasa del VIH mediante secuenciación masiva de genomas únicos.

Jose Fernandez-Caballero, Natalia Chueca, Vicente Guillot, Marta Alvarez, Josefa López, Federico García

Hospital Clínico San Cecilio, Servicio de Microbiología, Granada

Objetivos: nuestro grupo de trabajo ha comunicado recientemente la escasa prevalencia de transmisión de mutaciones de resistencia a los inhibidores de la integrasa de VIH en los nuevos diagnósticos. Algunas guías de tratamiento recomiendan una especial atención a la transmisión de resistencia en la integrasa, cuando se detectan resistencias transmitidas a otras familias (inhibidores de la RT y proteasa). En este estudio hemos analizado mediante secuenciación masiva (UDS) la integrasa viral en los pacientes nuevos diagnósticos con evidencia de transmisión de resistencias en RT y/o PRO.

Pacientes y Métodos: Estudio Analítico Observacional en 138 pacientes nuevos diagnósticos de Andalucía Oriental. Además de secuenciar la RT y la proteasa, se secuenció (Sanger) la integrasa viral. Se ha evaluado la presencia de mutaciones primarias (E92Q, Y143RHC, Q148RHC y N155H), secundarias (T97A, L74M, E138AK, G140ACS, S147G, V151I, N155S, E157Q, I203M, S230NR). En 10 pacientes en los que se detectaron mutaciones de resistencia en RT y/o Proteasa, se ha investigado además, mediante secuenciación de genomas únicos (UDS), la presencia de variantes minoritarias de mutaciones de resistencia en la integrasa.

Resultados: La media de edad de la población estudiada fue de 37 años (20-58), el 78,3% eran hombres, un 13,8% eran HMX y un 32,6% eran HTX. Las medianas de Carga viral (log₁₀) y CD4 en el momento del diagnóstico fueron, respectivamente 4,9 (IQR: 1.38-6,85) Y 323 (IQR: 111-494). En cuanto a los subtipos, un 20,2% de los pacientes estaban infectados por subtipos no-B. Mediante secuenciación de Sanger, no se ha encontrado ningún caso de transmisión de mutaciones de resistencia primaria en la integrasa. En los 10 pacientes en los que se ha realizado UDS, las mutaciones más prevalentes en RT/PRO fueron la K103N, T215S y K219Q. En la integrasa tampoco hemos detectado mutaciones primarias/secondarias adicionales mediante UDS, aunque si se han detectado polimorfismos no detectados por Sanger, con un rango de detección entre 1.39 y el 12.46%. La mediana de secuencias investigadas mediante UDS ha sido de 6430 (IQR 4615-6808).

Conclusiones: Los resultados de nuestro estudio muestran que la presencia de mutaciones de resistencia primaria a inhibidores de la RT/PRO, no condiciona la transmisión de mutaciones en la región de la integrasa, ni siquiera cuando estas se investigan mediante secuenciación masiva de genomas únicos.



P68. Rescate con dolutegravir en pacientes que fracasan a un inhibidor de la integrasa de primera generación

Marta Alvarez, Vicente Guillot, Lina Martín-Hita, Natalia Chueca, Alejandro Peña, María Dolores Mérida, Josefa López, Federico García. HU San Cecilio. Granada

Introducción: Dolutegravir (DTG) es un inhibidor de la integrasa (INSTI) de VIH de segunda generación. Además de su mejor perfil de seguridad, demuestra mayor barrera genética a la resistencia que los INSTIs de primera generación. Analizamos la rescatabilidad con DTG de los pacientes que fracasan al tratamiento con Raltegravir (RTG), un INSTI de primera generación.

Pacientes y métodos: hemos analizado todos los pacientes con fracaso a RTG remitidos para el análisis de resistencia en la integrasa a nuestro centro de referencia de Andalucía Oriental. La secuencia de la integrasa se analizó con un protocolo "in house" empleando la plataforma de Trugene HIV-1 (Siemens). Para la resistencia a DTG consideramos Resistencia Intermedia cuando presentaban Q148HKR + 1 de: L74I, E138AKT, G140ACS; y Resistencia con Q148HKR \geq 2 de: L74I, E138AKT, G140ACS (Vavro, Intl HIV & Hepatitis Workshop, 2013). También estudiamos la interpretación empleando el algoritmo de Stanford.

Resultados: se han estudiado 77 pacientes, 68.8% hombres, edad (mediana) 46.8 años [IQR: 41.1-51.6], log carga viral (mediana) 3.5 copias/ml [2.5-4.8], CD4 (mediana) 244 células/ μ l [101-460]. Raltegravir se acompañó de uno o más análogos de los nucleósidos (NRTIs) y un inhibidor de la proteasa (IP) en un 30.3%; de maraviroc + NRTI ó NNRTIs o IP en un 22.4%. El 22.1% presentan mutaciones frente a INSTIs, siendo la mutación N155H (13%) la más prevalente, seguida de T97A (7.8%), L74I (3.8%), Q148H (2.6%) y con un 1.3% G140S, T66I y Y143C. Un 18.2% de los pacientes presenta algún grado de resistencia a RTG según Stanford: 10 casos con la mutación N155H, en 4 casos acompañada de: V151I, T97A o Q95K; dos casos con Q148H uno de ellos junto con G140S; y un caso con T66I+T97A. Para DTG, siguiendo la interpretación de Stanford, encontramos 4 casos con resistencia intermedia (Q148H+G140S, n=1; Q148H n=1; N155H+T97A; n=2). Según el Algoritmo propuesto por Vavro, hallamos sólo un caso (1.3%) con resistencia intermedia a DTG (Q148H + G140S). No detectamos ningún caso con la mutación E138AKT y 3 casos con solo la L74I.

Conclusiones: la resistencia a DTG en pacientes que fracasan a RTG es poco frecuente, lo que hace de este fármaco una excelente alternativa para el rescate de pacientes que fracasan a los INSTIs de primera generación.



P69. Himenolepiosis en niños magrebíes recibidos en adopción temporal en Cádiz

I. Guerrero-Lozano, L. García-Agudo, P. Aznar-Marín, F. Galán-Sánchez, P. García-Martos, M. Rodríguez-Iglesias.

UGC de Microbiología. del Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Objetivos

Dado que en nuestra ciudad se recibe en adopción durante el verano a niños procedentes del Magreb, hemos revisado la incidencia y epidemiología de himenolepiosis en la población magrebí atendidos para control parasitológico en nuestro hospital.

Material y métodos

Realizamos un estudio descriptivo retrospectivo de los niños marroquíes y saharauis, menores de 14 años, atendidos durante los años 2001-2011 en el H.U. Puerta del Mar de Cádiz, dentro del programa de salud instaurado para estos niños, en estos años. Se tomaron muestras de heces por defecación espontánea y por triplicado, preservadas con formol al 10%. Se realizó examen directo macro y microscópico, y posteriormente las heces se concentraron con la técnica de Ritchie para visualización microscópica en fresco con lugol. De todos los niños parasitados se recogieron datos epidemiológicos: sexo, edad, procedencia, estacionalidad y coparasitación.

Resultados

Durante el período de estudio se procesaron 421 muestras de niños magrebíes. Se identificaron 44 casos de infección por *Hymenolepis nana* (10,4%). Los parasitados eran 27 niños y 16 niñas, de entre 6 a 12 años de edad (media 10,2), 9 marroquíes y 35 saharauis. Todos los casos se diagnosticaron en los meses de julio y agosto. Existía coparasitación en 39 niños (88,6%): 14 niños con 2 parásitos, 12 niños con 3, y 14 con 4 ó más parásitos. Los parásitos encontrados en los casos de parasitación múltiple fueron: 23 *Blastocystis hominis*, 20 *Entamoeba coli*, 14 *Giardia lamblia*, 13 *Endolimax nana*, 8 *Entamoeba histolytica*, 3 *Chilomastix mesnili* y 2 *Iodamoeba bütschlii*.

Conclusiones

Las parasitosis son frecuentes en niños procedentes de países en vías de desarrollo. En niños magrebíes la incidencia es elevada. La himenolepiosis en esta población, según la literatura, constituye en torno a un 10%, al igual que sucede en nuestra serie. En la mayoría de los niños con *Hymenolepis nana* la parasitación es múltiple y un 59% presentan mas de tres parásitos, predominando entre éstos *Blastocystis hominis* y *Entamoeba coli* entre los parásitos acompañantes. El control parasitario de los niños recibidos en acogida temporal de países con parasitosis endémicas es recomendable para evitar problemas de salud.



P70. Infestación por *Strongyloides stercoralis* en una paciente inmunocompetente con eosinofilia.

M. J. Muñoz Dávila^{*1}, J. E. Gómez Hernández², M. L. Núñez Trigueros¹, A. Marín Cervantes¹.

¹Laboratorio de Microbiología, Hospital General Universitario Reina Sofía, Murcia.

²Consultorio de Barriomar, E.A.P. Bº del Carmen, Murcia.

Objetivo: *Strongyloides stercoralis* es un nematodo intestinal endémico en regiones tropicales. Normalmente, la infección es asintomática o con manifestaciones leves e inespecíficas. Sin embargo, la infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos presenta elevadas tasas de mortalidad. Presentamos el caso en una mujer de 45 años, madre de tres hijos, natural de Bolivia, que reside en Murcia desde el año 2008, con visitas ocasionales a su país de origen.

Métodos: como antecedentes de interés en la historia clínica de la paciente destaca en analíticas generales solicitadas por su médico de atención primaria (M.A.P.) desde el año 2009: eosinofilia (% de eosinófilos: 14.1 [0-8], recuento de eosinófilos: $1.3 \times 10^3/\mu\text{l}$ [0-0.4]) y trombocitosis ($461 \times 10^3/\mu\text{l}$ [140-450]) persistente. En 2010 refiere pirosis que es tratada con inhibidores de la bomba de protones. En 2011 consulta por meteorismo, vómitos biliosos y dolor en hipocondrio derecho. En 2012 es tratada con domperidona tras hallazgo en ecografía de vesícula hidrópica de paredes engrosadas. En Julio de 2013 tras ecografía normal y ante eosinofilia persistente se solicita examen de heces en una única muestra. La paciente no presentó en ningún momento fiebre, urticaria, pérdida de peso o tos. Sin otros antecedentes relevantes.

Resultados: en el examen de heces en fresco con lugol previa concentración mediante el kit comercial Mini Parasep® SF (diaSys) se observaron abundantes larvas rabditiformes de *S. stercoralis* (01/07/2013). Posteriormente, en otra muestra de heces remitida el 15/07/2013 no se observaron elementos parasitarios. En Agosto de 2013 se remitieron 3 nuevas muestras de heces seriadas observándose en todas ellas abundantes larvas rabditiformes del parásito. Debido a la ausencia de síntomas respiratorios, no se remitieron muestras para la detección del parásito en dicha localización. La paciente inicia tratamiento con ivermectina (200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ oral durante 2 días). Desde entonces no ha acudido nuevamente a consulta.

Conclusiones: es importante la sospecha clínica de *S. stercoralis* en pacientes con eosinofilia persistente, procedentes de áreas endémicas. El diagnóstico de las formas crónicas asintomáticas de infección por este parásito es especialmente importante en aquellos pacientes candidatos a terapia inmunosupresora, por el riesgo de enfermedad diseminada.



**P71. *Demodex folliculorum*, ectoparásito responsable de blefaritis crónica.
Descripción de un caso clínico.**

Franco-Álvarez de Luna, F., Santos Rosa, C., Fernández-Villalón, JA

Unidad de Microbiología, UGC Laboratorios Clínicos. UGC de Oftalmología.

Hospital General de Riotinto. Área Sanitaria Norte de Huelva.

Objetivo: La blefaritis es una enfermedad crónica muy frecuente de la superficie ocular que implica una gran variedad de procesos inflamatorios palpebrales y presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas. El objetivo de este trabajo es, la descripción de un caso de blefaritis crónica por *Demodex folliculorum*, que se ha producido en nuestro centro, destacar la sencillez de su diagnóstico en colaboración con Oftalmología, así como sus signos, síntomas y posibilidades terapéuticas.

Material y Método: Paciente de 16 años de edad que acude a la consulta de oftalmología por un cuadro clínico inicial de blefaritis crónica que no responde a los tratamientos empíricos habituales. La paciente fue valorada por el oftalmólogo que realizó una exploración biomicroscópica en lámpara de hendidura. Entre los signos exploratorios, destacaron la presencia de escamas y costras en forma de collarotes en la base de las pestañas, hiperemia, telangiectasia en margen palpebral y triquiasis. (fig 1.) Ante la sospecha clínica infecciosa inicial, se realizó la toma de muestra de exudado conjuntival y se extrajeron 10 pestañas, alternado la extracción de cada ojo y párpado, que se remitieron inmediatamente al Laboratorio de Microbiología, donde se montó una preparación en fresco de las pestañas, sobre porta y cubre, a la que se adicionaron 20µl de suero fisiológico y se realizó la visualización de todas ellas, bajo observación microscópica 10X y 40X.

Resultados: La exploración microscópica de las pestañas permitió confirmar la presencia de un ácaro, identificado como *Demodex folliculorum* (fig 2,3 y 4). Las principales características morfológicas que permitieron su identificación, fueron su forma elongada, sus 4 pares de patas cortas, a modo de muñones, y la estriación transversal del opistosoma. El cultivo del exudado conjuntival resultó negativo a las 48h de incubación. El índice de parasitación ácaros/pestañas (a/p), en nuestro caso fue de 8 ácaros por 10 pestañas extraídas (0,8). Este índice o carga parasitaria está relacionado directamente con la intensidad de los síntomas y manifestaciones clínicas. Nuestra paciente fue tratada empleando, limpieza de párpados y pestañas con solución de higiene palpebral a base de ácido bórico al 1,5%, borato sódico al 0,3%, EDTA disódico al 0,1%, polisorbato al 2%, propilenglicol al 1,9% (Cilclar®), dos veces al día. Solución de permetrina al 1-1.5% (Filvit®) 1 vez/semana, aplicación de pomada a base de permetrina al 5 % 1 vez/semana y metronidazol tópico al 2% cada 24h 2 semanas. La revisión de la paciente se realizó transcurridas cuatro semanas comprobándose una mejoría objetiva (menor descamación y número de collarotes, además de un aumento de tiempo de ruptura lagrimal) y subjetiva (mejoría de escozor, picor y sensación de cuerpo extraño)

Conclusiones: Aquellos pacientes que presenten blefaritis crónica, resistente a los tratamientos empíricos habituales, debe investigarse la presencia de *Demodex folliculorum*. La detección de *Demodex folliculorum*, mediante visualización microscópica de las pestañas del paciente, es un método fácil, y asequible a todos los laboratorios de diagnóstico clínico, en colaboración con Oftalmología.



ÍNDICE DE AUTORES

Alados Arboledas, Juan Carlos. O10, P35.
Alferez García, Inmaculada. P11.
Aller García, Ana Isabel. O09,P49.
Alvarez Estevez, Marta. O12, O14, O16, P17, P40, P64, P65, P66, P67, P68.
Amores Antequera, Carmen. P32.
Artacho Reinoso, María José. O02, O08, P06, P28, P39, P41.
Ávila Alonso, Ana. P20.
Azañedo, Luisa. P13.
Aznar Marin, Pilar, P04, P47, P50, P69.
Aznar Martín, Javier. O02, O08, P03, P06, P28, P29, P39, P41, P61.
Ballestero Téllez, Mónica. P01, P08.
Bañón Arias, Rafael. P45, P53, P58, P59, P60.
Barbancho, Alejandro. P40.
Barrero, Ana. P13.
Batista Díaz, Nínive. P08.
Bautista, Verónica. P13
Béjar, Lucía. O11.
Bernal Martínez, Samuel. O13, P31.
Briales, Alejandra. P16.
Cabrera Alarcón, José Luis. P37.
Cabrera Alvargonzalez, Jorge Julio. P15.
Camacho Luque, Raquel. O14, P17, P37, P40, P65, P66.
Campaña-Martín, Laura. P18.
Cantos de la Casa, Ángel. P29.
Cantudo Muñoz, Purificación. P32.
Caro Gómez, Natalia. P22.
Carolina Freyre Carrillo, Carolina. O05, P36, P62.
Carrasco, José Ramón O10.
Casal Roman, Manuel. O04, P05, P44, P45, P46, P53, P55, P58, P59, P60.
Casas-Ciria, Francisco Javier. P10.
Castro Fernández, Manuel. P25.
Castro, Carmen, O09.
Causse de Río, Manuel. O04, P05, P44, P45, P46, P53, P55, P58, P59, P60.
Cejudo García, María Aurora. P38.
Chávez Caballero, Mónica. P13.
Chueca Porcuna, Natalia. O14, O16, P17, P18, P37, P40, P64, P65, P66, P67, P68.
Clavijo Frutos, Encarnacion. O15, P09, P14, P23, P30, P34, P42.
Conejo, Carmen. P14.
Coronado, Nieves. P64.
Cuadros Moronta, Elena. O03, P26, P27.
Dayaldasani Khialani, Anita. O15, P09, P14, P34.



Del Gigia Aguirre, Laura. P11.
Delgado Valverde, Mercedes. O07, P08.
Díaz de Alba, Paula. P16.
Díaz Portillo, JacobO. P54.
Domínguez Alavis, Concepción. P01.
Domínguez Castaño, Ana María. O06, P20, P33.
Domínguez Jiménez, M^a Carmen. P02.
Dominguez Rivas, Yolanda. P09.
Expósito, Sebastián. P13.
Fernández Cuenca, Felipe. O01, P63.
Fernández de Liger Serrano, Jose Luis. O06, P33.
Fernández Gutiérrez del Álamo, Clotilde. O12, P07, P22.
Fernández Villalón, José Angel. P71.
Fernandez-Caballero, Jose. P67.
Florez, Carmen. P49.
Fontana, Luis. P18.
Franco Alvarez de Luna, Francisco. O06, P21, P71.
Galán-Sánchez, Fátima. P07, P22, P24, P47, P50, P51, P69.
Gallegos Merino, Jose Maria. P09, P30, P42.
Galoso, Antonio. P13.
García Agudo, Lidia. P47, P69.
García Álvarez, María Teresa. O12.
García García, Federico. O12, O14, O16, P17, P18, P37, P40, P64, P65, P66, P67, P68.
García López, María Victoria. P09, P14, P30, P34.
García Maldonado, Francisca. P56.
García Martos, Pedro. P07, P22, P47, P50, P51, P69,
García Muñoz, Sergio. P11.
García Valdivia, Soledad. P62.
García Vela, José H. P21.
García-Navarrete, África. P10.
García-Tapia, Ana María. P07, P22, P24, P50,
Gil Tomás, Jesús. P20.
Gil, Antonio. P18.
Gómez Fernández, Laura. P32.
Gómez Gómez, María José, O02.
Gómez Hernández, Jesús Esteban. P70.
Gómez Pastrana, David. O10.
Gómez Romano, Teresa. P51.
Gómez Sánchez, M^a Carmen. P02.
Gómez-Camarasa, Cristina O11.
Gonzalez Domenech, Carmen María. O15.
González-Galán, Verónica. O08, P39, P41.
Gracia Ahufinger, Irene, P05.



Guerrero-Lozano, Inmaculada. O12, P07, P22, P24, P47, P50, P51, P69.
Guillot Suay, Vicente. P17, P40, P64, P66, P67, P68.
Gutierrez Fernandez, José. P26, P27.
Gutierrez-Aroca, Juan Bautista. O04, P44, P45, P46, P53, P55, P58, P59, P60.
Heras Cañas, Víctor José, P26, P52.
Heras Moreno, María Isabel de las, P19.
Hoyos Mallecot, Yannick. O03, P15, P52.
Iglesia Salgado, Matilde de la, O06, P20, P33,
Iglesia Salgado. Alberto de la, O06, P20.
Jesus de la Calle, Iria. P04.
Jimenez Aguilar, Patricia. P04.
Jímenez Gallardo, Jose Luis. O07.
Jiménez Gómez, María José. P54.
Lamas, Eloísa. P25.
Lara Oya, Ana. P56.
Leiva Tapia, Emilio. P38.
León Rivera, Francisca. P54.
Lepe Jiménez, Jose Antonio. O02, P03, P06, P41.
Liébana Martos, Carmen. P15, P27.
Liébana Ureña, José. P37.
Liró Armenteros, Julia. P61.
López Barba, José. P54.
López Cárdenas, Salvador. P35.
López Fernández, María Jesús. P42.
López Hernández, María Inmaculada. O01, P63.
López Prieto, M^a Dolores. O10, P35.
López Sánchez, Manuel. P25.
López, Josefa. O16, P65, P67, P68.
López-Cerero, Lorena. P01, P12.
Loza, Ana. O09.
Lozano Domínguez, María del Carmen. P61.
Luchi, Maria Dolores de, P13.
Luna, Salud. P12.
Machuca Barcena, Jesús. O01, P16, P63.
Macías, Desiré. O09.
Mancebo, María. O13.
Marín Casanova, Pilar. P07, P22, P50, P51.
Marín Cervantes, Antonio. P43, P70.
Marín Martínez, Elena María. P48, P49.
Márquez Sanabria, Adriana. O06, P20, P33.
Martín Gutiérrez, Guillermo. P03, P29.
Martín López, Eloísa. P19, P52.
Martín Pérez, Carlos. P03.



Martínez Lirola, Miguel José. P11, P38.
Martínez Llamas, María Soledad. P54.
Martínez Rubio, Carmen. 005, P36.
Martínez, Nora Mariela. O16, P65.
Martín-Hita, Lina. P65, P68.
Martín-Mazuelos, Estrella. O09, O13, P25, P31, P48, P49.
Mérida, María Dolores. O14, O16, P66, P68.
Merino Díaz, Laura. P61.
Miranda Casas, Consuelo. O03. P15, P19, P52.
Montiel Quezel-Guerraz, Natalia. P40, P42.
Mora Navas, Laura. O15, P14, P23, P34, P42.
Morales de la Vega, Eva. P54.
Morales Torres, Mercedes. P11.
Morilla, Dolores. P49.
Morillo, A. O08.
Munaiain, Miguel Ángel. O07.
Muñoz Dávila, María José. P38, P43, P70.
Muñoz Nuño, Enrique. P01.
Navarro Marí, Jose María. O03, O11, P15, P19, P26, P27, P52, P56, P57.
Nuñez Trigueros, M^a Luz. P43, P70.
Odero Bernal, Valle. O15, P09, P14, P23, P30, P34, P42.
Orgaz Morales, Tomás. P54.
Ortega Torres, Maria. P09, P23, P30, P42.
Pabón, Manuel. P25.
Palacios, Rosario. P30.
Palomares Folía, José Carlos. O13, P31.
Parra Sánchez, Manuel. O09, O13, P25, P31.
Parra Sánchez, Manuel
Pascual Hernández, Álvaro. O01, O07, P01, P08, P12, P16, P63.
Pedrosa Corral, Irene, O11, P56, P57.
Peña Monje, Alejandro. P37, P40, P68.
Pérez Cáceres, Juan Antonio. O06, P20.
Pérez Ramos, Santiago. O05, P04, P36.
Pérez Rodríguez, Blanca. P06, P39.
Pérez Rosa, Luis, O13, P31.
Pérez Zapata, Inés. P15, P26, P27.
Pérez, Carmen. P17, P64.
Pérez, Isabel. P30.
Pérez-Parra, Santiago. O14, P37.
Pérez-Ruiz, Mercedes- O11, P56, P57.
Pineda Vergara, Juan Antonio. O13.
Plaza, Julio. P18.
Polo Moyano, Purificación. O03, P19.



Polo, Antonia. O11.
Porras González, Ana. P03.
Pueyo, Isabel. P31.
Ramírez Arcos, Mercedes. P13.
Ramírez de Arellano Ramos, Encarnación. O07.
Reche Molina, Isabel. P11.
Redero Cascón, María del Mar. O02, P03, P29.
Reyes Bartos, Armando. P11.
Riazzo Damas, Cristina Laura. P19, P26, P52.
Ríos, María José. P63.
Rivero, M^a Ángeles. P56.
Rodiere, Kathlyn. O05, P04, P36, P62.
Rodríguez García, Aurora. O03.
Rodríguez López, Fernando. P05.
Rodríguez Martínez, José Manuel. P16.
Rodríguez Mirón, Yolanda Elvira. P54.
Rodríguez-Baño, Jesús. P12.
Rodríguez-Iglesias, Manuel. O12, P07, P22, P24, P47, P50, P51, P69.
Rojo Martín, María Dolores. O03, P15.
Roldan Fontana, M^a Esther. P02.
Román Ureña, Juan. P40.
Romero Palacios, Alberto. P04.
Romero, Ana A. O09, P48, P49.
Romero, C. P12.
Ruiz Castillo, Ana. P06, P28.
Ruiz Martínez, Pilar. O04, P44, P45, P46.
Saavedra Martin, Jose María. O06, P20, P33.
Saez, David. P13.
Salamanca Rivera, Elena. P08, P12.
Sampedro de la Torre, Inmaculada. P27.
Sanbonmatsu Gámez, Sara. O11, P56, P57.
Sánchez Agüero, Magdalena. P61.
Sánchez Capilla, Damián. P26.
Sánchez, Jose Antonio. P17.
Sánchez, Jose Antonio. P64.
Sanchez-Porto, Antonio. P10.
Sanchez-Yebra Romera, Waldo. P11.
Santos Rosa, Cristina. 21, P71.
Santos, Jesus. P30.
Sena Corrales, Gabriel. O15, P09, P23, P30, P34.
Serrano García, María Luisa. P19, P52.
Serrano Martino, Carmen. P13.
Serrano, L. P12.



Sivianes Valdecantos, Nieves. O13, P31.
Solís Cuesta, Francisco. P05.
Suárez Barrenechea, Ana Isabel. O01.
Tejero García, Rocío. P05.
Tenorio Abreu, Alberto. O06, P20, P33.
Terrones, Rosario. P39, P41.
Torres Sánchez, María José. P28.
Torres, María José. O08.
Valencia, Raquel. O08.
Valverde, Encarnación. P15.
Vaquero, Mercedes. P13.
Vargas Romero, Julio. P25.
Vázquez Barba, Isabel. P06.
Viciano Ramos, Isabel. O15, P23, P34.
Vidal Acuña, María Reyes. P29.
Villanueva Rodríguez, Patricia. P35.
Vindel, Ana. P13.
Yaguez Jimenez, Socorro. P15.
Zakariya-Yousef Breval, Ismail. O09, O13, P48, P49.



ÍNDICE DE PALABRAS CLAVE

Actinomyces, P37
ahorro, P02
ancianos, P03
antibiogramas de difusión en agar, P01
antibióticos, P10, P11
anticuerpo antimanano, O09
antígeno de manano, O09
antígenos, P56
antirretrovirales, P63
Anyplex HPV28, P55
Anyplex plus MTB/NTM-MDR-TB, P44
área endémica, P70
automatización, P56, P57
avium/intracellulare, P47
azoles, P48
baciloscopia, O05
betalactamasas de espectro extendido, P11
blefaritis, P71
bolas magnéticas, P38
brote, O07
Cádiz, P47
Campylobacter, P27
Campylobacter coli, P28
canales de transmisión, O14
cáncer de cuello, P53
Candida glabrata, P48
Candida no albicans, P49, P50
Candida poco frecuentes, P49
candidemia, P49
candidiasis invasiva, O09
caracterización genética, O11
carbapenemasa, P14, P15
carga viral inferior 1000 cp/ml, P64
ceftarolina, P20
ceftriaxona, P29
Chlamydia trachomatis, O01, P30
citómetro, P03
Clostridium difficile, P35, P36
cluster, O14
CMI, P20, P29
coexpresión, P16



colonización, P18
consumo, P09
contaminación
control de calidad, P01
Coxiella burnetii, O07
cribado, P30
cribado, P32
cultura, P54
DAA, O13
daptomicina, O03
Demodex, P71
diagnóstico molecular, P39
difusión con disco, P27
distribución, P61, P62
dolutegravir, P68
Enterococcus faecium, O03, P24
Enterovirus, O10
eosinofilia, P70
epidemiología molecular, O08
equinocandinas, P48
espectrometría de masas, O08, P41
extracción ácidos nucleicos, P38
exudado rectal, P31
fibrosis quística, P08, P52
fiebre Q, O07
fluorotype, P39
GDH, P36
GenomEra, P19
genotipo, O04, P53, P54, P58, P60, P61, P62
gripe, P57
grupo *Bacteroides fragilis*, O02
heces, P25
Helicobacter, P25, P26
hemocultivo, P04, P05, P06, P07, P41
Hepatitis, P58, P59
Hepatitis, P60
Hepatitis B, P59
hepatitis B oculta, O12
Hepatitis C
HPV, P54, P55
Hymenolepis nana, P69
ID32C, P50
identificación, O04, P07, P40



incidencia, P32, P33
infección, P35
infección de transmisión sexual, O01
infección nosocomial, O08, P11
inhibidores de la integrasa, P68
inhibidores proteasa, P66
inmunodeprimido O12
Inno-LiPA HPV, P55
integrasa, P67
isoniacida, O06, P42, P44
Jerez, P35
Klebsiella pneumoniae, P14
Klebsiella pneumoniae BLEE, P12, P13
Lactococcus garviae, P24
levaduras no-Candida, P51
linezolid, P09
linfogramuloma venéreo, P31
macrólidos, P21
magrebíes, P69
MALDI TOF, P06, P07, P15, P22, P24, P37, P40, P50, P51, P52
manejo terapéutico, P43
MDR, P45
MDR-TB, P43
medio cromogénico, P02, P08
meningitis, O10, P22
micobacterias, P40, P45, P47
micobacterias atípicas, O04
molecular, P15
Mueller Hinton agar, P01
multirresistente, P12
mutaciones, O12, O15, P59
Mycobacterium fortuitum, P41
Mycobacterium tuberculosis, P39, P42, P46
Myroides, P34
naive, P65
Neisseria gonorrhoeae, O01, P29
niños, P69
orinas, P02, P03
OXA-48, P14
Papilomavirus, P53
parasitosis, P26, P71
PCR, O05, O10, P05, P17, P36
PCR en tiempo real, P31, P57



pirosecuenciación, O16, P18
portador, P19
prevalencia, P26, P30
primoinfección, O16
PROA, P10
probióticos
Pseudomonas aeruginosa, P08
qnr, P16
quimioluminiscencia, P25
quinolonas, P16
raltegravir, P68
Rasamsonia, P52
Región de Murcia, P43
resistencia, O06, O15, P09, P10, P21, P34, P42, P45, P46, P63
resistencia antibiótica, P28
resistencia genotípica, P64
resistencias primarias, P66, P67
respiratorio, P23
rifampicina, P44
rilpivirina, P65
SAMR, P20
secuenciación, P17, P65
secuenciación poblacional, P64
segunda línea, P46
sensibilidad, O02, P23, P27
sepsis, P05, P34
Sepsityper, P06
SHV-2, P12
sífilis, P32, P33
SO-DMT, P38
Staphylococcus aureus, P19
Staphylococcus epidermidis, P04
Streptococcus agalactiae, P21
Streptococcus equi, P22
Streptococcus pneumoniae, P23
Strongyloides stercoralis, P70
susceptibilidad, O03
técnicas rápidas, P17
tratamiento, O13
tratamiento empírico, O02
tratamientos alternativos, P28
Trichosporon asahii, P51
tuberculosis, O05, O06



UCI, P13

UDS, P66, P67

Úlcera genital, P37

vacuna, O11

vigilancia, P13

vigilancia de gripe, O11

VIH, O15, P33, P63

virus de la hepatitis C, O13, P61, P62

virus de la hepatitis B, P59

virus respiratorios, P56



EMPRESAS PATROCINADORAS



EMPRESAS COLABORADORAS

