



Estudio de la aerobiología de hongos filamentosos en un hospital de cuarto nivel en Bogotá Colombia

Katherine Natalia Aguirre Guataqui

Estudiante de Bacteriología

Directora: Claudia Marcela Parra Giraldo MSc, PhD.

Co-directora: Melva Yomary Linares Linares MSc.

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Carrera de Bacteriología

Bogotá D.C 2016

Nota de Advertencia

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946.

Agradecimientos

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de mi trabajo de grado es inevitable agradecer a las personas e instituciones que fueron parte del mismo, sin su participación hubiese sido imposible llegar al término de este trabajo. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos

Tabla de contenido

1. Resumen	9
2. Marco teórico y estado del arte	10
3. Antecedentes.....	14
4. Justificación	15
5. Pregunta de investigación	17
6. Objetivos.....	17
6.1. Objetivo general	17
6.2. Objetivos específicos	17
7. Metodología.....	18
7.1. Caracterización de los ambientes hospitalarios	18
7.1.1. Toma de muestras	19
7.1.2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)	20
7.1.3. Aislamiento e identificación.....	21
7.1.4. Pruebas de resistencia.....	22
8. Resultados.....	24
8.1. Caracterización de los ambientes hospitalarios	24
8.2. Caracterización del ambiente físico y del personal de urgencias.....	24
8.2.1. Caracterización del ambiente físico y del personal de salas de cirugía ...	24
8.2.2. Caracterización del ambiente físico y del personal de la unidad de cuidados intensivos	25
8.2.3. Caracterización del ambiente físico y del personal de la unidad de hematoncológica	25
8.2.4. Caracterización del ambiente físico y del personal de la unidad de trasplantes.....	26
8.3. Estudio preliminar con incubación a temperatura ambiente	26
8.4. Segundo estudio con incubación a temperatura ambiente y 35°C, piso 5 y 926	
8.5. Carga fúngica de hongos filamentosos en HUSI.....	28
8.5.1. Resultados UFC de Urgencias.....	29
8.5.2. Resultados UFC de salas de cirugía.....	32
8.5.3. Resultados UFC de la unidad de cuidados intensivos	35
8.5.4. Resultados UFC de la unidad de hematoncología	38
8.5.5. Resultados UFC de la unidad de trasplantes.....	41

8.5.6. Comparación de UFC/L de hongos filamentosos de HUSI	44
8.6. Análisis por espectrometría de masas de cepas aisladas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	46
8.7. Detección de resistencia a azoles en cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	48
9. Discusión	50
10. Conclusiones.....	54
11. Recomendaciones.....	55
12. Bibliografía	56

Lista de tablas

Tabla 1. Número de puntos de muestreo/área (m ²) según ISO 14644	19
Tabla 2. Resultados estudio preliminar	26
Tabla 3. Resultados segundo muestreo a 20°C	27
Tabla 4. Resultados segundo muestreo a 35°C	27
Tabla 5. Resultados unidad de urgencias	29
Tabla 6. Resultados salas de cirugía	32
Tabla 7. Resultados unidad de cuidados intensivos	35
Tabla 8. Resultados unidad de hematología	38
Tabla 9. Resultados unidad de trasplantes	41
Tabla 10. Comparación de UFC/L de HUSI	44
Tabla 11. Tamizaje de sensibilidad frente a itraconazol y voriconazol para 37 cepas de <i>A. fumigatus</i> . (S) sensible (R) resistente	49

Lista de gráficos

Gráfico 1. Segundo muestreo, Porcentaje de UFC/L de hongos filamentosos	28
Gráfico 2. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de urgencias.....	30
Gráfico 3. distribución de UFC/L de especies de <i>Aspergillus spp.</i> en urgencias...	30
Gráfico 4. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de salas de cirugía	33
Gráfico 5. distribución de UFC/L de especies de <i>Aspergillus spp.</i> en salas de cirugía	33
Gráfico 6. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de UCI	36
Gráfico 7. distribución de UFC/L de especies de <i>Aspergillus spp.</i> en UCI	36
Gráfico 8. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de hematología.....	39
Gráfico 9. distribución de UFC/L de especies de <i>Aspergillus spp.</i> en la unidad de hematología.....	39
Gráfico 10. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de trasplantes.....	42
Gráfico 11. distribución de UFC/L de especies de <i>Aspergillus spp.</i> en la unidad de trasplantes.....	42
Gráfico 12. Comparación UFC/L de hongos filamentosos de HUSI	44
Gráfico 13. Comparación de UFC/L <i>Aspergillus spp</i> del HUSI.6.....	45
Gráfico 14. Análisis por multicomponentes PCA de las 34 cepas Identificadas como <i>Aspergillus fumigatus</i>	46
Gráfico 15. Mapa de calor de 34 cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	47
Gráfico 16. Dendograma de 34 cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	48

Lista de figuras

Figura 6. Análisis de la espectrometría de masas obtenida para las cepas con fenotipo resistente a azoles.....	49
--	----

Lista de Mapas

Mapa 1. plano del área de urgencias con puntos de muestreo. Positivo para <i>Aspergillus fumigatus</i> ; Negativo para <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
Mapa 2: Concentración de UFC/cm ³ de microorganismos encontrados en el área de urgencias.....	31
Mapa 3. plano de salas de cirugía con puntos de muestreo. Positivo para <i>Aspergillus fumigatus</i> ; Negativo para <i>Aspergillus fumigatus</i>	32
Mapa 4: Concentración de UFC/cm ³ de microorganismos encontrados en salas de cirugía	34
Mapa 5. plano de UCI con puntos de muestreo. Positivo para <i>Aspergillus fumigatus</i> ; Negativo para <i>Aspergillus fumigatus</i>	35
Mapa 6: Concentración de UFC/m ³ de microorganismos encontrados en Unidad de Cuidados Intensivos	37
Mapa 7. plano de salas de cirugía con puntos de muestreo. Positivo para <i>Aspergillus fumigatus</i> ; Negativo para <i>Aspergillus fumigatus</i>	38
Mapa 8: Concentración de UFC/m ³ de microorganismos encontrados en Unidad de hematología.....	40
Mapa 9. plano de salas de cirugía con puntos de muestreo. Positivo para <i>Aspergillus fumigatus</i> ; Negativo para <i>Aspergillus fumigatus</i>	41
Mapa 10: Concentración de UFC/m ³ de microorganismos encontrados en Unidad de trasplantes.....	43

1. Resumen

En los últimos años, la medicina se ha enriquecido de los avances vertiginosos en técnicas intervencionistas que alargan el promedio de vida de pacientes profundamente enfermos por la realización de trasplantes tanto autólogos como alogénicos, el uso de dispositivos médicos, en combinación con quimioterapias y /o terapias inmunosupresoras. En estas condiciones los individuos que son intervenidos tienen un alto riesgo de desarrollar una enfermedad fúngica invasiva (EFI), enfermedad con una tasa de mortalidad del 50-80%. El hongo filamentoso mayormente asociado a esta patología es *Aspergillus fumigatus*.

El grupo de Investigación en enfermedades infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana en conjunto con el grupo de investigación en enfermedades infecciosas del HUSI, han venido adelantando investigaciones exploratorias en el campo de la aerobiología y dispersión de hongos filamentosos. Estos estudios se han realizado mediante muestreo ambiental, controlando los litros de aire aspirado por área muestreada, y mediante identificación de los microorganismos aislados por microscopia y espectrometría de masas.

Los resultados más promisorios y que justifican la investigación propuesta en este documento, obedecen a estudios anteriores publicados por Cárdenas y colaboradores en el 2008, donde se demostró la circulación de diferentes especies del género *Aspergillus*, excepto *A. fumigatus* (9). En el año 2015, se repitió el estudio, encontrando a *A. fumigatus* en el 70% de áreas muestreadas, estas cepas fueron analizadas por la tecnología MALDI TOF la cual arrojó como resultado la identificación de 4 clones en las cepas encontradas en el HUSI, el 80,4% de estas exhibieron resistencia a voriconazol.

Con este proyecto se busca generar nuevo conocimiento en las áreas de aerobiología de hongos, y control de infecciones asociadas al cuidado de la salud. Por lo anterior, consideramos que los resultados esperados de este proyecto permitan ampliar la frontera en el conocimiento que se tiene en el impacto real de hongos ambientales en el desarrollo de EFI. De igual forma, se espera que la realización de este proyecto permita la formación de recurso humano a nivel de pregrado, y el fortalecimiento del

trabajo colaborativo de los grupos de investigación involucrados a nivel nacional e internacional.

2. Marco teórico y estado del arte

Aerobiología es el estudio de los procesos implicados en el movimiento de los microorganismos en la atmósfera de un lugar geográfico a otro, incluyendo la transmisión en forma de aerosol del agente causal de la enfermedad (1).

Existen diversas vías de transmisión de patógenos en el aire; la primera es cuando se perturba un reservorio ambiental de un patógeno, es decir el suelo, el agua, el polvo, la materia orgánica en descomposición donde los propágulos de hongos pueden ser dispersados en el aire y propagarse cuando el polvo se libera durante las actividades de renovación y construcción (2). La segunda es la transmisión a través de gotas, la cual se define como la transmisión de agentes causales de enfermedades por partículas expulsadas que pueden establecerse a una superficie rápidamente, normalmente tres pies alrededor de la fuente (1), estas gotas, pueden transmitirse directamente de persona a persona cuando se tose o estornuda, donde las partículas infecciosas se liberan en el aire (2). Es por esto que en una infección causada por transmisión a través de gotas el individuo susceptible debe estar lo suficientemente cerca de la fuente de la infección para hacer contacto con el tracto respiratorio del individuo susceptible, los ojos, la boca, las fosas nasales y así sucesivamente (1).

La tercera vía de transmisión se define como la transmisión de la infección por partículas que son comparativamente de menor tamaño. Las partículas en suspensión, pueden permanecer suspendidas en el aire durante largos períodos de tiempo (1) y pueden ser transportados a grandes distancias (1, 2), por lo tanto, potencialmente exponen un número mucho mayor de individuos susceptibles a una distancia mucho mayor de la fuente de la infección (1), Estos microorganismos persisten en condiciones de frío, poca humedad, con poca o ninguna exposición de la luz o radiación directa (2).

La transmisión de enfermedades infecciosas por vía aérea depende de la interacción de varios factores críticos, factores ambientales (por ejemplo, condiciones meteorológicas del aire libre, los efectos dinámicos y los diferenciales de presión de fluido en el interior) del tamaño de partícula, es decir, el diámetro de la partícula, el

grado de desecación y la presencia de partículas bacterianas, víricas y fúngicas, las cuales son de gran importancia en un individuo susceptible (1).

Las infecciones adquiridas en los hospitales y las infecciones intrahospitalarias, son una de las principales causas de muerte en los Estados Unidos y por lo general afectan a los pacientes cuyos sistemas inmunológicos están comprometidos, esto, se presenta debido a la contaminación y el mal funcionamiento de los sistemas de ventilación(2); un factor de riesgo es la naturaleza heterogénea de las gotas o microorganismos infecciosos que se liberan en el aire, generalmente, éstas consisten en mezclas de simples y múltiples células, esporas y virus llevadas tanto por las secreciones respiratorias como partículas inertes. Además, esporas de hongos filamentosos son comunes en los polvos durante construcción exterior e interior, en aparatos de aire acondicionado, techo de baldosas, alfombras, y otros aerosoles infecciosos generados a partir de fuentes secas. Asimismo, las gotitas y la transmisión aérea no son mutuamente exclusivas, es decir, independiente del origen, las partículas que llevan microorganismos infecciosos no se dispersan exclusivamente por el aire o la transmisión por gotas, sino por ambos mecanismos simultáneamente (1). Es por esto que la filtración, es el primer paso para lograr aire libre de partículas, la eficiencia de los filtros varía dependiendo del calibre de sus poros, entre más pequeño sea el poro mayor sistema de pre filtración debe existir. Una forma de mejorar la eficiencia de los filtros es la adición de filtros HEPA en las áreas de atención especial del hospital; los filtros HEPA son eficaces en la prevención de patógenos en el aire del entorno hospitalario (2).

En las últimas décadas se ha producido un incremento global de las infecciones fúngicas de origen nosocomial y de las asociadas a cuidados sanitarios como consecuencia de los avances en las terapias médicas y quirúrgicas cada vez más eficaces, pero también más agresivas (3). El mayor uso de dispositivos biomédicos invasivos, especialmente de catéteres intravasculares (CIV), ha incrementado el número de fungemias; aunque, las especies de *Candida* y otras levaduras constituyen una importante causa de la Enfermedad Fúngica Invasiva (EFI) (4), los hongos filamentosos también pueden causar diversas enfermedades, desde infecciones superficiales y de mucosas, así, como generar infecciones invasivas. Las infecciones superficiales son comunes y generalmente fáciles de tratar, pero las infecciones invasivas son difíciles de diagnosticar y tratar (5).

Entre los agentes causales de una enfermedad fúngica invasiva por hongos filamentosos, las especies del género *Aspergillus*, son la principal causa en los pacientes receptores de TPH (trasplante de progenitores hematopoyéticos) y TOS (trasplante de órgano sólido), seguidas por otros mohos considerados emergentes, como *Fusarium* sp., *Scedosporium* sp. o los mucorales(2).

Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* pueden causar síndromes alérgicos localizados o diseminados dependiendo del comportamiento clínico del agente infeccioso y del hospedador. En la actualidad se conocen más de 300 especies de *Aspergillus*, de las cuales solo un pequeño número son causantes de infecciones oportunistas. La especie que con mayor frecuencia causa Aspergilosis es *Aspergillus fumigatus*, originando el 90% de las infecciones por este género (2). También se ha observado la presencia de otras especies, como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus terreus*, los cuales, se aíslan cada vez con más frecuencia dependiendo de factores geográficos, tipo de hospedero o prescripción de anti-fúngicos incrementando su papel como agentes etiológicos (3).

La virulencia de *Aspergillus fumigatus* es multifactorial y se combina tanto con el estado inmune del paciente como con las características biológicas del hongo. La EFI entonces se desarrolla dependiendo de tres factores: el nivel de inmunosupresión, la carga y los rasgos de virulencia del hongo (4). Teniendo en cuenta estos dos últimos aspectos, hay diferencias entre las especies patógenas de *Aspergillus*. Una vez el hongo alcanza un entorno idóneo, debe adaptarse para sobrevivir. Estos ajustes se clasifican de acuerdo con el proceso involucrado, por ejemplo la termotolerancia, la producción de toxinas, la composición de la pared celular, la resistencia a la fagocitosis, la capacidad de absorber nutrientes, el metabolismo y la adaptación a condiciones de estrés (4).

La materia orgánica en descomposición es el entorno idóneo para el crecimiento de *A. fumigatus*, este hongo tiene la capacidad de crecer a 37°C (4). La pared celular del hongo evita la lisis celular y lo protege frente a condiciones de estrés ambiental, contribuyendo a la supervivencia en el interior del cuerpo humano (5), además posee una capa de melanina gris adherida a la pared celular que protege el genoma de los conidios de lisis enzimática, luz ultravioleta y oxidación (4). Otro factor de virulencia de *A. fumigatus* es la producción de una gliotoxina, esta toxina es conocida por ser

inmunosupresora ya que inhibe la fagocitosis y el factor de transcripción NF-kappa B, bloqueando la respuesta inflamatoria, la producción de citoquinas y la degranulación de mastocitos; también causa la muerte de células del sistema inmune como los macrófagos (6).

Las manifestaciones clínicas causadas por *Aspergillus fumigatus* son determinadas por la respuesta inmune del hospedero contra el hongo y han sido clásicamente divididas en formas alérgicas e invasivas. En este contexto, en los pacientes el hongo provoca fenómenos autoinmunes tales como rinitis alérgica, asma y Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) que afectan los tractos respiratorios superior e inferior; esta última afecta del 1 al 2% de los pacientes asmáticos y del 7 al 9% de los pacientes con fibrosis quística. En individuos inmunocomprometidos, algunos conidios germinan en los pulmones como hifas siendo esta la forma invasiva del hongo, causando infección angioinvasiva grave (4), conocida como Aspergilosis invasiva (AI), infección potencialmente mortal y difícil de tratar en pacientes con neutropenia prolongada, los receptores de trasplante y otros pacientes severamente inmunocomprometidos (7).

Aspergillus fumigatus es uno de los hongos patógenos transportados por el aire más prevalentes y ubicuos, es el principal agente etiológico implicado en IA (2). Las opciones terapéuticas son cada vez más limitadas debido a un efecto variable de las diferentes clases de fármacos antifúngicos contra este hongo (7), este cambio ha sido atribuido a la exposición de los hongos ambientales a inhibidores de 14 α -desmetilasa, una enzima estructuralmente relacionada con triazoles, los cuales son ampliamente utilizados en la protección de plantas de cultivo y conservación de flores ornamentales para controlar el crecimiento de hongos en países de importancia agrícola (7). La resistencia a azoles ha sido reportada tanto *in vivo* durante terapia con azoles de larga duración como en la adquisición del entorno relacionado con el uso generalizado de los fungicidas de azoles en la agricultura. La resistencia a los azoles en *A. fumigatus* está ligada principalmente a mutaciones en el gen *cyp51A* que codifica para lanosterol 14 α -desmetilasa, blanco de los antifúngicos azoles (8).

3. Antecedentes

En un estudio realizado en el Hospital Universitario San Ignacio en el año 2008 se halló la presencia de *Aspergillus* spp, se recuperaron especies como: *A. flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus terreus*. La especie más frecuente tanto en muestras de agua como ambientales fue *A. flavus*, con un porcentaje del 81% y 42% respectivamente(9). Dicha especie, conjuntamente con *A. fumigatus*, son responsables del 90% de las infecciones en pacientes trasplantados de órgano sólido, siendo *Aspergillus* uno de los agentes más importantes causantes de infecciones invasoras nosocomiales (10). En otro estudio dónde se evaluaron los niveles de contaminación microbiana en los quirófanos utilizando tanto un método de muestreo pasivo como activo, fueron aisladas colonias de hongos filamentosos durante dos operaciones quirúrgicas separadas: en la primera, se identificó una colonia de *Aspergillus* sp. Y la segunda, revelo la presencia de *Penicillium* sp (11). También se encontró la presencia de hongos filamentosos en la Unidad de Trasplante de Hemato-Oncología de la Clínica Hospital Universitario de Olomouc, dónde se aislaron hongos filamentosos en 13 casos (2,71%), encontrando 4 cepas de *Aspergillus* spp., 2 de *Trichoderma* spp. y 2 de *Penicillium* spp (12).

En un estudio realizado en el 2002 en Alemania sobre el impacto del modelo NSA 7100A B en la exposición de los pacientes de hematología-oncología a esporas de *A. fumigatus* en condiciones de campo, demostró la presencia de *A. fumigatus* en interiores con 8,1 ufc/m³; (rango, 0,8 a la 42 ufc / m³) y se reflejó la carga fúngica de aire exterior con 9,4 ufc/m³; (rango, 0,8 a la 50 UFC / m³), y se redujeron sólo alrededor de un tercio en las habitaciones con unidades de filtración de aire portátil con 5,3 ufc / m³; (rango, 0,8 a la 41 ufc/m³). Durante el período de estudio, se reportaron cinco casos de aspergilosis invasiva (un caso comprobado, cuatro casos sospechosos; la tasa de mortalidad del 40% (10)).

En el 2012, en el sur de Italia en un muestreo en 32 quirófanos y cinco departamentos con pacientes de alto riesgo, 61 muestras fueron positivas para mohos ambientales, 18 de ambientes controlados y 43 de salas de operación. En este estudio los hongos identificados a partir de cultivo de muestras de aire fueron *Aspergillus* spp con un 91,8% (11).

En un reporte realizado en el 2015 por Patrice Le Pape y colaboradores sugirió una relación entre el uso de fungicidas en las prácticas agrícolas y la presencia de resistencia a triazoles de *A. fumigatus* en personas de un medio ambiente normal. Esta resistencia se ha descrito tanto en muestras ambientales y clínicas en Europa, Asia y África, lo que sugiere una amplia distribución geográfica (8). En el 2010 Colombia ocupó el cuarto lugar en el mundo para el uso de pesticidas, como, tebuconazol y difenoconazol, los cuáles se utilizan en gran medida en la industria de las flores, lo que sugiere que el manejo clínico de las enfermedades causadas por *Aspergillus* puede ser un reto debido a los resultados clínicos desfavorables, después que los pacientes han adquirido cepas multi-resistentes a los azoles (8).

4. Justificación

Las enfermedades causadas por hongos filamentosos son adquiridas por la inhalación de esporas, las cuales se desarrollan en el interior del organismo dando lugar a las formas invasoras de la enfermedad en hospederos inmunodeprimidos y neutropénicos. Por esto, la primera estrategia de control de estas infecciones debe ser minimizar la exposición a esporas fúngicas ambientales transmitidas por el aire en los centros hospitalarios donde se encuentren pacientes con neutropenias prolongadas, trasplantes y cirugías mayores (7).

Debido al aumento de pacientes inmunodeficientes, los casos de infecciones fúngicas han aumentado considerablemente, entre las infecciones de mayor prevalencia se encuentra la Aspergilosis, debido al carácter oportunista de este hongo. Entre las especies implicadas del genero *Aspergillus* están *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus* en ambientes hospitalarios.

Entre este grupo, *Aspergillus fumigatus* es el hongo filamentosos patogénico de mayor importancia en los seres humanos, causando una gran cantidad de enfermedades entre ellas la Aspergilosis invasiva. Entre la creciente población de pacientes hematológicos, *A. fumigatus* representa una de las principales causas infecciosas de muerte (12). Los conidios de este hongo se propagan fácilmente por el aire y entran en el huésped a través de la vía aérea, donde infectan el tejido pulmonar y se sitúan en el sistema respiratorio inferior (13).

El tratamiento de primera línea para la aspergilosis invasiva (AI) en pacientes inmunocomprometidos es el voriconazol, el cual es desafiado por la aparición de resistencia a los azoles. La prevalencia de cepas resistentes puede variar según la ubicación del hospital y la enfermedad subyacente (por ejemplo, inmunodeficiencia vs las enfermedades crónicas de los pulmones) (14).

Teniendo en cuenta la problemática descrita y que el Hospital Universitario San Ignacio es un hospital universitario de cuarto nivel en Bogotá, Colombia, este se encuentra dentro del campus de la Pontificia Universidad Javeriana y alberga las Facultades de Medicina, Enfermería y Odontología de esta misma universidad, consta de 9 pisos que ofrecen especialidades clínicas, quirúrgicas, apoyo diagnóstico y apoyo terapéutico; trabaja conjuntamente con dos centros líderes en el campo de la oncología y la genética, se considera necesario describir la presentación y dinámica poblacional de hongos filamentosos en ambientes hospitalarios relacionados con pacientes hematológicos.

5. Pregunta de investigación

¿Cuál es la aerobiología de los hongos filamentosos de las áreas relacionadas con pacientes hematológicos en Colombia?

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar la aerobiología de hongos filamentosos de las áreas relacionadas con pacientes hematológicos en el Hospital universitario San Ignacio de Bogotá - Colombia.

6.2. Objetivos específicos

- Caracterizar los ambientes hospitalarios relacionados con pacientes hematológicos.
- Evaluar la carga fúngica en los diferentes ambientes hospitalarios relacionados con pacientes hematológicos.
- Realizar un análisis del proteoma global de las cepas aisladas de *Aspergillus fumigatus*.
- Realizar un tamizaje de la resistencia de las cepas aisladas de *Aspergillus fumigatus* frente a itraconazol y voriconazol

7. Metodología

El estudio se llevó a cabo en áreas hospitalarias relacionadas con pacientes hematoncológicos del Hospital Universitario San Ignacio.

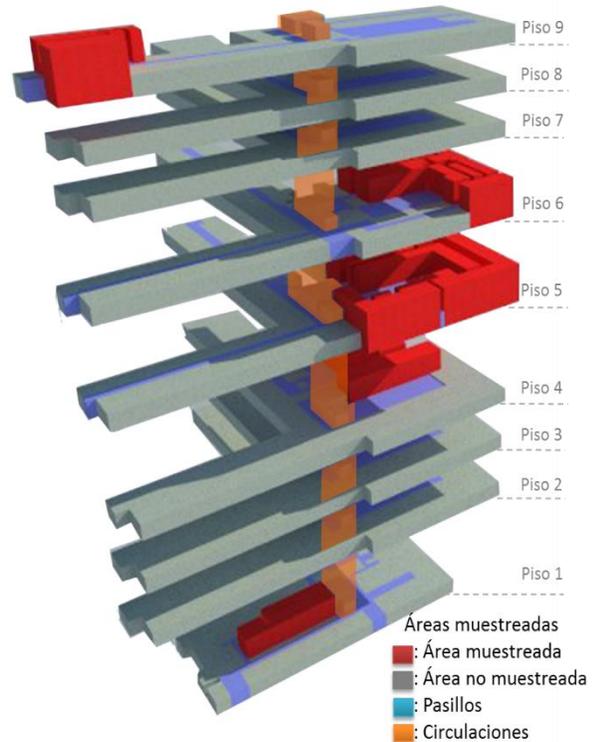
- Piso 1: Urgencias.
- Piso 4: Salas de cirugía.
- Piso 5: Unidad de Cuidados Intensivos.
- Piso 6: Unidad de hematoncología.
- Piso 9: Área de trasplantes.

Inicialmente se realizaron dos estudios preliminares, el primero se realizó en el 6 piso dónde las muestras fueron incubadas a 20°C; en este estudio se evidencio un crecimiento muy abundante de *Penicillium* spp y *Cladosporium* spp (los resultados del estudio se observan detalladamente en resultados, estudios preliminares), principalmente. Con el análisis de estos resultados se decidió realizar nuevamente el estudio con muestras por duplicado con incubación a dos temperaturas (20-35°C) con el fin de determinar la presencia de hongos termotolerantes, los cuales serían de interés clínico.

En estos resultados obtuvimos crecimiento de hongos como: *Aspergillus* spp, *Cladosorium* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Rizopus* spp, *Trichoderma* spp, para las muestras incubadas a 20°C; *Aspergillus* spp *Cladosorium* spp, *Curvularia* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp para las muestras incubadas a 35°C (los resultados del estudio se observan detalladamente en resultados, estudios preliminares). De acuerdo a los resultados de este último análisis se decidió realizar el estudio con incubación únicamente a 35°C

7.1. Caracterización de los ambientes hospitalarios

En la caracterización de los ambientes hospitalarios se tuvo en cuenta el ambiente físico, flujo de personal, requerimientos de ingreso establecidos por cada área. Para



esto fue necesario establecer el contexto cultural y físico del personal, a fin de favorecer una percepción humanizada del establecimiento y promover un proceso de identificación de riesgo al que se puede exponer cada tipo de paciente.

7.2. Toma de muestras

La determinación de microorganismos en áreas relacionadas con pacientes hematoncológicos se realizó a partir de muestras de aire tomadas con el equipo MAS-100®, Merck. El aire, fue aspirado a través de una placa de tamiz perforada que contiene 400 agujeros (diámetro 0,7 mm). A continuación, el aire pasa a través de un medidor de flujo de aire que se ajusta constantemente a la velocidad de flujo de 500l/5min. El aire es depositado en una caja de Petri de agar glucosado de Sabouraud, ubicada debajo de la placa de tamiz perforada. Las muestras tomadas en cada área a evaluar se ubicaron más o menos cada 5 metros cuadrados, dependiendo del tamaño de cada área; posteriormente, las cajas fueron incubadas a 35°C para favorecer el crecimiento de hongos termotolerantes.

La determinación del número de puntos de muestreo se realizó utilizando la metodología del capítulo 1 de la ISO 14644 con respecto a las áreas limpias y ambientes controlados asociados (15).

Número mínimo de puntos de muestreo dependiendo del área de sala limpia según ISO 14644-1

Tabla 1. Número de puntos de muestreo/área (m²) según ISO 14644

Área de sala limpia (m2) de menos o igual a	Número mínimo de puntos de muestreo a probar (NL)
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10
56	11
64	12
68	13

72	11
76	15
104	16
108	17
116	18
148	19
156	20
192	21
232	22
276	23
352	24
436	25
636	26
>1000	Aplicar ecuación

Fuente: Normalización, capacitación, certificación - Cambios en la ISO 14644-1&2 y los impactos en la GMPS [16].

Si el área de la sala es mayor a 1000 m² se debe aplicar la siguiente ecuación:

Donde:

NL = Número mínimo de puntos de muestreo

A = Área total de zona a monitorear (m^2)

Si el área de la zona se encuentra entre dos valores de la tabla, el mayor de los dos debe ser seleccionado.

7.3. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)

El recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó después de 48/h, por el método de recuento estándar en placa, este se basa en contar las colonias de microorganismos que crecen después de ser inoculados en un medio de cultivo Sabouraud e incubado a 35°C, tiempo determinado y un volumen determinado de muestra. Este método se utilizó para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) viables, esto, se llevó a cabo con cada una de las muestras de las áreas evaluadas.

7.4. Aislamiento e identificación

Mediante caracterización macroscópica se seleccionaron los hongos filamentosos, los cuales fueron purificados en cajas de Petri de agar glucosado Sabouraud y posteriormente identificados por características fenotípicas y MALDI-TOF Biotyper.

La identificación fenotípica se realizó mediante caracterización macroscópica y microscópica, utilizando la técnica de impronta con azul de lactofenol y siguiendo las claves taxonómicas. En los casos dónde las estructuras del hongo no fueron claramente identificables, se elaboró un micro-cultivo; ésta técnica consiste en colocar un bloque pequeño de agar Sabouraud en un portaobjeto estéril para posteriormente sembrar una fracción del hongo con asa recta y continuar con la identificación.

La identificación por MALDI TOF se basó en la metodología recomendada por la casa comercial Bruker BD para hongos filamentosos (Anexo 1), la identificación se ejecutó a partir de un pre-cultivo del hongo en medio líquido de agar Sabouraud, sembrando colonias purificadas, esta siembra se realizó en tubos que fueron incubados hasta obtener suficiente material biológico.

Posteriormente fue transferido 1 ml del sedimento del medio de cultivo líquido a un tubo eppendorf, mediante pipeta plástica Pasteur, por consiguiente, se centrifugo durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-15000 rpm), y fue retirado con cuidado el sobrenadante, se agregó 1ml de agua grado HPLC/MS y se agito con vortex fuertemente.

A continuación, se centrifugó durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-15000 rpm), y se removió con cuidado el sobrenadante, usando una pipeta Pasteur. Este lavado se repitió mediante la adición de 1 ml de agua grado HPLC y agitación con vortex. Inmediatamente se re-suspendió el pellet en 300 µl de agua grado HPLC/MS, se mezcló con vortex hasta que el pellet se re-suspenda nuevamente, se agregó 900 µl de Etanol grado HPLC/MS y se agitó en vortex hasta que se re suspendió completamente el sedimento.

Tras la agitación en vortex se centrifugo durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-15000 rpm) y se descartó cuidadosamente el sobrenadante con pipeta Pasteur. En seguida se centrifugo durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-

15000 rpm) y se removió el etanol residual completamente por pipeteo. Posteriormente se dejó secar completamente el pellet a 35°C (no menos de una hora o 60 minutos).

Inmediatamente se agregó al sedimento ácido fórmico al 100% hasta cubrir el pellet, mezclamos hasta que el pellet se re-suspendió, en seguida se añadió el mismo volumen de acetonitrilo al 100% que ácido fórmico al 100%, agitamos con vortex.

En secuencia se centrifugo durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-15000rpm) y se adiciono 1 µl de sobrenadante a la placa de MALDI TOF, dejamos secar y añadimos 1 µl de Matrix (Cyano-4-hydroxycinnamic acid) a cada posición de la placa un compuesto que se mezcla con la muestra que se está analizando; la matrix protege a las moléculas de la muestra de ser destruido por el enfoque directo de los rayos láser y facilita la vaporización de la muestra y la ionización(16).

Por último, se analizó en el equipo MALDI-TOF Biotyper. Para el análisis de los resultados se tuvo en cuenta: los valores (score) de identificación dónde resultados <1,7 son el resultado de no lograr identificación, valores entre >1,7 y <2,0 se asocian a la identificación a nivel de género y >2,0 son asociados a la identificación a nivel de especie.

Finalmente, los espectros de proteínas de cada una de las cepas obtenidos de la identificación realizada por el equipo MALDI-TOF Biotyper fueron analizados buscando relaciones entre los espectros, utilizando el software FlexAnalysis. Con este análisis se realizó una comparación de los espectros de masas obtenidos a partir del análisis del proteoma global de las cepas estudiadas; como resultado este emite gráficos de dendograma que describen el agrupamiento aproximado de las cepas por similitud de los espectros basados en las proteínas ribosomales (17).

7.5. Pruebas de resistencia

Para la detección de resistencia azoles de *Aspergillus fumigatus*, los conidios fueron inoculados en una suspensión al 0,85% de NaCl más 0.01% de Tween 20 a una escala del 0,5 McFarland. Después de realizar la suspensión se añadieron 50ul del inóculo a placas SPL life sciences (tissue culture testplate) con agar Sabouraud que contienen 4mg/L ya sea de itraconazol SIGMA I6657 o voriconazol Pfizer FEND,

finalmente estos son incubados a 37°C por 48h. Las placas son evaluadas a las 12h y a las 48h (8).

El control de calidad se llevó a cabo mediante el análisis de resistencia de cepas genéticamente confirmadas como resistentes y sensibles para este antifúngico.

8. Resultados

8.1. Caracterización de los ambientes hospitalarios

El Hospital Universitario San Ignacio es un hospital universitario de cuarto nivel en Bogotá, Colombia(18). El cual consta de 9 pisos que ofrecen especialidades clínicas, quirúrgicas, apoyo diagnóstico y apoyo terapéutico; trabaja conjuntamente con dos centros líderes en el campo de la oncología y la genética. Las áreas que fueron estudiadas están involucradas en la vía de un paciente hematológico: piso 1 urgencias, piso 4 salas de cirugía, piso 5 unidad de cuidados intensivos, piso 6 unidad de hematología, piso 9 unidad de trasplantes. Durante el periodo estudio el HUSI se encontraba en remodelación.

8.2. Caracterización del ambiente físico y del personal de urgencias

El área evaluada consta de 282 m², en el cual se encuentran 6 salas de expansión, 8 cubículos de observación personales y 5 cubículos de observación para dos personas. El área cuenta con dos entradas de flujo de personal una proveniente de la sala de esperas de urgencias y otra del interior del hospital cerca al área de circulación del mismo (escales y ascensores). A esta área ingresan pacientes agudos inestables o críticos que requieren vigilancia médica y/o de enfermería periódicas(18).

Durante el tiempo de muestreo se observó un alto flujo de personal tanto de personal hospitalario como de pacientes y visitantes; también se observaron inconsistencias en los cubículos de observación; se visualizó incumplimiento de los protocolos de acceso restringido y manejo de puertas cerradas

8.2.1. Caracterización del ambiente físico y del personal de salas de cirugía

El área evaluada consta de 845 m², involucra la central de Esterilización, el área de Cirugía Ambulatoria, el área de recuperación y el almacén, el área cuenta con dos entradas de flujo de personal una proveniente del área de recuperación, cerca del área de circulación del hospital y otra del 5 piso, área de ingreso del personal y pacientes en total esterilidad. En esta se realizan procedimientos de baja, media y alta complejidad como cirugía cardiovascular, cirugía general, cirugía de seno, cirugía de tórax, pediátrica, plástica, gastrointestinal, colon y recto(18).

Durante el periodo de muestreo se observó el incumplimiento de las normas establecidas por el área para el ingreso por parte del personal hospitalario.

8.2.2. Caracterización del ambiente físico y del personal de la unidad de cuidados intensivos

El área evaluada consta de 782 m² cuenta con 32 camas, de las cuales 8 camas son para cuidado intensivo pediátrico, 8 camas para cuidado cardiovascular (con patología crítica cardíaca y de cirugía cardiovascular) y 16 camas para pacientes de las diferentes especialidades médicas y quirúrgicas. 26 de las habitaciones de la unidad cuentan con acceso a ventanas. El área cuenta con una entrada de flujo de personal proveniente del área de circulación del hospital. A la unidad ingresan pacientes en post operatorio de cirugía cardiovascular, neurocirugía, cirugía general, trasplante cardíaco y trasplante de riñón en la fase crítica, tanto adultos como menores de 18 años(18).

Durante el periodo de muestreo se observó el ingreso de visitantes que no cumplían con los protocolos de ingreso al área, también se observa alto flujo de personal en las horas de la mañana.

8.2.3. Caracterización del ambiente físico y del personal de la unidad de hematoncológica

El área evaluada fue de 724.5 m², esta área tiene la capacidad de 14 camas en cubículos bipersonales y 14 personales. 18 de las habitaciones de la unidad cuentan con acceso a ventanas. El área cuenta con una entrada de flujo de personal proveniente del pasillo ubicado cerca de la capilla, la cual está junto al área de circulación del hospital. A esta unidad asisten pacientes con enfermedades hematooncológicas como LLA, LLC, linfoma Hodking, linfoma no Hodking, falla medular, entre otras. Los cubículos 620 y 621 están destinados para pacientes que requieren estudio de telemetría como lo son los pacientes de Cirugía de Epilepsia. Todas las habitaciones están dotadas para acceder a terapia de oxígeno, succión de pared(18).

Durante el periodo de muestreo se observaron ventanas y puertas abiertas, y alto flujo de personal en las mañanas.

8.2.4. Caracterización del ambiente físico y del personal de la unidad de trasplantes

El área evaluada fue de 178.8 m², tiene capacidad de 6 camas en habitaciones personales, las cuales incluyen baño privado y acceso a ventanas, el área cuenta con un sistema de filtración que incluye filtros HEPA. En esta unidad se encuentran paciente en tratamiento post-trasplante. Para el ingreso a la unidad se debe realizar una previa programación por consulta externa, las visitas se reciben dos veces al día, al ingresar se debe hacer lavado de manos, es necesario el uso de tapabocas y bata dentro de la habitación, con el fin de mantener niveles altos de aislamiento(18).

Durante el periodo de muestreo se observó que tanto los visitantes como el personal hospitalario cumplen con los protocolos establecidos para el ingreso al área

8.3. Estudio preliminar con incubación a temperatura ambiente

El primer ensayo de estudio fue realizado en el piso 6, las muestras fueron incubadas a una temperatura de 20°C; Se aislaron un total de 991 UFC para un total de 1,98 UFC/l (Tabla 2) de hongos filamentosos correspondientes a 38 áreas, en 21 de estas se obtuvo crecimiento correspondiente a *Cladosporium* spp, y en el mismo número de áreas se obtuvo crecimiento para *Penicillium* spp.

Tabla 2. Resultados estudio preliminar

Área	No. de muestras	UFC/L totales	UFC/L de hongos filamentosos (%)
Piso 6	38	2,37	1,98 83,6%

8.4. Segundo estudio con incubación a temperatura ambiente y 35°C, piso 5 y 9

Para la segunda toma de muestras realizada en los pisos 5 y 9, las muestras fueron incubadas a 20°C y 35°C; del piso 5 fueron muestreadas 34 áreas, de las muestras incubadas a 20°C se aislaron un total de 760 UFC para un total de 3,94 UFC/l (Tabla 3) de hongos filamentosos, se identificaron colonias de *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Rizopus* spp, *Trichoderma* spp. En 4 de las áreas se observó el crecimiento de *Aspergillus*, 2 para *A. fumigatus* y 2 para *A. flavus*.

Para el piso 9 se aislaron un total de 74 UFC para un total de 0,33 UFC/l (Tabla 3) de hongos filamentosos de 22 áreas, se identificaron colonias de *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Trichoderma* spp. En 3 de las áreas evaluadas se observó el crecimiento de *Aspergillus* sp, en dos de estas áreas se observó el crecimiento de *A. fumigatus*.

Tabla 3. Resultados segundo muestreo a 20°C

Área	No. de muestras	UFC/L totales	UFC/L de hongos filamentosos (%)
Piso 5	34	4,39	3,94 89,6%
Piso 9	22	0,47	0,33 68,9%

De las muestras que fueron incubadas a 35°C se aislaron un total de 125 UFC para un total de 0,25 UFC/l (Tabla 4) de hongos filamentosos del piso 5 de 34 áreas, se identificaron colonias de *Aspergillus* spp *Cladosporium* spp, *Curvularia* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp. En 14 de las áreas se observó el crecimiento de *Aspergillus*, 12 para *A. fumigatus* y 2 para *A. flavus*.

Para el piso 9 se aislaron un total de 60 UFC para un total de 0,12 UFC/l (Tabla 4) de hongos filamentosos de 22 áreas, se identificaron colonias de *Aspergillus* spp, y *Penicillium* spp. En 4 de las áreas evaluadas se observó el crecimiento de especies de *Aspergillus* spp. en tres de las áreas *A. fumigatus* y en el área restante *A niger*.

Tabla 4. Resultados segundo muestreo a 35°C

Área	No. de muestras	UFC/L totales	UFC/L de hongos filamentosos (%)
Piso 5	34	1,77	0,25 14,1%
Piso 9	22	0,68	0,12 17,5%

En el gráfico 1, se observa una comparación de UFC/L a ambas temperaturas, a 35°C de evidencia una considerable disminución de UFC de hongos filamentosos.

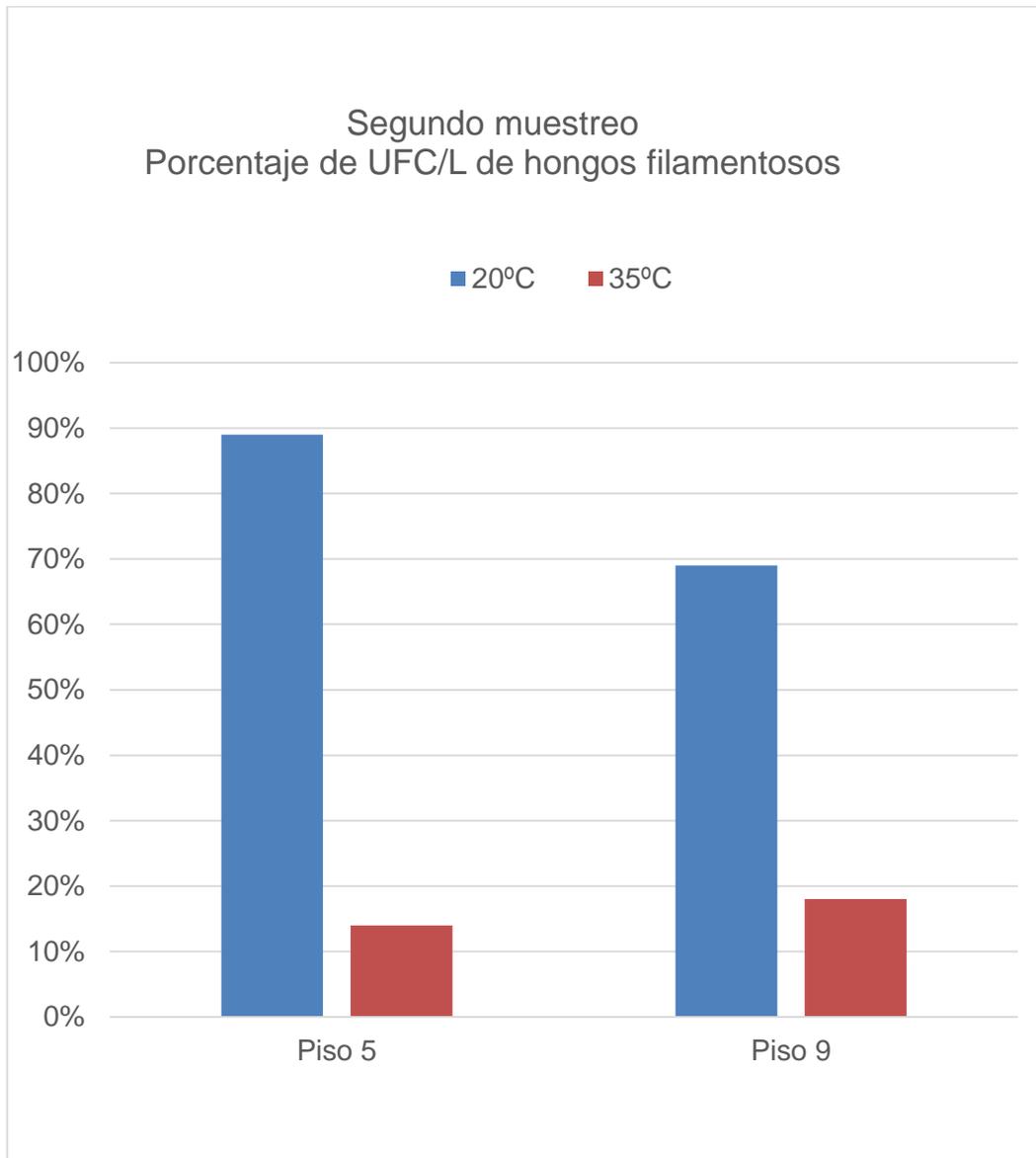


Gráfico 1. Segundo muestreo, Porcentaje de UFC/L de hongos filamentosos

8.5. Carga fúngica de hongos filamentosos en áreas del HUSI

Estos resultados corresponden al muestreo final que se realizó para evidenciar la carga fúngica en las áreas por las que transitan los pacientes hematológicos en HUSI

8.5.1. Resultados UFC de Urgencias

Del muestreo realizado en el área de urgencias con 27 puntos de muestreo (Mapa 1) se obtuvo un 65,5% de UFC/L de hongos filamentosos (Tabla 5), los resultados de la distribución de las especies de hongos filamentosos se muestran en el grafico 2 y de las especies de *Aspergillus* spp en el 3

Tabla 5. Resultados unidad de urgencias

Área	No. de muestras	UFC/L totales	UFC/L de hongos filamentosos (%)		UFC/L de <i>Aspergillus</i> spp (%)		UFC/L de <i>Aspergillus fumigatus</i> (%)	
Piso 1	27	64,11	0,12	0,2	0,04	0,1	0,02	52,6



Mapa 1. plano del área de urgencias con puntos de muestreo. ● Positivo para *Aspergillus fumigatus* ● Negativo para *Aspergillus fumigatus*

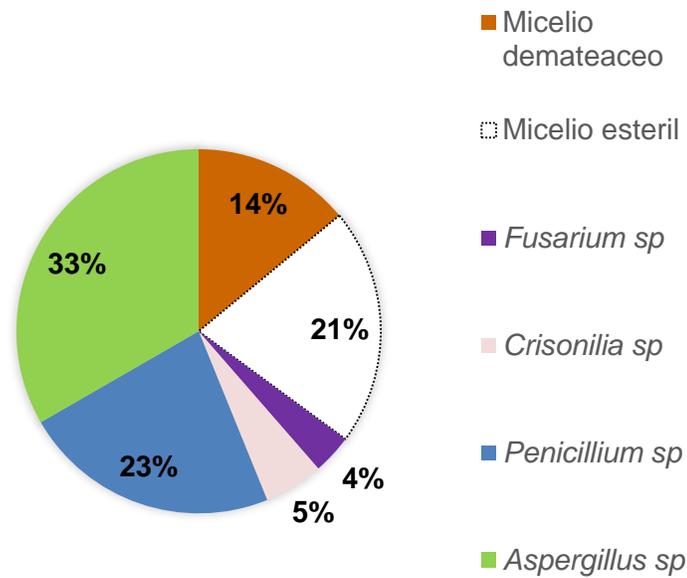


Gráfico 2. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de urgencias

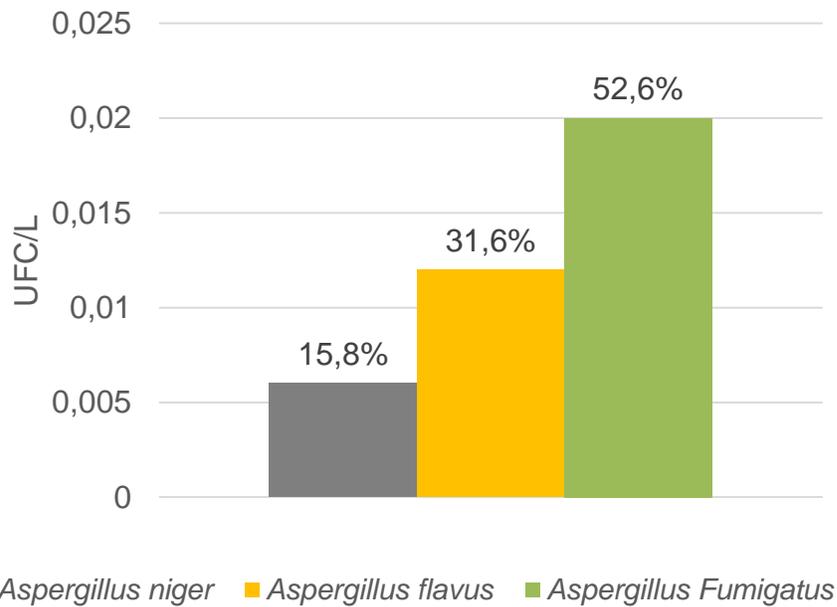
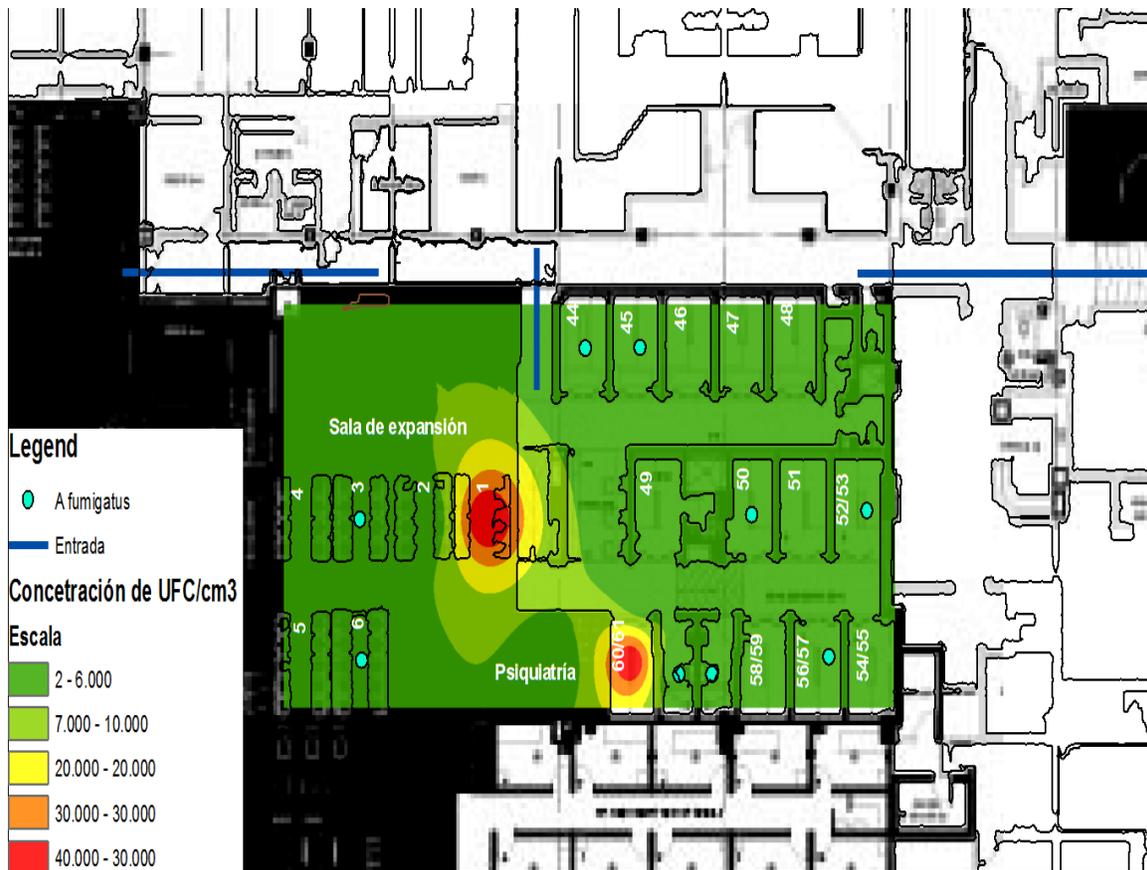


Gráfico 3. distribución de UFC/L de especies de *Aspergillus spp.* en urgencias

En el mapa de concentraciones de UFC/cm³ para la unidad de urgencias se evidencia que 8 de los 27 puntos de muestreo sobrepasan el límite de 100 UFC/cm³ establecido por la ISO 14644 para áreas limpias y ambientes controlados (Mapa 1). Donde cuatro de los ocho puntos que superan este límite se encuentran cerca de las áreas de circulación. En esta área se encontró desde 4UFC/cm³ - 31656 UFC/cm³.



Mapa 2: Concentración de UFC/cm³ de microorganismos encontrados en el área de urgencias

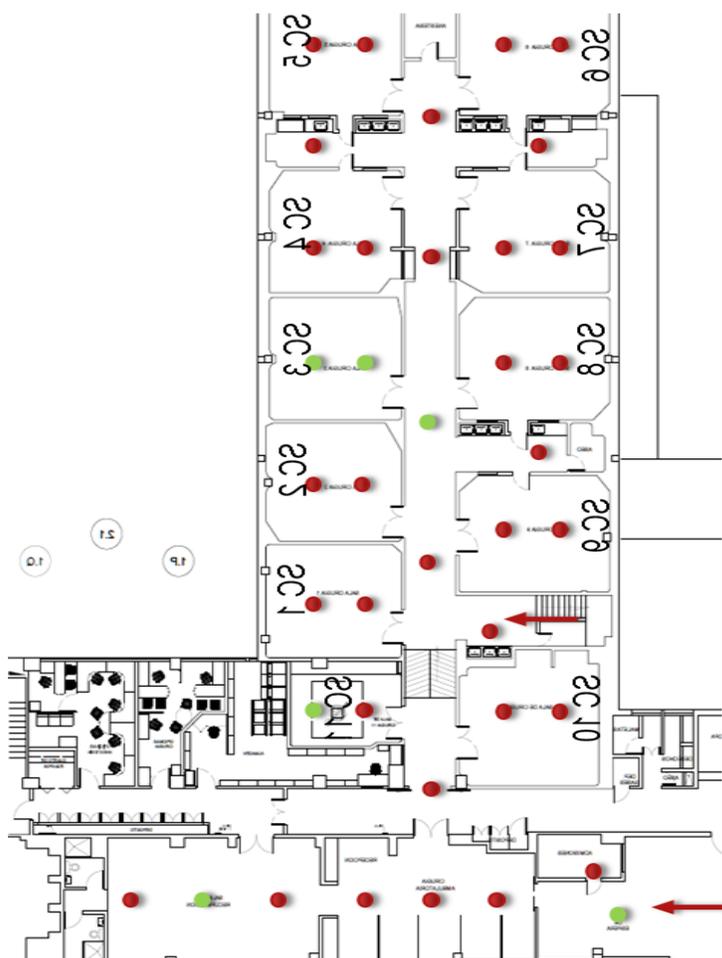
Para la concentración se utilizó como riesgo bajo el límite sugerido en la ISO 14644 respecto a las áreas limpias y ambientes controlados asociados, en donde establece que este debe ser de 100 ufc/m³ para ambientes limpios (15) .

8.5.2. Resultados UFC de salas de cirugía

Del muestreo elaborado en el área de urgencias de 39 puntos de muestreo (Mapa 4) se obtuvo un 91,9% de UFC/L de hongos filamentosos (Tabla 6) los resultados de la distribución de las especies de hongos filamentosos se muestran en el grafico 4 y de las especies de *Aspergillus* spp en el 5.

Tabla 6. Resultados salas de cirugía

Área	No. de muestras	UFC/L totales	UFC/L de hongos filamentosos (%)	UFC/L de <i>Aspergillus</i> spp (%)	UFC/L de <i>Aspergillus fumigatus</i> (%)			
Piso 4	39	1,26	0,53	42,0	0,04	3,3	0,01	28,6



Mapa 3. plano de salas de cirugía con puntos de muestreo. ● Positivo para *Aspergillus fumigatus*; ● Negativo para *Aspergillus fumigatus*

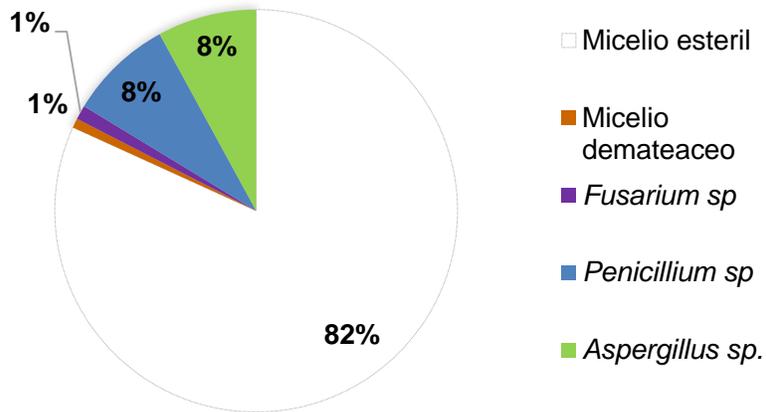


Gráfico 4. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de salas de cirugía

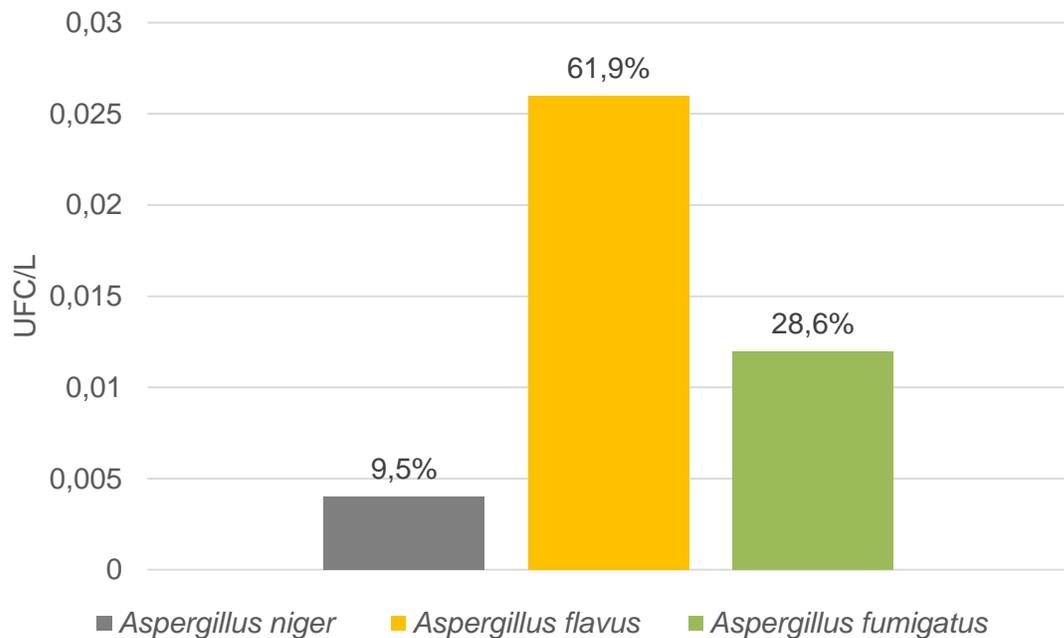
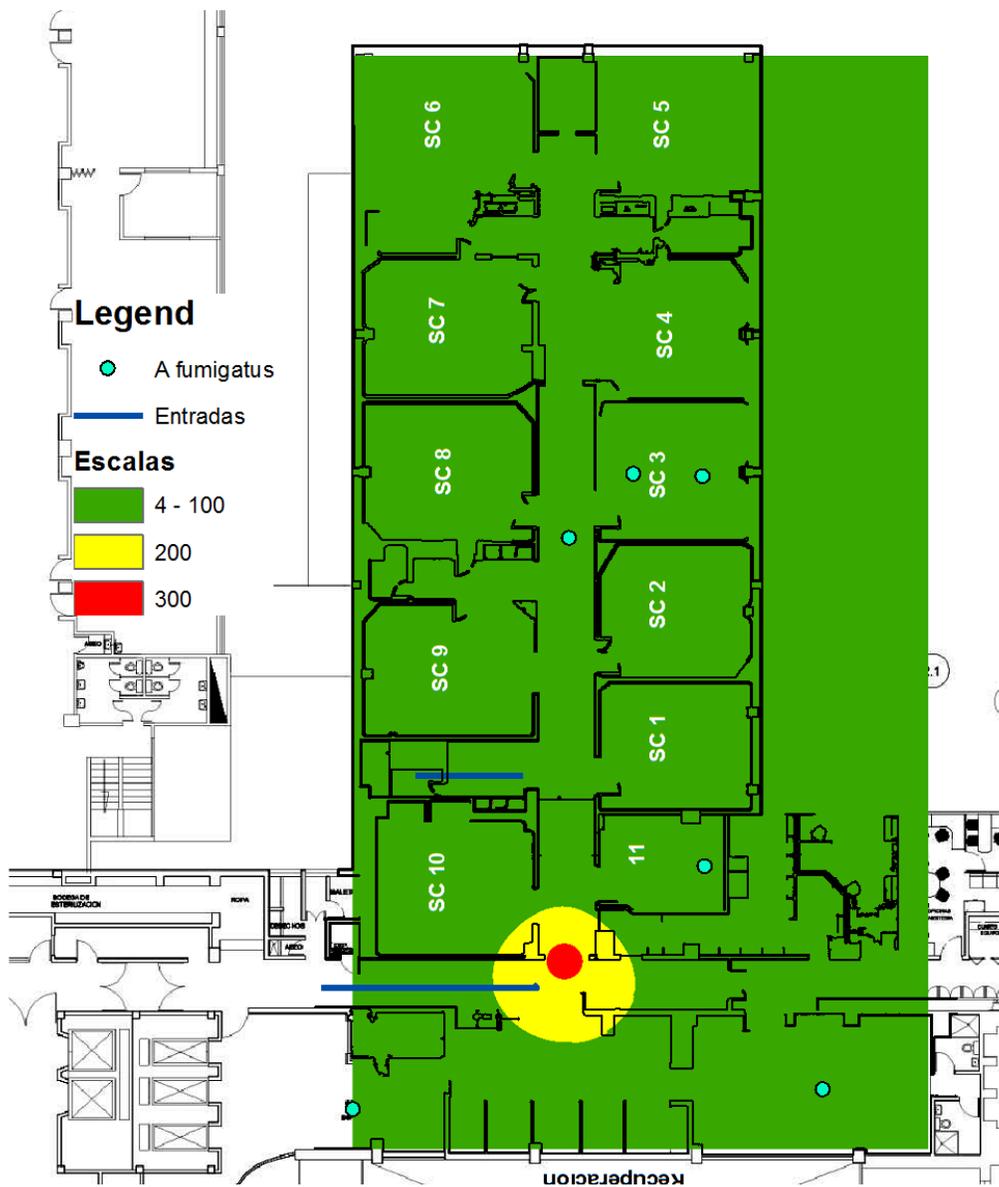


Gráfico 5. distribución de UFC/L de especies de *Aspergillus spp.* en salas de cirugía

En el mapa de concentraciones de UFC/cm³ para la unidad de urgencias se evidencia que 1 de los 39 puntos de muestreo sobrepasan el límite de 100UFC/cm³ establecido por la ISO 14644 para áreas limpias y ambientes controlados (Mapa 2). La mayoría de ellos se encuentran cerca de las áreas de circulación. En esta área se encontró desde 4UFC/cm³ - 220UFC/cm³.



Mapa 4: Concentración de UFC/cm³ de microorganismos encontrados en salas de cirugía

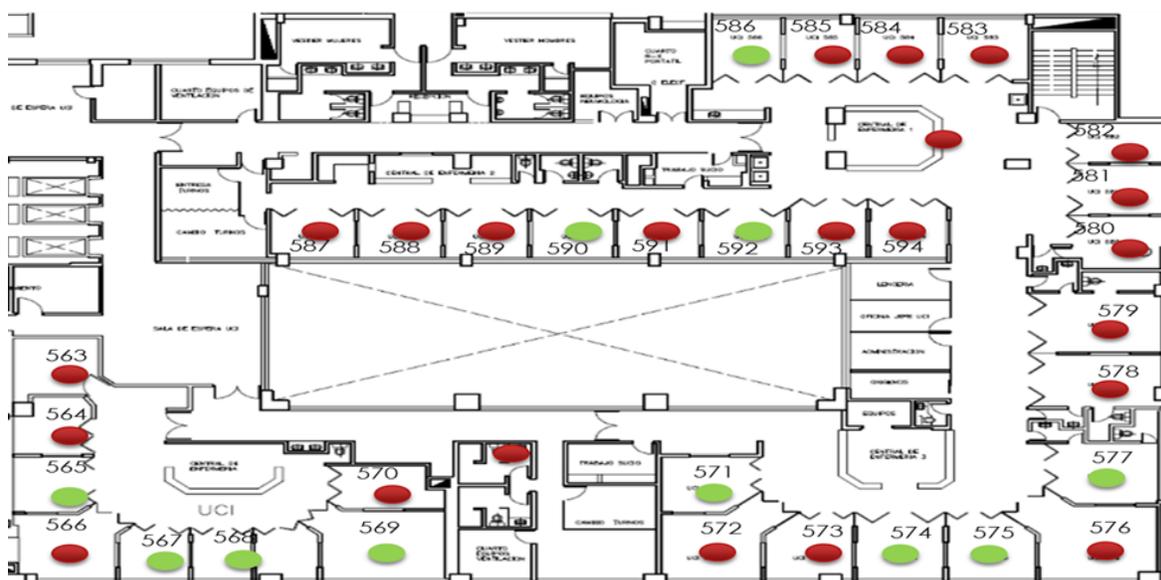
Para la concentración se utilizó como riesgo bajo el límite sugerido en la ISO 14644 respecto a las áreas limpias y ambientes controlados asociados, en donde establece que este debe ser de 100 ufc/m³ para ambientes limpios (15) .

8.5.3. Resultados UFC de la unidad de cuidados intensivos

Del muestreo realizado en la UCI con 34 puntos de muestreo (Mapa 5) se obtuvo un 72,8% de UFC/L de hongos filamentosos (Tabla 7), los resultados de la distribución de las especies de hongos filamentosos se muestran en el grafico 7 y de las especies del genero *Aspergillus* spp 8.

Tabla 7. Resultados unidad de cuidados intensivos

Área	No. de muestras	UFC/L totales	UFC/L de hongos filamentosos (%)		UFC/L de <i>Aspergillus</i> spp (%)		UFC/L de <i>Aspergillus fumigatus</i> (%)	
Piso 5	34	1,88	0,25	13,4	0,08	4,2	0,06	79,6



Mapa 5. plano de UCI con puntos de muestreo. ● Positivo para *Aspergillus fumigatus*; ● Negativo para *Aspergillus fumigatus*

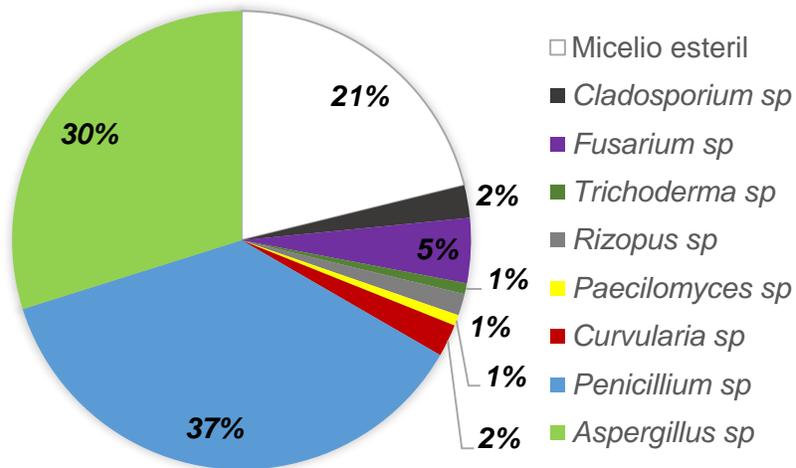


Gráfico 6. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de UCI

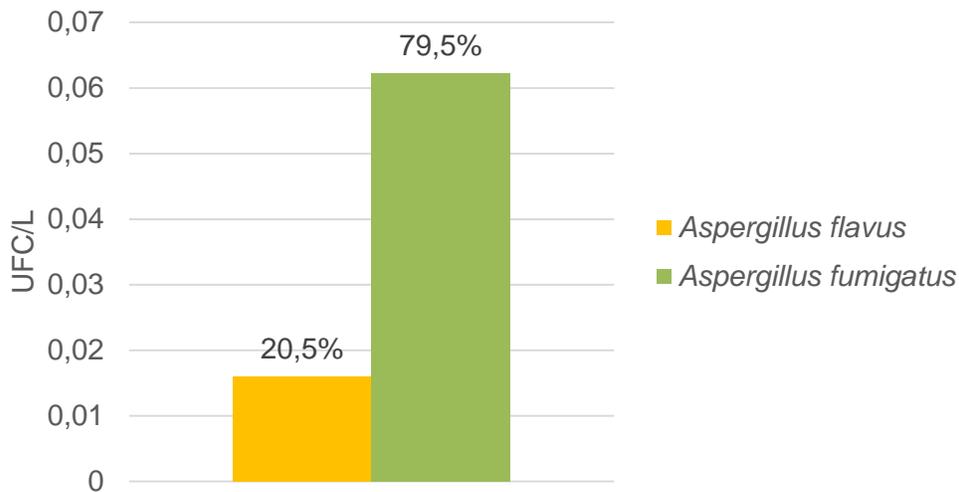
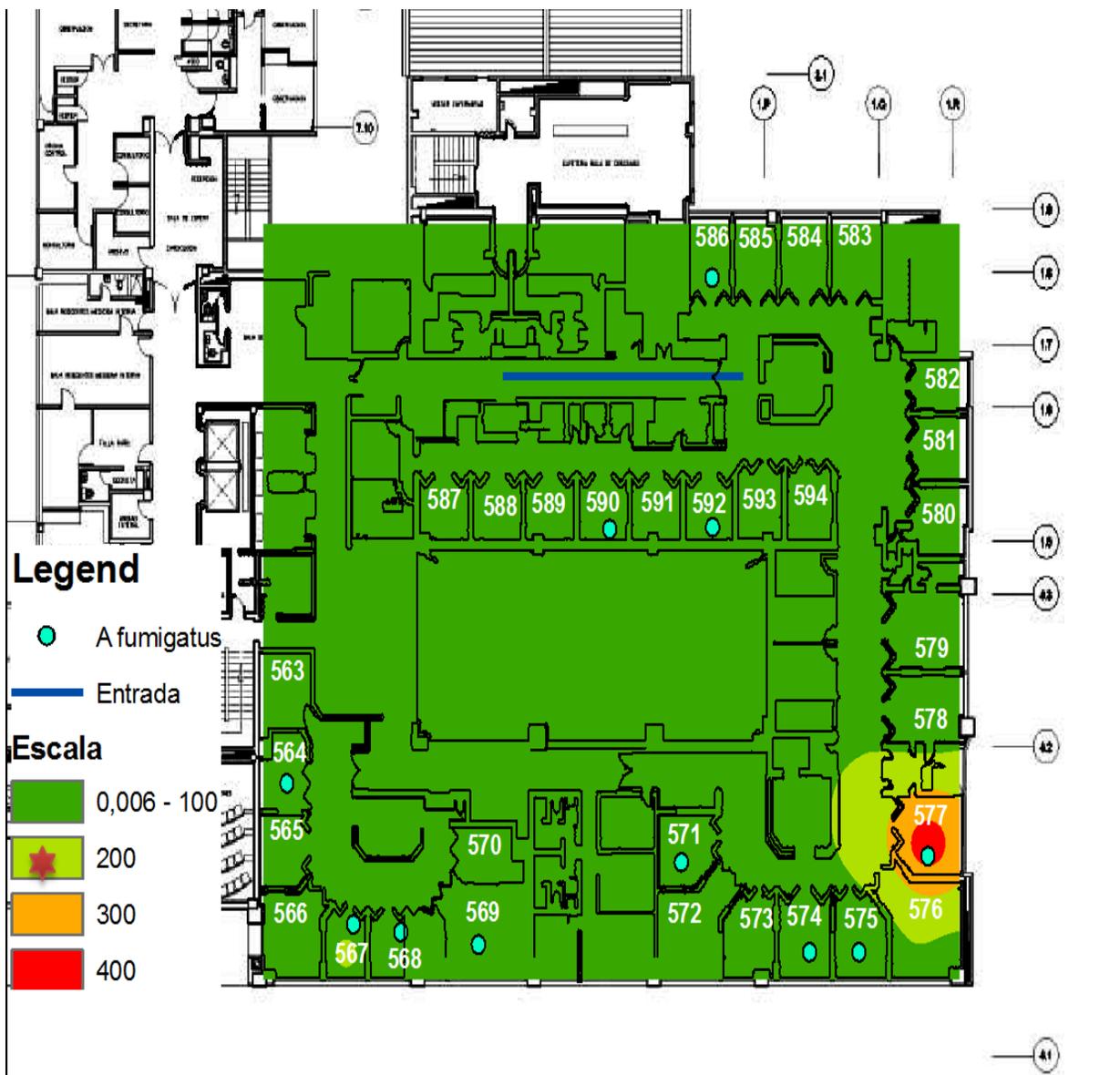


Gráfico 7. distribución de UFC/L de especies de *Aspergillus spp.* en UCI

En el mapa de concentraciones de UFC/cm³ para la unidad de urgencias se evidencia que 1 de los 34 puntos de muestreo sobrepasan el límite de 100UFC/cm³ establecido por la ISO 14644 para áreas limpias y ambientes supervisados (Mapa 3). En esta área se encontró desde 6UFC/cm³ - 334UFC/cm³.



Mapa 6: Concentración de UFC/m³ de microorganismos encontrados en Unidad de Cuidados Intensivos

Para la concentración se utilizó como riesgo bajo el límite sugerido en la ISO 14644 respecto a las áreas limpias y ambientes controlados asociados, en donde establece que este debe ser de 100 ufc/m³ para ambientes limpios (15) .

8.5.4. Resultados UFC de la unidad de hematoncología

Del muestreo que se realizó en la de hematoncología con 38 puntos de muestreo (grafico 4A) se obtuvo un 73,1% de UFC/L de hongos filamentosos (Tabla 8), los resultados de la distribución de las especies de hongos filamentosos se muestran en el grafico 4B y de las especies de *Aspergillus* spp en el 4C del genero *Aspergillus* spp.

Tabla 8. Resultados unidad de hematoncología

Área	No. de muestras	UFC/L totales	UFC/L de hongos filamentosos (%)		UFC/L de <i>Aspergillus</i> spp (%)		UFC/L de <i>Aspergillus fumigatus</i> (%)	
Piso 6	38	5,62	0,26	4,6	0,07	1,2	0,05	76,5



Mapa 7. plano de salas de cirugía con puntos de muestreo. ● Positivo para *Aspergillus fumigatus*; ● Negativo para *Aspergillus fumigatus*.

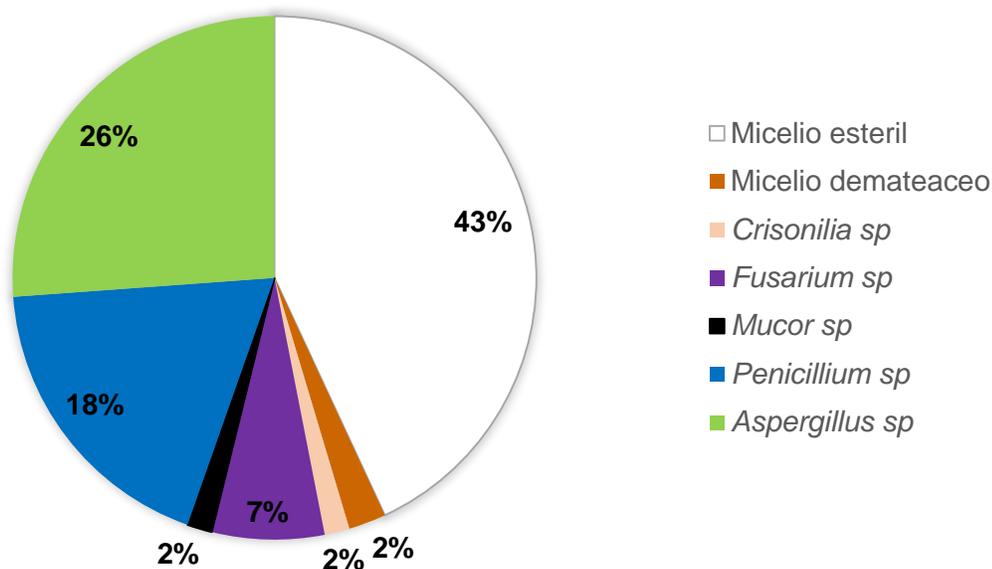


Gráfico 8. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de hematoncología.

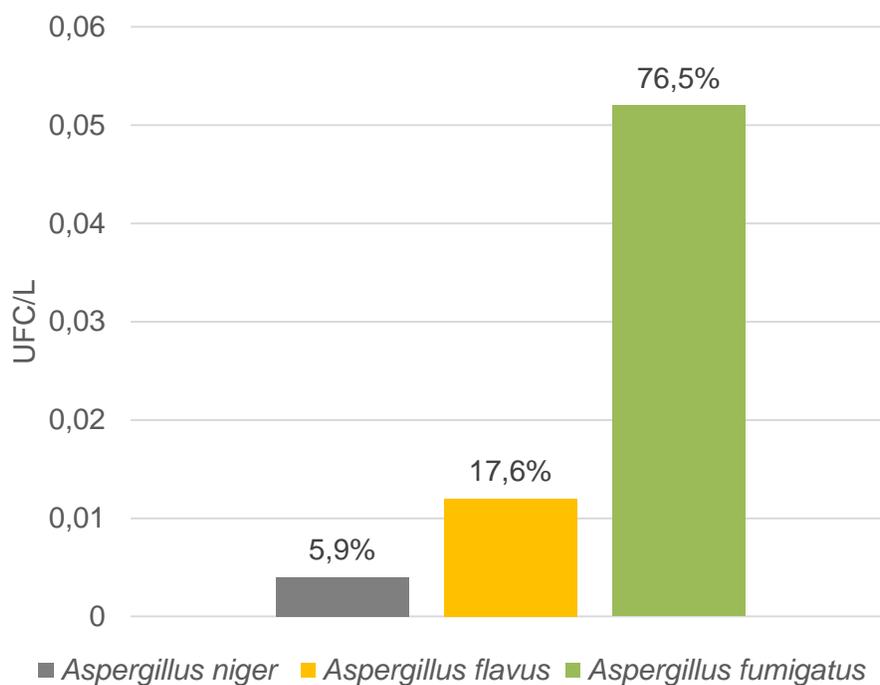
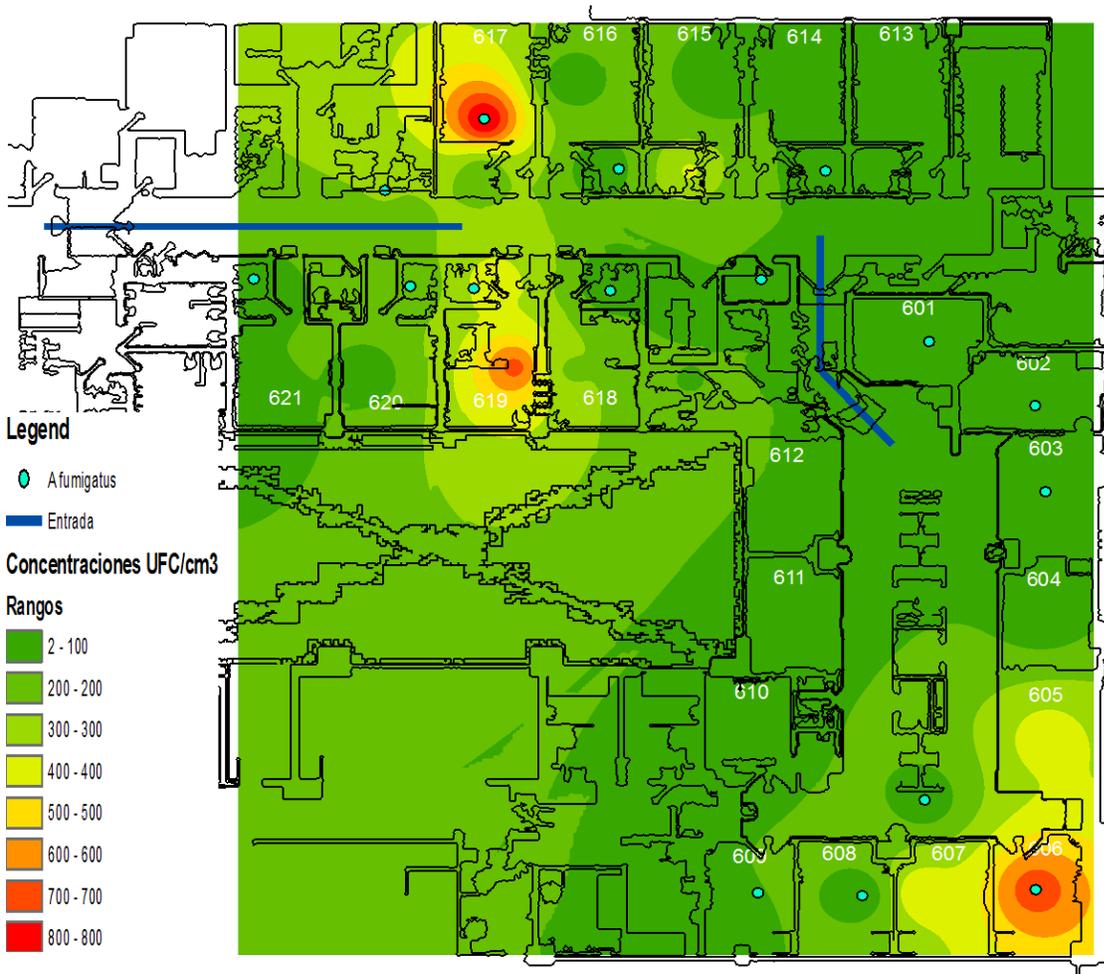


Gráfico 9. distribución de UFC/L de especies de *Aspergillus spp.* en la unidad de hematoncología.

En el mapa de concentraciones de UFC/cm³ para la unidad de urgencias se evidencia que 14 de los 38 puntos de muestreo sobrepasan el límite de 100UFC/cm³ establecido por la ISO 14644 para áreas limpias y ambientes verificados (Mapa 4)

Entre estos 38 puntos 5 de ellos se encuentran cerca de las áreas de circulación. En esta área se encontró desde 2UFC/cm³ - 788 UFC/cm³.



Mapa 8: Concentración de UFC/m³ de microorganismos encontrados en Unidad de hematología

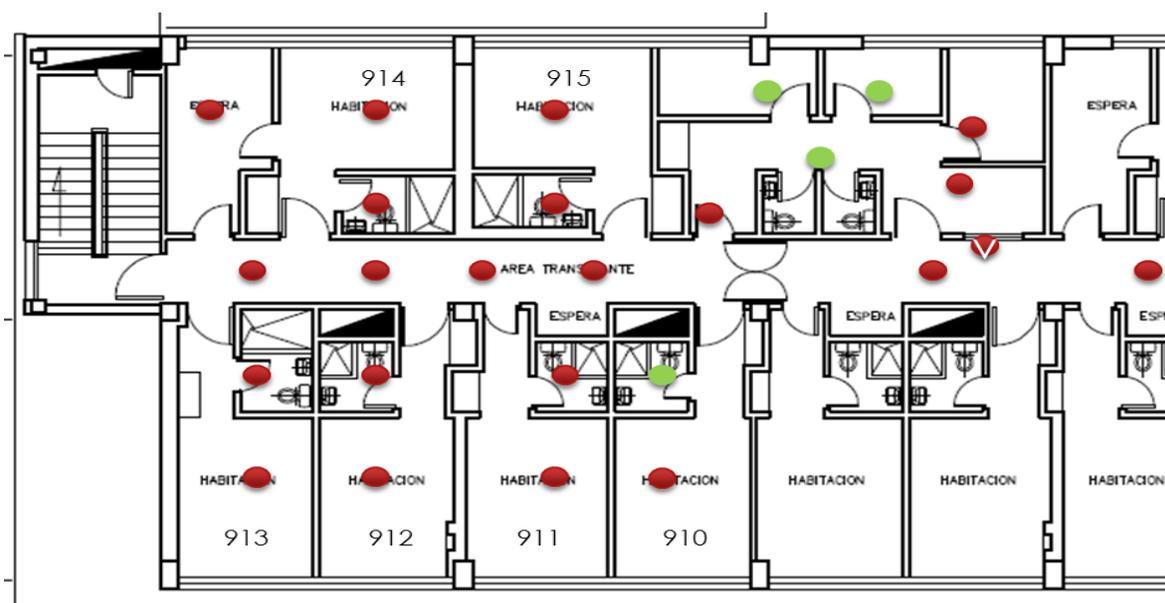
Para la concentración se utilizó como riesgo bajo el límite sugerido en la ISO 14644 respecto a las áreas limpias y ambientes controlados asociados, en donde establece que este debe ser de 100 ufc/m³ para ambientes limpios (15)

8.5.5. Resultados UFC de la unidad de trasplantes

Del muestreo ejecutado en la unidad de trasplantes con 26 puntos de muestreo (grafico 5A), se obtuvo un 88,7% de UFC/L de hongos filamentosos (Tabla 9), los resultados de la distribución de las especies de hongos filamentosos se muestran en el grafico 5B y de las especies de *Aspergillus* spp en el 5C del genero *Aspergillus* spp.

Tabla 9. Resultados unidad de trasplantes

Área	No. de muestras	UFC/L totales	UFC/L de hongos filamentosos (%)		UFC/L de <i>Aspergillus</i> spp (%)		UFC/L de <i>Aspergillus fumigatus</i> (%)	
Piso 9	26	1,15	0,11	9,2	0,01	1,0	0,01	66,7



Mapa 9. plano de salas de cirugía con puntos de muestreo. ● Positivo para *Aspergillus fumigatus*; ● Negativo para *Aspergillus fumigatus*.

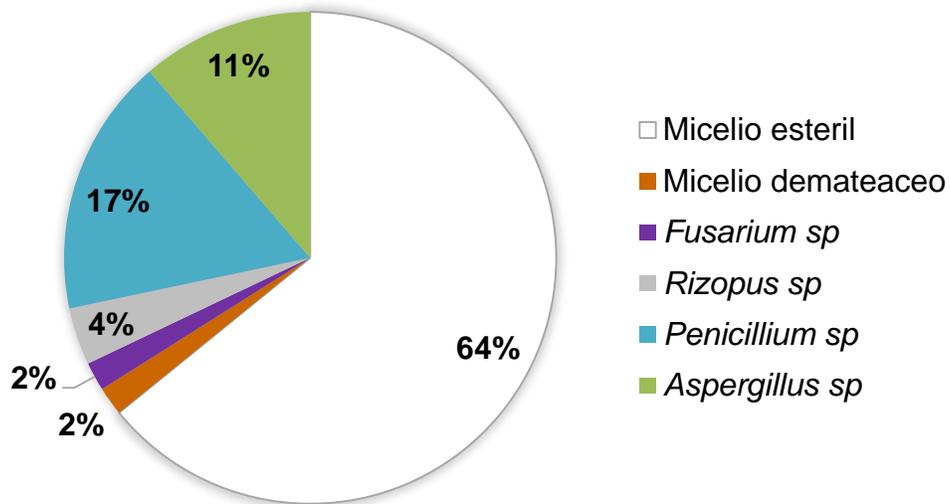


Gráfico 10. distribución de UFC/L hongos filamentosos encontradas en el área de trasplantes.

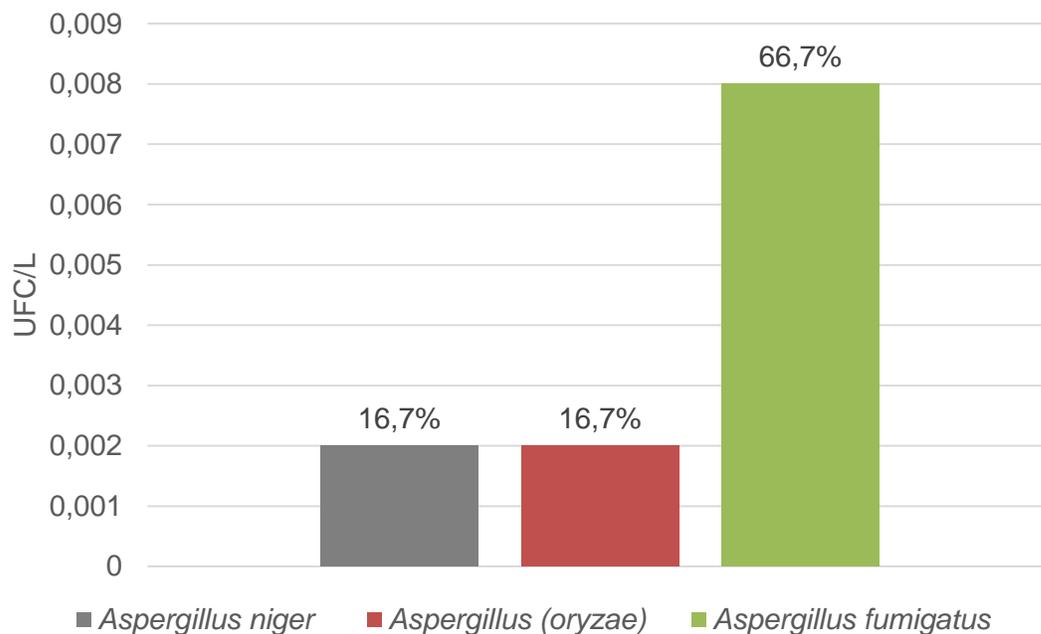
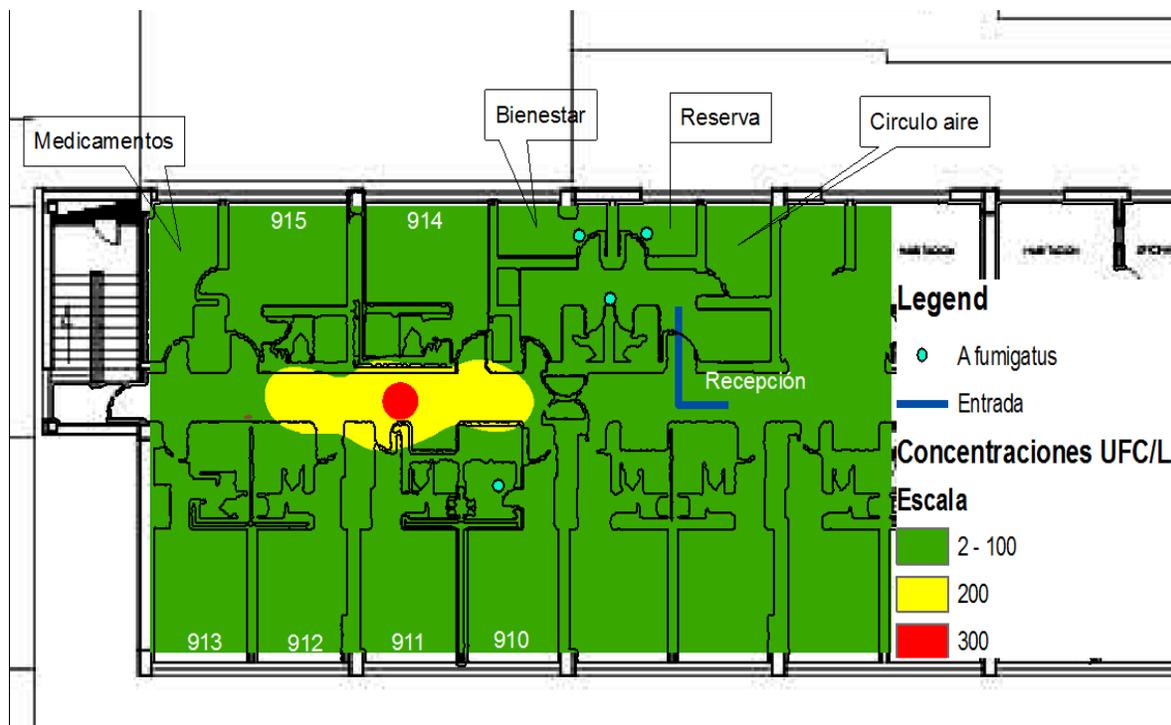


Gráfico 11. distribución de UFC/L de especies de *Aspergillus spp.* en la unidad de trasplantes.

En el mapa de concentraciones de UFC/cm³ para la unidad de urgencias se evidencia que 2 de los 26 puntos de muestreo sobrepasan el límite de 100UFC/cm³ establecido por la ISO 14644 para áreas limpias y ambientes controlados (Mapa 5). En esta área se encontró desde 2UFC/cm³ - 248UFC/cm³.



Mapa 10: Concentración de UFC/m³ de microorganismos encontrados en Unidad de trasplantes

Para la concentración se utilizó como riesgo bajo el límite sugerido en la ISO 14644 respecto a las áreas limpias y ambientes controlados asociados, en donde establece que este debe ser de 100 ufc/m³ para ambientes limpios (15)

8.5.6. Comparación de UFC/L de hongos filamentosos de HUSI

Durante el periodo de estudio se aislaron un total de 626 UFC de hongos filamentosos para un total de 1,26 UFC/l de hongos filamentosos (Tabla 10). Los detalles de la distribución de las especies y la distribución según el sitio de muestra se indican en el gráfico 6.

Tabla 10. Comparación de UFC/L de HUSI

Área	No. de muestras	UFC/L totales	UFC/L de hongos filamentosos		UFC/L de <i>Aspergillus spp</i>		UFC/L de <i>Aspergillus fumigatus</i>	
			UFC/L	%	UFC/L	%	UFC/L	%
Piso 1	27	64,11	0,12	0,2	0,04	0,1	0,02	52,6
Piso 4	39	1,26	0,53	42,0	0,04	3,3	0,01	28,6
Piso 5	34	1,88	0,25	13,4	0,08	4,2	0,06	79,6
Piso 6	38	5,62	0,26	4,6	0,07	1,2	0,05	76,5
Piso 9	26	1,15	0,11	9,2	0,01	1,0	0,01	66,7

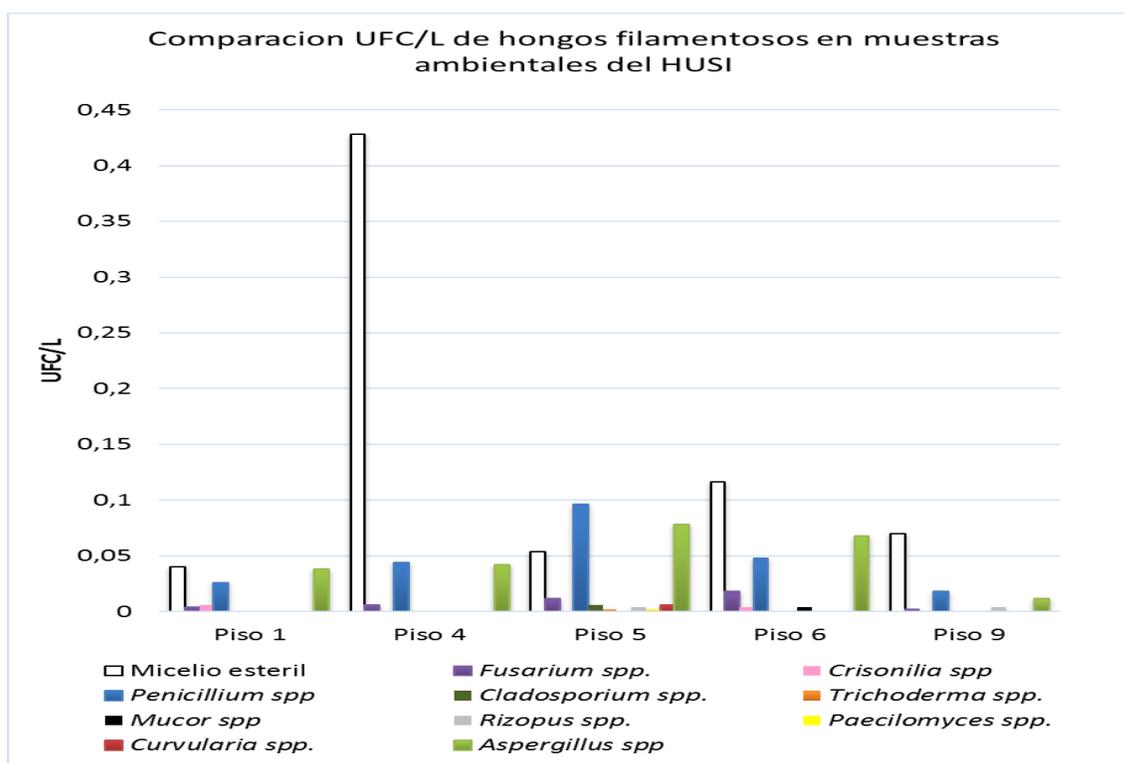


Gráfico 12. Comparación UFC/L de hongos filamentosos de HUSI

Uno de los géneros de mayor importancia dentro de los hongos filamentosos es *Aspergillus*. En el gráfico número siete observamos la distribución de las especies del género *Aspergillus spp.*

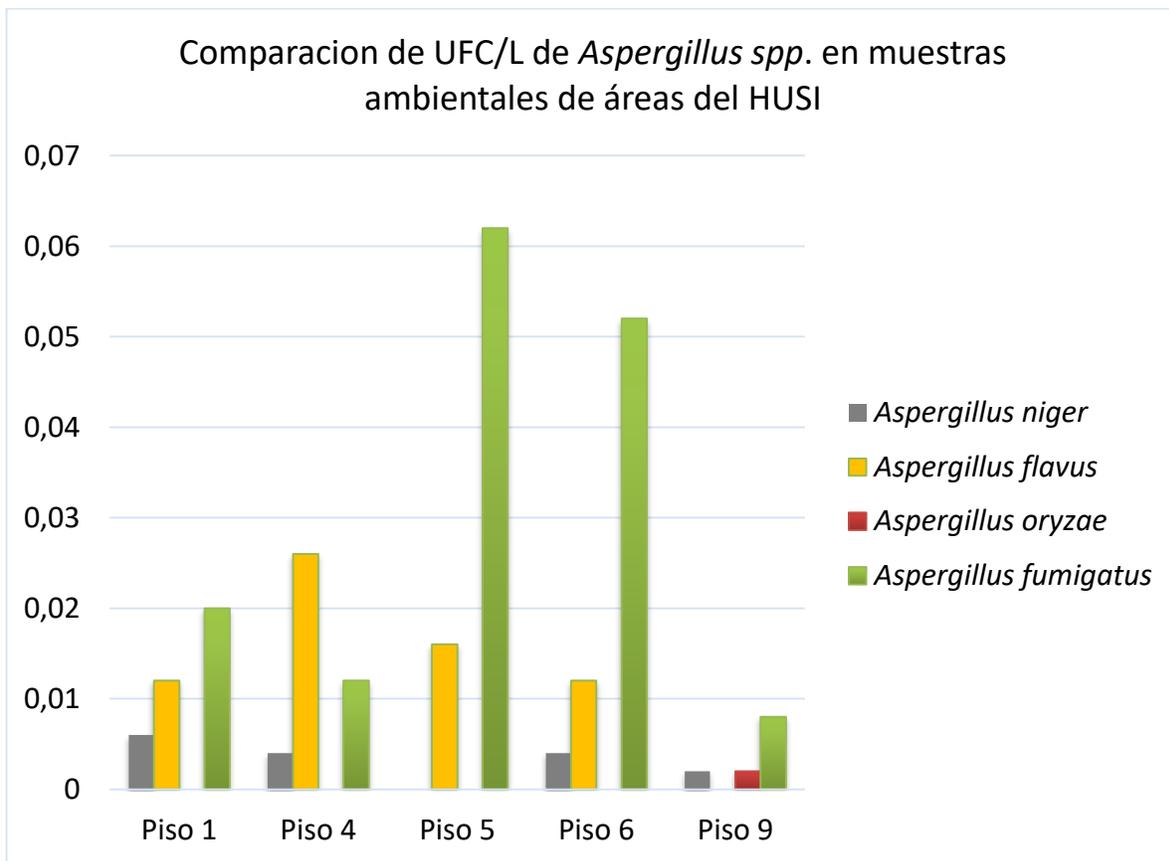


Gráfico 13. Comparación de UFC/L *Aspergillus spp* del HUSI.6

8.6. Análisis por espectrometría de masas de cepas aisladas de *Aspergillus fumigatus*

Se analizaron 37 cepas de *Aspergillus fumigatus*, de las cuales 3 no se lograron identificar por espectrometría de masas. Una vez se obtuvo identificación para las cepas procesadas se realizó análisis por multicomponentes (PCA), *Heat maps* y dendograma; estos análisis realizados con el software MALDI Biotyper RTC 3.1 y Flex análisis nos permiten determinar de forma gráfica clusters basados en los espectros de masas obtenidos para cada microorganismo.

Para el análisis PCA se obtuvieron cuatro clusters (rojo, amarillo, verde, azul) grafico 8.

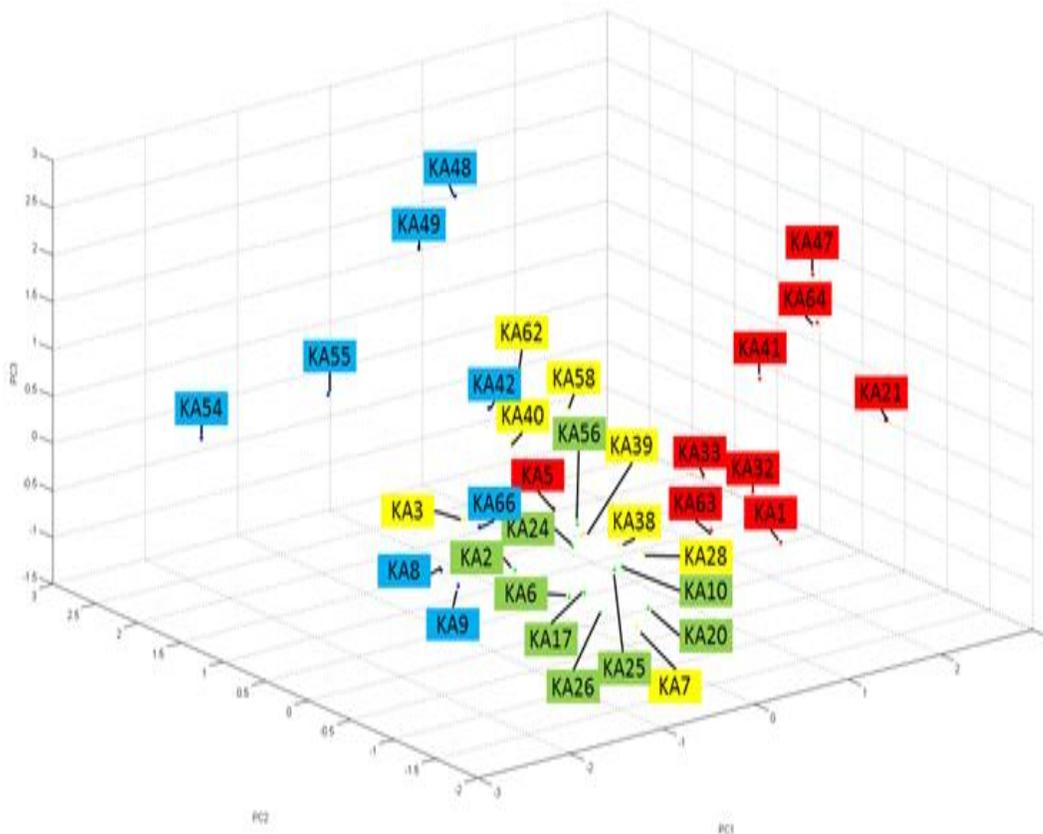


Gráfico 14. Análisis por multicomponentes PCA de las 34 cepas Identificadas como *Aspergillus fumigatus*.

Mapa de calor: Para la construcción de este se seleccionaron los espectros de masas obtenidos para las 34 cepas. En este se observa la comparación de los espectros en forma de un gel, se observa una proteína en aproximadamente 6000KD en todas las cepas

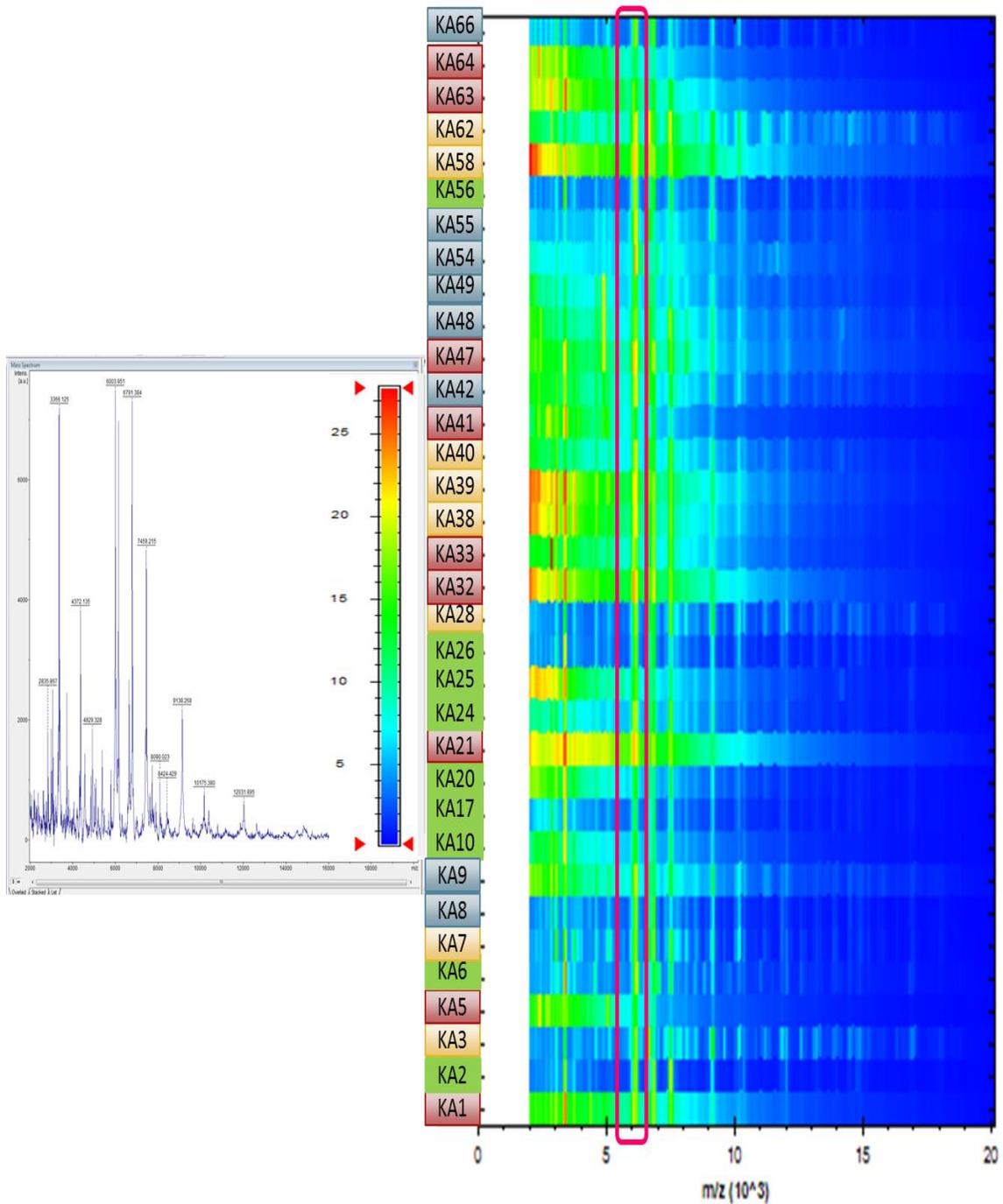


Gráfico 15. Mapa de calor de 34 cepas de *Aspergillus fumigatus*

Dendrograma

Para la construcción del dendrograma se seleccionaron los espectros de masas obtenidos para las 34 cepas y se corre el análisis. Este arroja como resultado la división 4 grandes grupos o clados, como se muestra en el grafico 9. Dentro de dichos clados se evidencia la formación de subgrupos.

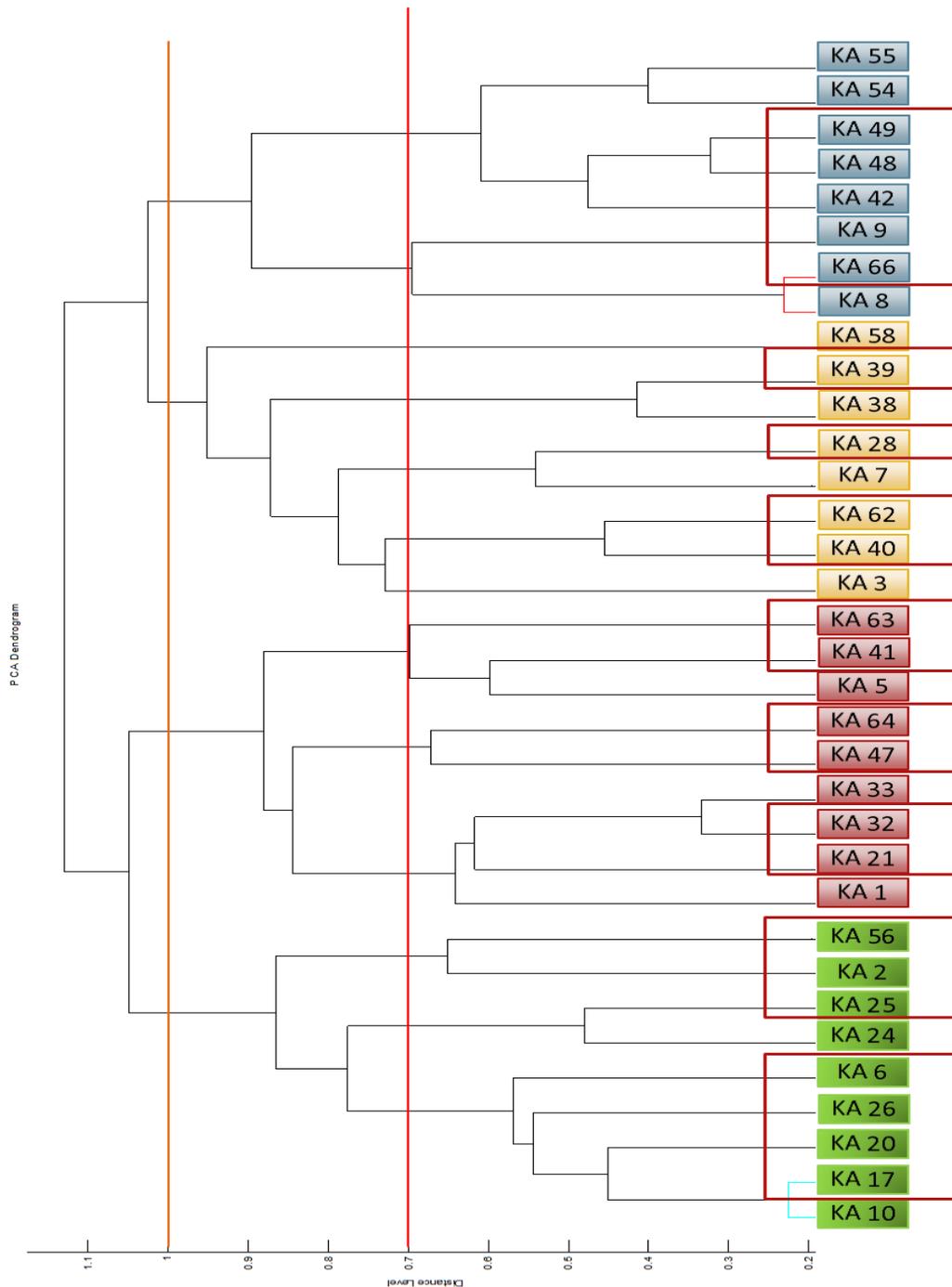


Gráfico 16. Dendrograma de 34 cepas se *Aspergillus fumigatus*

8.7. Detección de resistencia a azoles en cepas de *Aspergillus fumigatus*

En las pruebas de tamizaje frente a itraconazol SIGMA I6657 o voriconazol Pfizer FEND, se identificaron 28 cepas de *Aspergillus fumigatus* resistentes a voriconazol (tabla 11). Adicionalmente se realizó un análisis de los espectros obtenidos por MALDI TOF, en el cual se evidencio que la mayoría de cepas resistentes a

9. Discusión

En nuestro estudio encontramos, para el total de microorganismos (colonias cremosas y filamentosas), que dos de las cinco áreas evaluadas superaron el valor mínimo establecido por la ISO 14644 de 100 UFC/cm³, correspondientes a urgencias con un promedio de 2374UFC/cm³ y unidad de hematoncología con 147UFC/cm³.

El área con mayor UFC/L de hongos filamentosos fueron las salas de cirugía con 0,52 UFC/L (41,4%), seguido de la unidad de hematoncología con 0,26 UFC/L (4,6%), la unidad de cuidados intensivos con 0,25 UFC/L (13,3%), urgencias con 0,12 UFC/L (0,2%) y unidad de trasplantes con 0,11 UFC/L (9,2%); estos resultados son comparables con los resultados arrojados en el estudio realizado por Cardenas y colaboradores en 2008, en cual reportan una concentración mayor de UFC/L en salas de cirugía (325 UFC/L) (10). Sin embargo, en el muestreo que realizamos no se observaron concentraciones tan altas como las reportadas por Cardenas y colaboradores en 2008, este puede ser atribuido a que partir del este estudio, se implementaron en el hospital diferentes medidas de control y vigilancia activa sobre los pacientes en riesgo y sobre las áreas de mayor densidad o en construcción (9).

De los hongos filamentosos con importancia clínica a nivel hospitalario se encontraron géneros como: *Aspergillus* spp, *Curvularia* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Paecilomyces* spp, *Mucor* spp., *Rhizopus* spp y *Trichoderma* spp, los cuales son agentes causales de IFI en pacientes inmunocomprometidos; aunque estas EFI por hongos emergentes se observan en muy pocos casos, su importancia está en sus factores de virulencia, en el grado de inmunosupresión del huésped y en su perfil de tratamiento antifúngico (3).

De los géneros que se encontró menor cantidad de UFC/L fue *Paecilomyces* spp, *Trichoderma* spp y *Curvularia* spp. El género *Paecilomyces* spp causa generalmente queratitis fúngica en personas que usan lentes de contacto, de este género se han descrito infecciones de piel del tejido subcutáneo afectaciones pulmonares, peritonitis (asociadas a diálisis), endocarditis, abscesos esplénicos, meningitis, y enfermedad diseminada. Las especies principales de *Paecilomyces* spp son: *P. lilacinus*, *P. variotti*, *P. marquandii*. y *P. lilacinus* (19).

Del género *Trichoderma* spp, se ha descrito como fuente de contaminación probable la inhalación de aerosoles de agua no estéril. *T. longibrachiatum* es la especie que se ha asociado con mayor frecuencia a infecciones invasivas; de este género se han descrito casos de abscesos cerebrales, hepáticos y pulmonares. Su diagnóstico se realiza mediante la observación en los tejidos de finas hifas hialinas septadas o por aislamiento en los cultivos de las muestras (19).

Y el género *Curvularia* spp son hongos ubicuos aislados de aire, plantas y detritus orgánicos. Se adquieren por inhalación o por inoculación cutánea, son causantes de micosis oportunistas, su incidencia es baja. Las formas clínicas más frecuentes son la sinusitis, la neumonía, los abscesos cerebrales y las formas diseminadas (19).

Seguidos de estos tres géneros los mucorales como *Rhizopus* spp. y *Mucor* spp, pueden originar micosis diseminadas. Aunque en la mayoría de ocasiones la puerta de entrada de estos agentes es la vía aérea, también se presentan en infecciones sistémicas por ingestión o contaminación de heridas. Además de pacientes receptores de TPH y TOS, se ha observado EFI en pacientes diabéticos, aquellos a los que se les administra quelantes de hierro o en adictos a drogas alimentados por vía parenteral. La rapidez para invadir tejidos y diseminarse por los vasos sanguíneos es una de las características más relevantes de los mucorales y también la responsable de la alta tasa de mortalidad (> 90%) que originan, junto con la resistencia intrínseca a muchos antifúngicos sistémicos (2).

El género *Fusarium* spp aunque no se encontró en mayor concentración es un importante agente causal de IFI en pacientes con hemopatías, receptores de TPH o TOS, las especies *F. solani* y *F. oxysporum* son las más frecuentes, este moho ingresa usualmente por vías respiratorias, aunque también por inoculación a través de la piel o de las mucosas. Una importante característica de *Fusarium* spp, es su frecuente aislamiento en hemocultivos (2).

Aspergillus es el género de mayor importancia a nivel intrahospitalario y del cual se encontró una mayor concentración de UFC. Sus especies son actualmente la principal causa de EFI por mohos en pacientes inmunodeprimidos (7), durante nuestro estudio encontramos distintas especies de *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* (0,066UFC/L), *Aspergillus niger* (0,016 UFC/L) y *Aspergillus fumigatus* con una mayor concentración de UFC/L (0,154UFC/L), no obstante, la presencia de UFC de

Aspergillus fumigatus no son equivalentes a una alta concentración de UFC; esto nos indica que este agente causal está presente en las áreas evaluadas pero su presencia no depende de una alta concentración de UFC, como se ejemplifica en los mapas de concentración de UFC/cm³. Estos resultados son comprobables con lo reportado por Gabriella Pini y colaboradores en 2008 en el cual reportan que a pesar de tener bajas concentraciones de UFC en el ambiente se presentan casos de posible *Aspergillosis* en pacientes neutropénicos (20).

Teniendo en cuenta que *A. fumigatus* representa una de las principales causas infecciosas de muerte (12) y el tratamiento de primera línea para la *Aspergilosis* invasiva (AI) en pacientes inmunocomprometidos es el voriconazol, el cual está siendo desafiado por la aparición de resistencia a los azoles (14). En nuestro reporte evidenciamos que de 37 las cepas estudiadas se encontraron cepas resistentes en todas las áreas por las que transitan los pacientes hematológicos, en el área de urgencias 44% de las cepas son resistentes, en salas de cirugía y la unidad de trasplantes se encontró 100% de resistencia, en la UCI 66% de las cepas son resistentes, en la unidad de hematología un 92% son resistentes. Estos aumentos en los perfiles de resistencia de *Aspergillus fumigatus* también fueron reportados por LePape y colaboradores en el año 2015 en muestras de suelos de campos de flores Colombianas, en este trabajo ellos concluyeron que la resistencia adquirida de este hongo puede tener una relación con el uso de pesticidas usados en los cultivos y la resistencia triazoles (8). En otro estudio ambiental realizado en un hospital de Kuwait se reportaron *Aspergillus fumigatus* resistentes a triazoles con mutaciones en *cyp51A* (7), lo que nos indica que su presencia en el medio ambiente apunta a la posibilidad de que estos *Aspergillus* resistentes lleguen a individuos susceptibles, como lo reportado por Alanio y colaboradores en este año, en el cual se encontraron cepas de *Aspergillus fumigatus* resistentes a azoles de muestras respiratorias de pacientes inmunocomprometidos con probable o probada *Aspergilosis* invasiva en un hospital de París, Francia (14).

La identificación de hongos filamentosos en los laboratorios se realiza por métodos convencionales, pero estos estudios morfológicos son complejos, llevan de bastante tiempo y son altamente subjetivos, a menudo llevan a resultados no concluyentes o erróneos, actualmente la espectrometría de masas MALDI-TOF se presenta como una poderosa herramienta para caracterizar una gran cantidad de microorganismos,

esta técnica se ha aplicado en la caracterización de especies de mohos clínicamente relevantes mediante el análisis de colonias de hongos jóvenes y maduros, tal como se recupera de muestras clínicas en medios fúngicos de diagnóstico (21). Esta técnica nos permitió obtener una tasa de identificación del 91% sin errores de identificación; tres cepas no fueron identificadas por un crecimiento atípico que pudo ser causado por el modo en cómo fueron guardadas. En el análisis de los espectros de proteínas obtenidos por el equipo pudimos evidenciar cuatro grandes clados, esto nos sugiere que los *Aspergillus fumigatus* no provienen de un solo clon y pueden venir de diferentes ambientes. Del análisis del perfil proteómico de las cepas resistentes no se encontró ninguna diferencia ya que se encuentran en los cuatro clados del dendograma y aunque en el análisis de PCA se agrupan en su gran mayoría en el PC1 también se observan cepas en los otros componentes (grafico 11).

En la evaluación ambiental del HUSI se pudo evidenciar que las restricciones de ingreso a áreas que deben estar controladas no se realizan de forma adecuada y esto puede predisponer un mayor ingreso de microorganismos en estas áreas como lo reportado por Giuseppina Caggiano y colaboradores en el 2014, dónde se encontró una mayor contaminación por hongos en la unidad de hematología pediátrica, aparentemente a la presencia de más personal y otros (padres, payasos para ayudar a la terapia convencional y psicólogos) o debido a la migración natural de esporas de hongos en la ropa de las personas que venían del exterior (14). Durante el periodo de muestreo el hospital se encontraba en remodelación, lo que pudo elevar la concentración de las esporas de *Aspergillus*, ricas en polvo, asociadas con la construcción de edificios cercanos, la demolición interna, la construcción y la renovación de las salas de hospitales, en donde los sistemas de ventilación pueden fácilmente ser invadidos por agentes patogénicos y crear un depósito de esporas en el ambiente interior y las áreas de circulación como una vía perfecta para ser llevados a todas las áreas del hospital. Aunque los sistemas de filtración han sido el primer paso para lograr aire libre de partículas y una forma de mejorarlos ha sido la adición de filtros HEPA en las áreas de atención especial a nivel hospitalario (2). Su efecto y medidas de control intrahospitalario se ven reflejados en la comparación con los resultados reportados por Cárdenas y colaboradores en 2008, aunque ellos no encontraron la presencia de UFC de *Aspergillus fumigatus* y si presentaron

concentraciones de UFC/L mucho más altas (9). No obstante, se siguen presentando enfermedades fúngicas invasivas a nivel intrahospitalario (22-24)

10. Conclusiones

1. La caracterización de los cinco ambientes hospitalarios relacionados con la presencia de pacientes con patologías hematoncológicas en el HUSI, mostraron que solo uno implementa el sistema de filtración con sistemas HEPA, el cual corresponde a la unidad de trasplantes, tres manejan protocolos de acceso restringido, salas de cirugía, UCI y hematoncología, los cuales incluyen procedimientos que establecen indumentaria y manejo de puertas cerradas, y el área de urgencias que no cuenta con ningún protocolo de control de ambientes.
2. En el estudio de la carga fúngica de las diferentes áreas en el HUSI se encontró que tres de las cinco áreas evaluadas: urgencias, salas de cirugía y UCI, tienen una mayor concentración de UFC/cm³ en los sitios de acceso, los cuales se encuentran cerca a áreas de circulación como escaleras y ascensores. Lo cual quizás sugiere la implementación de algún tipo de barrera mecánica, en estos accesos que impida la dispersión de los microorganismos.
3. En la medición de la carga microbiana de las áreas, encontramos que en dos de las áreas se superan la carga microbiana establecida por la ISO 14644 la cual instaure como riesgo bajo el hallazgo de hasta 100 UFC/cm³. Estas correspondieron al área de urgencias, que no cuenta con protocolos de protección de ambientes y el sexto piso en la zona de hospitalización de pacientes hematooncologicos, la cual, aunque cuenta con protocolos de protección se ambientes, es posible que no haya una buena adherencia a estos. En las otras áreas, aunque en el global de la carga no se supera el límite de la norma, si hay puntos de muestreos específicos donde se supera el umbral de la carga clasificada como de bajo riesgo.
4. Se encontraron UFC de hongos filamentosos de importancia clínica en todas las áreas como: *Aspergillus* spp y *Fusarium* spp, entre otros con capacidad de crecimiento a 35°C. lo cual se considera como el factor de virulencia esencial para el inicio de una enfermedad fúngica invasiva.

5. El análisis del proteoma global de todos los aislamientos de *Aspergillus fumigatus* mostró la presencia de cuatro clados, los cuales posiblemente corresponden a cuatro clones circulantes en HUSI.
6. Mediante las pruebas de tamizaje realizadas para evaluar el perfil de susceptibilidad se encontraron aislamientos de *Aspergillus fumigatus* con perfil de resistencia frente a itraconazol y voriconazol, los cuales están distribuidos en los cuatro clados mostrados en el análisis del proteoma global.
7. El estudio de la aerobiología de hongos filamentosos mostro que su dispersión en el ambiente hospitalario está influenciada por tres factores: las vías de circulación, el alto flujo de personal y los sistemas de ventilación empleados en cada área.

11. Recomendaciones

1. La primera estrategia de control de infecciones fúngicas invasivas debe ser minimizar la exposición a esporas fúngicas ambientales transmitidas por el aire en los centros hospitalarios donde se encuentren pacientes hematoncológicos, con neutropenias prolongadas, trasplantes y cirugías mayores, debido a que estas son adquiridas por la inhalación de esporas. Por lo cual es necesario mantener continuas jornadas de sensibilización para mantener adherencia a los protocolos indumentaria y manejo de puertas cerradas
2. Es necesario realizar un análisis de los perfiles genéticos de las cepas resistentes con el fin de encontrar los genes implicados.

12. Bibliografía

1. Silver Ibharr Hall e. *Aerobiology : proceedings of the Third International Symposium held at the University of Sussex, England*. 3d ed. London 1970. p. xvi, 278 p. : ill.
2. Pemán J, Salavert M. *Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013;Vol. 31. Núm. 05. Mayo 2013.
3. Pemán J, Salavert M. *Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011;Vol. 30. Núm. 02. Febrero 2012.
4. Sales-Campos H, Tonani L, Cardoso CR, Kress MR. The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. *Biomed Res Int*. 2013;2013:693023.
5. Kim JY. Human fungal pathogens: Why should we learn? *J Microbiol*. 2016;54(3):145-8.
6. Schlam D, Canton J, Carreño M, Kopinski H, Freeman SA, Grinstein S, et al. Gliotoxin Suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Homeostasis. *MBio*. 2016;7(2).
7. Ahmad S, Khan Z, Hagen F, Meis JF. Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait. *Environ Res*. 2014;133:20-6.
8. Le Pape P, Lavergne RA, Morio F, Alvarez-Moreno C. Multiple Fungicide-Driven Alterations in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Colombia, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(1):156-7.
9. Ximena Cárdenas M, Alberto Cortes J, Marcela Parra C. Presencia de *Aspergillus* spp. en áreas de riesgo en pacientes trasplantados en un hospital universitario. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2008;25(4):232-6.
10. Engelhart S, Hanfland J, Glasmacher A, Krizek L, Schmidt-Wolf IG, Exner M. Impact of portable air filtration units on exposure of haematology-oncology patients to airborne *Aspergillus fumigatus* spores under field conditions. *J Hosp Infect*. 2003;54(4):300-4.
11. Caggiano G, Napoli C, Coretti C, Lovero G, Scarafilo G, De Giglio O, et al. Mold contamination in a controlled hospital environment: a 3-year surveillance in southern Italy. *BMC Infect Dis*. 2014;14:595.
12. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol*. 2016;7:683.
13. Heinekamp T, Schmidt H, Lapp K, Pähz V, Shopova I, Köster-Eiserfunke N, et al. Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. *Semin Immunopathol*. 2015;37(2):141-52.
14. Alanio A, Denis B, Hamane S, Raffoux E, Peffault de Latour R, Menotti J, et al. Azole Resistance of *Aspergillus fumigatus* in Immunocompromised Patients with Invasive Aspergillosis. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(1):157-8.
15. Estandarización Oipl. ISO 14644-1, Cleanrooms and associated controlled environments, Part 1: Classification of airborne, Ginebra: Organización Internacional para la Estandarización.. 2016.
16. Andrew E. Clark. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology In: Erin J. Kaleta AA, Donna M. Wolk, editor. 2013. p. 549-602
17. Nakamura S, Sato H, Tanaka R, Yaguchi T. Verification of Ribosomal Proteins of *Aspergillus fumigatus* for Use as Biomarkers in MALDI-TOF MS Identification. *Mass Spectrom (Tokyo)*. 2016;5(1):A0049.
18. Ignacio HUS. *Servicios y especialidades 2016* [Available from: <http://www.husi.org.co/servicios-y-especialidades/especialidades-clinicas/>].
19. María Carmen Fariña *Formas clínicas y tratamiento de las infecciones causadas por otros hongos filamentosos*. In: Marta Fernández-Sampedro CA, editor. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Elsevier 2012. p. 414–9.
20. Pini G, Faggi E, Donato R, Sacco C, Fanci R. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients and the influence of hospital renovation. *Mycoses*. 2008;51(2):117-22.

21. De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):475-84.
22. Wang J, Park JH, Choi NJ, Ha SD, Oh DH. Microbiological Analysis of Rice Cake Processing in Korea. *J Food Prot*. 2016;79(1):157-62.
23. Gheith S, Ranque S, Bannour W, Ben Youssef Y, Khelif A, Ben Said M, et al. Hospital environment fungal contamination and aspergillosis risk in acute leukaemia patients in Sousse (Tunisia). *Mycoses*. 2015;58(6):337-42.
24. Ruangritchankul K, Chindamporn A, Worasilchai N, Pomsuk U, Keelawat S, Bychkov A. Invasive fungal disease in university hospital: a PCR-based study of autopsy cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):14840-52.

Anexo 1

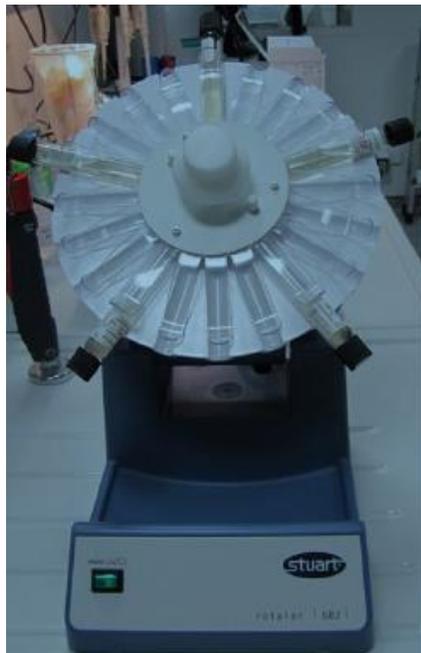
MALDI Biotyper – Bruker Daltonics

PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

Materiales requeridos

- Rotor (Ejemplo: Rotor SB 2 catálogo No Y549.1; proveedor: Carl Roth GmbH & Co KG)
- Plato para rotor (Ejem: SB 2 catálogo No Y552.1; proveedor: Carl Roth GmbH & Co KG)
- Medio de cultivo Sabouraud líquido Modificado-8ml catálogo 221014; proveedor: BD

Figura 1:



Rotor SB 2 y plato de rotor con tubos

Pre-cultivo

- Tomar las colonias del hongo provenientes de una placa de agar Sabouraud
- Cultivar hasta que aparezcan colonias individuales
- Si el cultivo no está puro, repita el proceso hasta que observe colonias individuales.

Método de Cultivo

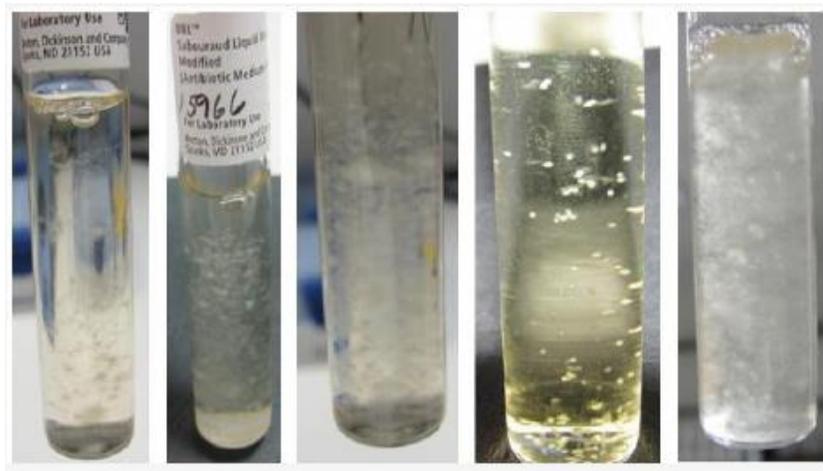
- Inocular los tubos con unas cuantas colonias aisladas y cerrar la tapa herméticamente.

NOTA: NO transferir hifas al caldo. Basta con tocar la colonia del hongo con un hisopo estéril e inocular el caldo

Cultivos mezclados o contaminados no pueden ser detectados en el medio líquido. Por esta razón es necesario inocular el caldo líquido de Sabouraud a partir de colonias de la placa de agar y chequear de nuevo la pureza de la placa de agar después de inocular el caldo.

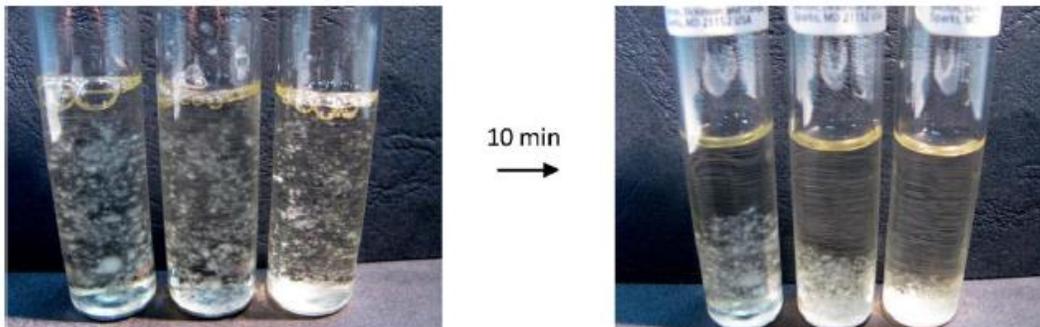
- Hacer girar el rotor “over head”.
- Incubar hasta observar suficiente material biológico, aproximadamente 24-48 horas. Ver Figura 2. Temperaturas cálidas dan como resultado crecimientos más rápidos; es muy importante no utilizar cultivos viejos ya que pueden resultar en no identificación debido a la esporulación.

Figura 2

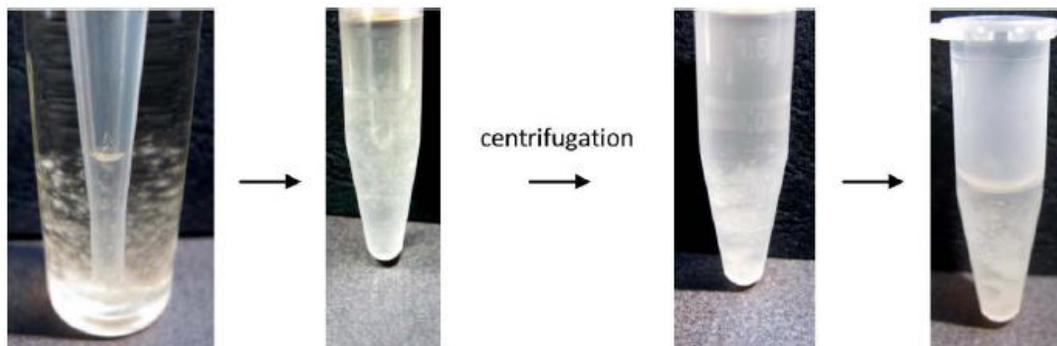


Preparación de la muestra

- Retirar los tubos de cultivo del rotor. Colocarlos en una gradilla durante 10 minutos para que reposen.
- El sedimento del hongo filamentososo se formará en el fondo del tubo. Ver figura 3.



- Transferir hasta 1,5 ml del sedimento a un tubo eppendorf, usando una pipeta plástica Pasteur.
- Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-15000 rpm)
- Retirar con cuidado el sobrenadante. Ver figura 4.



NOTA: Probablemente el pellet no se habrá formado completamente. Retirar cuidadosamente el líquido que sea posible, usando una pipeta.

- Agregar agua pura calidad HPLC/MS hasta un volumen final de 1,2-1,4 ml. Agitar con Vortex fuertemente.
- Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-15000 rpm).
- Remover con cuidado el sobrenadante de nuevo, usando pipeta Pasteur.
- Repetir el lavado mediante la adición de 1 ml de agua pura y agitar con vortex.
- Centrifugar 2 minutos a máxima velocidad. Retirar cuidadosamente el sobrenadante con pipeta Pasteur.

NOTA: Siempre prestar atención al pellet. Debido a la naturaleza del micelio, a veces no es posible llegar a un pellet sólido. El objetivo final es eliminar todo el caldo Sabouraud Dextrosa del medio que podría interferir durante el análisis.

- Resuspender el pellet en 300 µl de agua pura grado HPLC/MS (mezclar bien en vortex fuertemente hasta que el pellet se resuspenda nuevamente).
- Agregar 900 µl de Etanol absoluto grado HPLC/MS y agitar en vortex hasta que se resuspenda completamente el sedimento.
- Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-15000 rpm).
- Descartar cuidadosamente el sobrenadante con pipeta Pasteur
- Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-15000 rpm) y remover el etanol residual completamente por pipeteado.

- Secar completamente el pellet a 37 °C (no menos de una hora o 60 minutos).

NOTA: Es muy importante que el pellet en esta fase este completamente seco. El sedimento debe estar con apariencia “borrosa” cuando se seca. Ver Figura 5.



- Agregar al sedimento ácido fórmico al 70% hasta cubrir el pellet. Ver Figura 6.



- Mezclar bien hasta que el pellet se vuelva a resuspender, esto puede lograrse mediante vortex o con pipeta Pasteur.

NOTA: Dejar pellet en contacto con ácido fórmico durante 10 minutos y luego mezclar de nuevo.

- Añadir el mismo volumen de acetonitrilo al 100% que ácido fórmico al 70% (agregado previamente). Agitar con vortex.

- Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad (13000-15000rpm).

- Añadir 1 µl de sobrenadante a la placa de Maldi y continuar con la preparación convencional

- Analizar el uso del AutoXecute. Si no se pueden obtener espectros de calidad, tratar de aumentar la potencia del láser manualmente utilizando la barra deslizante mientras

que el método está en desarrollo. Contactar a aplicaciones de Maldi Biotyper si los espectros no pueden ser archivados.