



Comparación del perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp. a partir de aislamientos clínicos y ambientales de un centro hospitalario de cuarto nivel de complejidad

**Laura Daniela Méndez Guzmán
Laura Marcela Muñoz Caicedo**

**Facultad de Ciencias Básicas
Carrera Bacteriología
Bogotá D.C**

2016




Comparación del perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp. a partir de aislamientos clínicos y ambientales de un centro hospitalario de cuarto nivel de complejidad

**Laura Daniela Méndez Guzmán
Laura Marcela Muñoz Caicedo**

FIRMA 
DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

Melva Yomary Linares Linares

FIRMA 
CODIRECTOR TRABAJO DE GRADO

Beatriz Elena Ariza Ayala

**Facultad de Ciencias Básicas
Carrera Bacteriología
Bogotá D.C**

2016

Nota de Advertencia

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

“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”.

Agradecimientos

A nuestros padres por ser un apoyo fundamental en cada momento de nuestras vidas, quienes se preocuparon por nuestro bienestar, nos apoyaron y animaron a salir adelante.

A las profesoras Melva Linares y Beatriz Ariza, por aceptarnos y apoyarnos en cada etapa de la realización del proyecto, brindándonos los conocimientos y el apoyo para culminar éste proyecto.

A nuestras familias y amigos que nos escucharon y apoyaron para culminar este proyecto.

A la facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana por aceptarnos para ser parte de ella y formarnos como personas integrales que son capaces de asumir retos de manera crítica.

Al resto de personas que de alguna u otra manera hicieron parte de éste trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción	11
2	Planteamiento del problema y justificación	12
3	Objetivo general	14
4	Objetivos específicos	14
5	Marco teórico	15
5.1	Generalidades de <i>Aspergillus</i> spp.	15
5.2	Ciclo biológico	16
5.3	Cuadro clínico	17
5.4	Epidemiología	18
5.5	Tratamiento	21
5.6	Pruebas de sensibilidad antimicótica	22
6	Diseño metodológico	24
6.1	Diseño del estudio	24
6.2	Pregunta de investigación	24
6.3	Definición de sujetos de estudio	24
6.3.1	Población	24
6.3.2	Cepas de referencia	24
6.3.3	Muestras	24
6.3.4	Criterios de inclusión	25
6.3.5	Criterios de exclusión	25
7	Procedimiento	26
7.1	Reactivación y evaluación de viabilidad y pureza de cepas clínicas y ambientales	26
7.2	Preparación del inóculo para aislamientos clínicos y ambientales	26
7.3	Prueba de sensibilidad antifúngica	27
7.4	Criterios de interpretación	27
7.5	Análisis de resultados	28
8	Resultados	29
9	Discusión	33
10	Conclusiones	37
11	Recomendaciones	37
12	Referencias	38
13	Anexos	43

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Morfología de <i>Aspergillus</i> sp	16
2	Porcentaje de aislamientos clínicos de <i>Aspergillus</i> sp. dependiendo del tipo de muestra	25
3	Caracterización macroscópicas y microscópicas de <i>Aspergillus</i> spp	29

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	E-test en aislamientos clínicos	30
2	E-test en aislamientos ambientales	31
3	Comparación de los perfiles de susceptibilidad de aislamientos clínicos y ambientales para <i>Aspergillus fumigatus</i>	32
4	Perfiles de susceptibilidad de aislamientos clínicos de <i>Aspergillus flavus</i>	33

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Título
1	Medios de cultivo, componentes y preparación
2	Azul de lactofenol para visualización microscópica de <i>Aspergillus</i> sp.
3	Claves taxonómicas de identificación de <i>Aspergillus</i> sp.
4	Control de calidad

RESUMEN

Antecedentes: La creciente incidencia y diversidad de las infecciones fúngicas, y el incremento de resistencia a los tratamientos convencionales ha despertado el interés de la comunidad del área de la salud y el campo de la investigación por tener mayor conocimiento acerca de las micosis y las posibilidades de nuevas terapias, centrándose en las pruebas de sensibilidad *in vitro* (Guinea, 2005). Aunque se encuentra en la literatura un amplio número de publicaciones acerca de estas pruebas de susceptibilidad, la mayoría de esta información hace referencia a hongos levaduriformes, poco es lo que se documenta de hongos filamentosos y debido a que es un método dispendioso y costoso, los datos acerca de valores de concentración mínima inhibitoria son escasos (Gupta, 2015). En nuestro entorno se desconoce cuál es el comportamiento de moléculas antifúngicas frente al tratamiento de la aspergilosis debido a que son pocos los estudios desarrollados para conocer los perfiles de susceptibilidad *in vitro* de cepas ambientales vs cepas clínicas, por esta razón el objetivo del estudio, es comparar el perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp., a partir de aislamientos clínicos y ambientales de un centro hospitalario de cuarto nivel de complejidad.

Metodología: Se realizó pruebas de sensibilidad *in Vitro* utilizando la técnica de E-test para evaluar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima efectiva (MEC) para anfotericina B, voriconazol, itraconazol, caspofungina y anidulafungina con cuarenta y cinco aislamientos (20 clínicos y 25 ambientales) del género *Aspergillus* spp.

Resultados: En las muestras ambientales la única especie de hongos aislada fue *A. fumigatus*, el 32% de los aislamientos presentó resistencia a voriconazol e itraconazol. En cuanto a los aislamientos clínicos el hongo más aislado fue *A. flavus*, de los cuales el 74% fueron sensibles a anfotericina B y el 26% presentaron susceptibilidad intermedia a este mismo antifúngico. Para *A. fumigatus* y *A. terreus* el 100% de los aislamientos fueron sensibles.

Conclusiones: La resistencia presentada en los aislamientos ambientales es una señal de advertencia porque indica que pueden estar adquiriendo resistencia por la constante presión de azoles usados en la agricultura, debido a que son estructuralmente muy similares a los triazoles médicos y activos contra *A. fumigatus*

lo que permite que el microorganismo cambie lo suficiente para que los sistemas que la droga normalmente modifica sean distintos.

1. INTRODUCCIÓN

Aspergillus spp. es un hongo ubicuo y patógeno oportunista que causa infecciones superficiales y locales como la otomicosis, onicomycosis, queratitis, así como aspergiloma o bola fúngica que se desarrolla en una cavidad como en una lesión pulmonar producida por una enfermedad pulmonar previa o en cavidades nasales. En individuos inmunocomprometidos *A. fumigatus* y *A. flavus* pueden producir infecciones invasivas como la aspergilosis invasiva diseminada, que cursa de forma grave con neumonía, afectando al pulmón y pudiéndose diseminar a otros órganos, siendo la forma más frecuente de colonización del tracto respiratorio (Hernández, 2012).

Las especies de *Aspergillus flavus* y *fumigatus* representan las tasas más altas de morbilidad y mortalidad entre los pacientes inmunocomprometidos y esto se ve reflejado en que la incidencia de las infecciones por hongos ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido a la prevalencia de esta condición de inmunosupresión (Khodavaisy, 2016). Ante esto, se evidencia la necesidad e interés por conocer el perfil de susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos clínicos para el manejo terapéutico en el paciente (Chavez, 2010). Existen protocolos para realizar e interpretar pruebas de susceptibilidad en hongos levaduriformes, pero para hongos filamentosos aún no se establecen puntos de corte por la norma del CLSI. Los estudios realizados en *Aspergillus* con la técnica de E-test han mostrado buena correlación frente a la prueba *Gold standard* de microdilución (Gupta, 2015).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Aspergillus spp. es un hongo filamentoso ampliamente distribuido en el ambiente y considerado patógeno oportunista en pacientes que presentan algún tipo de inmunosupresión como leucemias, cáncer con neutropenia inducida, pacientes con trasplante de precursores hematopoyéticos sometidos a terapias inmunosupresoras, pacientes con SIDA, etc.. Clínicamente se reconocen las formas alérgicas, colonización e invasión; siendo la forma invasiva la más común en estos pacientes. En la última década ha aumentado la incidencia de aspergilosis invasiva en el ambiente hospitalario debido a que se han incrementado los pacientes en riesgo (inmunocomprometidos), donde el medio ambiente desempeña un papel crucial en el desarrollo de esta enfermedad (Cruz, 2011). Para el tratamiento de aspergilosis se utiliza la anfotericina B, pero recientemente se han visto mejores resultados frente a voriconazol (52,8% vs 31,6%), una mayor supervivencia (70,8% vs 57,9%) respectivamente, y menos efectos adversos (Gavaldá, 2003). Por otro lado, existen reportes de susceptibilidad disminuida frente a itraconazol, caspofungina y voriconazol para algunas especies de *Aspergillus* (Chavez, 2010), como también el reporte de especies diferentes a *Aspergillus fumigatus* resistentes a anfotericina B (Shivaprakash, 2011). En este sentido, se hace importante conocer el perfil de susceptibilidad de aislamientos ambientales y clínicos de *Aspergillus* para determinar susceptibilidad disminuida o resistencia a los medicamentos, ya que esto permitiría establecer asociaciones que expliquen si la resistencia viene de aislamientos ambientales, los cuales impactan sobre la terapia fallida en los pacientes con algún tipo de inmunocompromiso. En un estudio realizado en Argentina, se demostró por tipificación molecular que 4 de 5 aislamientos obtenidos de un paciente que se encontraba en el área de oncohematología, estaban relacionados con los aislamientos del ambiente de la habitación en la que se encontraba el paciente (Refojo, 2013).

Adicionalmente, es importante anotar que las drogas de elección para el tratamiento de las aspergilosis invasivas son anfotericina B e itraconazol, sin embargo, también se han utilizado voriconazol y caspofungina. En nuestro entorno se desconoce cuál es el comportamiento de éstas moléculas frente al tratamiento de la aspergilosis debido a que son pocos los estudios desarrollados para conocer los perfiles de susceptibilidad *in vitro* debido a que la metodología de referencia para determinar susceptibilidad antifúngica para filamentosos es dispendiosa y costosa, lo que

dificulta que los laboratorios en su rutina diaria lo realicen; por lo tanto, los datos de perfiles de susceptibilidad y valores de concentración mínima inhibitoria son escasos (Gupta, 2015). Por lo anterior, se ha propuesto en este trabajo comparar el perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp. a partir de aislamientos clínicos y ambientales de un centro hospitalario de cuarto nivel de complejidad, utilizando una metodología práctica y aplicable a la rutina del laboratorio, como lo es la epsilometría.

3. OBJETIVO GENERAL

Comparar el perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp., a partir de aislamientos clínicos y ambientales de un centro hospitalario de cuarto nivel de complejidad

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1** Conocer el perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp., a partir de aislamientos clínicos para anfotericina B, itraconazol, voriconazol, anidulafungina y caspofungina.
- 4.2** Conocer el perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp., a partir de aislamientos ambientales para anfotericina B, itraconazol, voriconazol, anidulafungina y caspofungina.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Generalidades de *Aspergillus* spp.

Aspergillus spp. es un hongo filamentoso ubicuo que se distribuye ampliamente en el ambiente, normalmente se encuentra en suelo, aire, agua, plantas y materia orgánica en descomposición (Randiola, 2002). *Aspergillus* es un hongo oportunista, lo que significa que puede causar infección cuando el paciente presenta inmunosupresión, especialmente neutropenia, causando el cuadro clínico de la aspergilosis invasiva. También se han descrito cuadros de alergia y colonización (Martin Juan, 1994).

Se conocen más de 90 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos, de los cuales sólo algunas especies se consideran patógenas: *A. flavus* (5-10%), *A. fumigatus* (85%), siendo estas especies las de mayor incidencia de infección micótica en pacientes con inmunosupresión debido a que presentan unas características especiales que optimizan su capacidad para producir infecciones en humanos, como el tamaño de las esporas (de 2 a 3µm) que es ideal para penetrar en los alvéolos pulmonares. Por el contrario, un mayor tamaño de las esporas facilita su eliminación por parte de los cilios de la mucosa del epitelio respiratorio. *A. fumigatus* es termotolerante comparado con otras especies, crece a temperaturas que oscilan de los 37°C a los 50°C, lo que le permite establecerse en condiciones medioambientales extremas (Garcia-Vidal, 2012). Otras especies importantes son *A. nidulans* y *A. terreus* que se aíslan cada vez con más frecuencia, dependiendo de factores geográficos, tipo de huésped o prescripción de antifúngicos (Oxilia, 2008). La clasificación de especies de *Aspergillus* se basa en las diferentes características morfológicas (Figura 1)

- a) Tamaño y forma de las cabezas conidiales
- b) Morfología de los conidióforos
- c) Fiálides
- d) Métulas

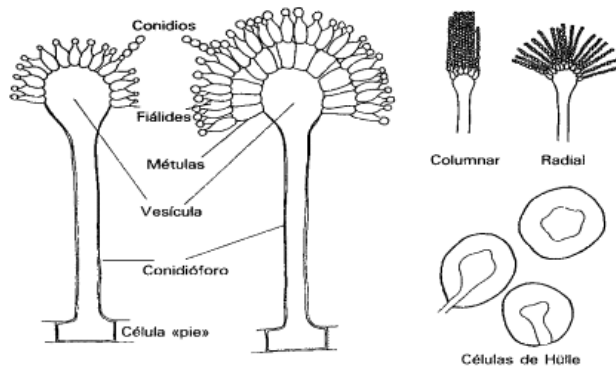


Figura 1. Morfología de *Aspergillus* sp. (Zambrano, 2007)

Existen factores de virulencia comunes del género *Aspergillus* que facilitan la invasión del hongo en el huésped. *Aspergillus* puede secretar toxinas (gliotoxina) que son capaces de actuar en el momento de la patogénesis, cuando el hongo coloniza el epitelio mucoso e interacciona con el huésped. Estas toxinas tienen la capacidad de frenar el movimiento ciliar y lesionar el epitelio del tracto respiratorio. Otros factores de virulencia, tales como las elastasas, catalasas, hemolisinas o proteasas, actúan en etapas posteriores de la interacción entre microorganismo y huésped, interfiriendo en la capacidad de defensa del sistema inmune del huésped (García-Vidal, 2012)

5.2 Ciclo biológico

Aspergillus tiene un ciclo biológico muy simple, en el cual se forman esporas para su reproducción y tras la germinación de las mismas se forman las hifas, que serán las formas invasivas del hongo. *Aspergillus* tiene alta capacidad de esporulación y, como consecuencia, hay presencia de concentraciones altas de esporas en el aire. En la fase inicial de la patogenia de *Aspergillus* spp. participan las esporas, la inhalación de estas constituye la vía más frecuente de infección. Aunque la inhalación de estas esporas por el ser humano es muy frecuente, habitualmente no producen ninguna enfermedad, al ser eliminadas eficientemente por el sistema inmunitario. Sin embargo, en algunos huéspedes, por el grado de inmunosupresión las esporas tienen mayor facilidad para alcanzar el tracto respiratorio inferior y, por consiguiente, su tamaño reducido permite que se depositen en los alvéolos (García-Vidal, 2014)

La respuesta en los tejidos en estas infecciones se encuentra muy condicionada por el estado inmunológico del huésped. Cuando invaden los tejidos, las diferentes especies patógenas de *Aspergillus* spp., producen hifas tabicadas hialinas, de 2 a 5 μm de diámetro, que se ramifican de manera dicotómica en ángulo agudo (de 45°). La presencia de conidióforos, vesículas, fiálides y conidios se observa muy raramente en los tejidos y pueden verse tan sólo en algunas lesiones cavitadas que comunican directamente con el árbol traqueo bronquial. En los pacientes inmunodeprimidos con infección por *Aspergillus* spp., pueden observarse hifas en el interior de los vasos sanguíneos que provocan lesiones de infarto, edema y hemorragia. Incluso en áreas sin excesiva afectación vascular, también se observa una necrosis alrededor de las hifas. La aspergilosis también se disemina por vía hematogena provocando falla multiorgánica, la mayoría de estas metástasis presentan un área de necrosis rodeando a un grupo de hifas dispuestas en una estructura radial (Penan, 2003)

5.3 Cuadro clínico

Aspergillus spp. produce enfermedad pulmonar en diferentes presentaciones clínicas:

Aspergiloma: es la presencia de material sólido compuesto por hifas de *Aspergillus* (fundamentalmente *A. fumigatus*) dentro de la cavidad intratorácica, paranasal o bronquial. Es una consecuencia de la aspergilosis pulmonar crónica donde algunos conidios germinan en la pared de una cavidad y el micelio y el debris se juntan para formar una masa amorfa que puede permanecer unida a la pared de la cavidad o desprenderse. Inicialmente se presenta de modo asintomático y en casos avanzados se produce hemoptisis y tos productiva. El desarrollo de esta enfermedad se ve favorecida en pacientes con enfermedades cavitarias pulmonares (tuberculosis, sarcoidosis) aunque *Aspergillus* durante la invasión al tejido es capaz de producir un aspergiloma por sí solo (Howard, 2013).

Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA): Es un tipo de aspergilosis necrosante también denominada aspergilosis semi-invasiva en la cual, hay una invasión local del parénquima, con destrucción y formación de cavidades (Parra, 2004).

Aspergilosis pulmonar invasiva (API): se caracteriza por cursar con un cuadro de picos febriles que no responde a antimicrobianos de amplio espectro, este es el

signo más precoz y común de una infección fúngica invasiva (Schwartz, 1997). Generalmente ocurre en pacientes con leucemia o neutropenia profunda y en aquellos que han estado en tratamiento con esteroides. Los síntomas incluyen fiebre, tos, dolor en el pecho y disnea (dificultad para respirar). La angioinvasión resulta en necrosis del tejido, que puede conducir finalmente a formación de espacios vacíos (cavitación) y/o tos con sangre (hemoptisis) (CDC, 2014). En la histología se presentan hifas anchas, septadas, con aspecto radiado e infiltración de neutrófilos, haciendo que se tapone la luz del vaso sanguíneo y por último en las radiografías pulmonares se visualizan infiltrados de variada naturaleza. Esta aspergilosis se puede extender a otros órganos teniendo consecuencias mortales en los pacientes (Saballs, 2000).

El reconocimiento de los síntomas asociados con la aspergilosis invasiva en los pacientes de riesgo debe impulsar nuevos procedimientos diagnósticos, ya que un diagnóstico precoz y la inmediata instauración de la terapia antimicótica podría mejorar el resultado del tratamiento en esta condición (Schwartz, 1997).

5.4 Epidemiología

Hay tres características fundamentales que convierten al género *Aspergillus* en patógenos ubicuos:

- 1) Supervivencia y crecimiento en un amplio rango de condiciones ambientales. *Aspergillus* tiene la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas y condiciones de humedad. Además, posee mecanismos (producción de enzimas, grosor de la pared de los conidios) para resistir elementos físicos y químicos (radiación ultravioleta,) que le proporcionan estabilidad fisiológica en hábitats extremos. *A. fumigatus* tiene la posibilidad de crecer en rangos de temperatura entre 12°C y 65°C y en rangos de pH entre 2,1 y 8,8. Su metabolismo por debajo de 12°C aunque se minimiza mantiene la viabilidad del microorganismo (Kwon-Chung, 2013).
- 2) Gran dispersión en el aire y características físicas de los conidios que les permiten recorrer grandes distancias vía aérea. La superficie hidrofóbica que confiere la capa fascicular de los conidios garantiza que la dispersión se afecte poco por la humedad. En el caso de *A. fumigatus* la pared de los conidios también posee melanina que los protege de la radiación solar durante su propagación por el aire (Kwon-Chung, 2013).

- 3) Adaptabilidad al ambiente del hospedero. El tracto respiratorio de un ser humano recibe un promedio de 100 conidios de *Aspergillus* diariamente en una habitación con un estimado de 1-100 conidios/m³. En individuos inmunocompetentes la respuesta del sistema inmune rápidamente elimina las partículas fúngicas pero en personas que presentan algún tipo de inmunosupresión (trasplantados) o inmunodepresión (sida, leucemia aguda) el hongo es capaz de instalarse como colonizador e invasor de los tejidos. El tamaño de los conidios no se incrementa con la humedad debido a la hidrofobicidad de estos y conservan el tamaño óptimo para la entrada a las vías aéreas más internas. Las especies patógenas poseen además una batería enzimática de amplio espectro que les permite utilizar los componentes de muchos tejidos como fuente de sustrato (Kwon-Chung, 2013).

La mortalidad de la aspergilosis invasora sin tratamiento es prácticamente del 100%, hasta ahora las cifras de mortalidad asociadas a la aspergilosis invasora son muy elevadas, particularmente en ciertas poblaciones (pacientes trasplantados o con neoplasias hematológicas) (Lumbreras, 2003).

Varias son las causas que explican la persistencia de estas cifras tan elevadas de mortalidad de la aspergilosis invasora. La primera de ellas es la gravedad de la enfermedad de base de los pacientes que desarrollan una aspergilosis invasora. De hecho, varios estudios han asociado el control de la enfermedad subyacente del paciente o una drástica disminución de la medicación inmunosupresora con una mayor probabilidad de curación de la infección fúngica. Otro factor generalmente implicado para justificar la importante mortalidad entre los enfermos con aspergilosis invasora ha sido la escasez de fármacos antifúngicos eficaces y seguros. En efecto, hasta la década de los 90, el único fármaco disponible para el tratamiento de la aspergilosis invasora era la anfotericina B desoxicolato, que es muy tóxica (Lumbreras, 2003).

La importancia del género *Aspergillus* como agente productor de infecciones oportunistas es mayor al aumentar la población de pacientes inmunosuprimidos. Se han descrito brotes nosocomiales de la enfermedad relacionados con trabajos de construcción en áreas del hospital y sus alrededores o por contaminación de los sistemas de ventilación donde están internados pacientes con neutropenia o receptores de trasplantes. (Guinea, 2005).

El primer paso para disminuir la incidencia de infección por *Aspergillus* spp. Consiste en mantener un buen control ambiental que disminuya en lo posible la concentración de esporas. En el medio hospitalario, los pacientes con riesgo de sufrir una aspergilosis deberán evitar el contacto con productos vegetales (plantas, semillas o especias) y estar alejados de cualquier trabajo de construcción o reforma, ya que en un ambiente en el cual se remueve el hábitat del *Aspergillus*, se elevará considerablemente el número de esporas por metro cúbico en el aire. Los pacientes con inmunosupresión severa deberán ser albergados en habitaciones especialmente diseñadas, con aislamiento adecuado de puertas y ventanas, aire filtrado a través de HEPA (Recogedor de partículas de alta eficiencia), flujo laminar, presión diferencial positiva y un elevado número de renovaciones de aire (García-Vidal, 2012).

En estudios recientes, se ha observado que puede haber un alto contenido de *Aspergillus* spp. en reservorios de agua en hospitales (duchas, lavamanos, entre otros) de tal manera que éste podría llegar a ser un factor importante de contacto con los pacientes que se encuentran hospitalizados. Por tal razón, es importante realizar el reconocimiento de la ubicuidad bacteriana y fúngica en las instituciones hospitalarias, definiendo límites dependiendo del tipo de microorganismo y tipo de paciente implicado (Cárdenas, 2008).

Aunque varias especies del género *Aspergillus* pueden estar implicadas en la producción de alguna patología, las especies que se asocian con mayor frecuencia a una infección fúngica son *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*. Según un estudio realizado en algunas áreas del hospital universitario San Ignacio, se evidenció la presencia del género *Aspergillus* en sitios donde se hacía uso frecuente de agua, lo que permite mayor propagación del hongo. Llamó la atención la ausencia de *A. fumigatus* en los aislamientos ambientales o del agua en el hospital. Ello puede deberse a que se encuentra menos presente y no haya sido detectado por el método de muestreo o a que, debido a condiciones ambientales, el crecimiento específico de esta especie no se vea favorecido (Cárdenas, 2008)

5.5 Tratamiento

La Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer/Grupo Cooperativo de Infecciones Fúngicas Invasivas (EORTC/NIAID) y el Grupo de Estudio de Micosis (MSG) del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIH, Bethesda, Maryland) establecen tres niveles de probabilidad para las infecciones fúngicas invasivas: probada, probable y posible, que dependen de los factores predisponentes del huésped, factores microbiológicos y los criterios clínicos que pueden ser mayores o menores. Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos, es observar su crecimiento en medios de cultivo artificiales preparados en el laboratorio. (Palacio, 2007).

En la última década ha tenido lugar una expansión considerable de la investigación farmacológica antimicótica y el desarrollo clínico de varios compuestos y estrategias nuevas contra la aspergilosis invasiva. Los compuestos aprobados por la FDA que se enumeran a continuación, tienen actividad *in vitro*, *in vivo* y clínica contra el género *Aspergillus* y disponen de licencia para el tratamiento de la aspergilosis invasiva:

Polieno (Anfotericina B): Es un compuesto poliénico cuyo efecto antifúngico se logra mediante la interacción directa con el ergosterol de la membrana celular fúngica, no interfiere con la síntesis de la membrana, sino que la desestabiliza, facilitando la formación de canales con la pérdida consecuente de iones y componentes celulares (Fica, Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. III parte: Anfotericina B, aspectos farmacoeconómicos y decisiones terapéuticas, 2004).

Azoles (Itraconazol y voriconazol): Estos compuestos actúan inhibiendo la enzima lanosterol 14-a demetilasa en el complejo citocromo P-450 de los hongos. Se inhibe la conversión de lanosterol a ergosterol lo que lleva a la disminución de éste último, acumulación de precursores y una pérdida de la integridad de la membrana fúngica (Fica, Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol, 2004).

Equinocandinas (Anidulafungina y Caspofungina): Inhibe la síntesis del 1,3-β-D-glucano, un importante componente estructural de la pared de la célula fúngica que no está presente en la de los mamíferos, lo que evita problemas de toxicidad (Gobernado, 2008).

El voriconazol y la anfotericina B son los únicos compuestos con licencia para el tratamiento primario de la aspergilosis invasiva. La combinación de voriconazol con anidulafungina puede mejorar los resultados terapéuticos en la aspergilosis invasiva resistente a azoles (Seyedmousavi, 2013). Las formulaciones lipídicas de anfotericina B, el itraconazol y la caspofungina están aprobados para el tratamiento de último recurso de la aspergilosis invasiva. Varios estudios en pruebas de susceptibilidad afirman que voriconazol ha demostrado ser más activo que anfotericina B por lo tanto, ahora es la droga de elección para el tratamiento primario de ésta enfermedad (Guinea, 2005).

Recientemente se publicó un metaanálisis que compara dichas formulaciones. De la revisión conjunta de toda la literatura, parece ser que la anfotericina B liposomal, además de disminuir la toxicidad, incrementa el porcentaje de éxitos terapéuticos y disminuye el riesgo de mortalidad relacionada con la infección. Por otra parte, se han publicado los resultados de un estudio aleatorizado y abierto que compara la eficacia, la seguridad y la tolerancia de voriconazol frente a anfotericina B convencional en el tratamiento primario de la aspergilosis invasiva y se demuestra que los pacientes que recibieron voriconazol presentan una mejor respuesta (52,8% frente a 31,6%), una mayor supervivencia (70,8% frente a 57,9%) y menos efectos adversos que los tratados con anfotericina B. Además, en un estudio abierto y no comparativo en pacientes con aspergilosis invasiva, la respuesta de los que recibieron voriconazol fue del 48% (14% completa y 34% parcial). Por lo anterior, el autor considera que en la actualidad es cuestionable la utilización de anfotericina B en el tratamiento de la aspergilosis pulmonar invasiva (Gavaldá, 2003).

5.6 Pruebas de sensibilidad antimicótica

Antes de 1990 la metodología para la evaluación de la susceptibilidad antifúngica era deficiente debido a que no existía una estandarización propiamente establecida y por tanto la reproducibilidad inter/intra laboratorios era poca. A la par se hicieron cada vez más frecuentes los pacientes que no respondían adecuadamente a las terapias (Espinel-Ingroff, 2008).

En la última década se ha observado un incremento de la resistencia a antifúngicos en muchas especies de hongos. Por ello, la micología médica ha ido en avance con el desarrollo y la estandarización de métodos para evaluar la susceptibilidad de agentes causantes de estas enfermedades. Actualmente las investigaciones en

este campo persiguen cuatro metas fundamentales: superar las limitaciones actuales de los métodos disponibles, proveer modificaciones prácticas de acuerdo a los recursos del laboratorio, extender la utilidad de las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos a un mayor número de géneros y especies de hongos y mostrar el impacto beneficioso de estas pruebas en los diferentes contextos clínicos los ensayos *in vitro* tienen en cuenta una gran cantidad de variables que tributan a la fiabilidad de los resultados. Algunas de ellas son la cantidad y el tipo morfológico del inóculo y su preparación, la formulación del medio de cultivo que se usará como soporte, su pH, el tiempo y la temperatura de incubación y el criterio para determinar el punto de corte de las mínimas concentraciones inhibitorias (MIC). En adición se ha de tener en cuenta las propiedades particulares de cada antifúngico a evaluar como su solubilidad, estabilidad química, modo de acción y la tendencia de algunos de estos fármacos a producir una inhibición parcial del crecimiento (Arikan, 2007)

Las pruebas de susceptibilidad permiten conocer la MIC y la MEC de un antimicrobiano frente a un microorganismo y así determinar si son sensibles o resistentes. Se han propuesto varios métodos, incluyendo la difusión de disco, la prueba E-test, la microdilución en caldo (*Gold standard*), entre otros métodos (Gupta, 2015).

E-test ha mostrado ser una de las alternativas en pruebas de susceptibilidad antifúngica por su facilidad de montar y su buena concordancia con los métodos de dilución en caldo, está aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA). Es un método simple, que involucra la inoculación del hongo en la superficie de un agar, seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, se genera una elipse de inhibición que permite obtener la MIC para las azoles y polienos y para las equinocandinas la MEC. Este método ha sido uno de los más eficaces comparado al método de referencia de microdilución. Se han probado distintos medios siendo el más utilizado, RPMI suplementado con glucosa al 2% (Tapia, 2009).

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1 Diseño del estudio

Estudio retrospectivo, donde se analizaron un total de muestras existentes en la colección de cepas en el laboratorio del Hospital Universitario San Ignacio.

6.2 Pregunta de investigación

¿Qué diferencias existen entre el perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp. de aislamientos clínicos y ambientales en un centro hospitalario de cuarto nivel de complejidad?

6.3 Definición de sujetos de estudio

6.3.1 Población

Aislamientos clínicos y ambientales de *Aspergillus* spp.

6.3.2 Cepas de referencia

Aspergillus flavus ATCC 204304, *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-3626, *Candida parapsilosis* ATCC 22016

6.3.3 Muestra

Se evaluaron 20 aislamientos clínicos de *Aspergillus* spp. obtenidos de pacientes de consulta externa (73%), seguido de hematooncología (13%), oftalmología (7%) y hospitalización adultos (7%), el tipo de muestra se muestra en la figura 2. También, se evaluaron 25 aislamientos ambientales obtenidos del Hospital Universitario San Ignacio (HUSI).

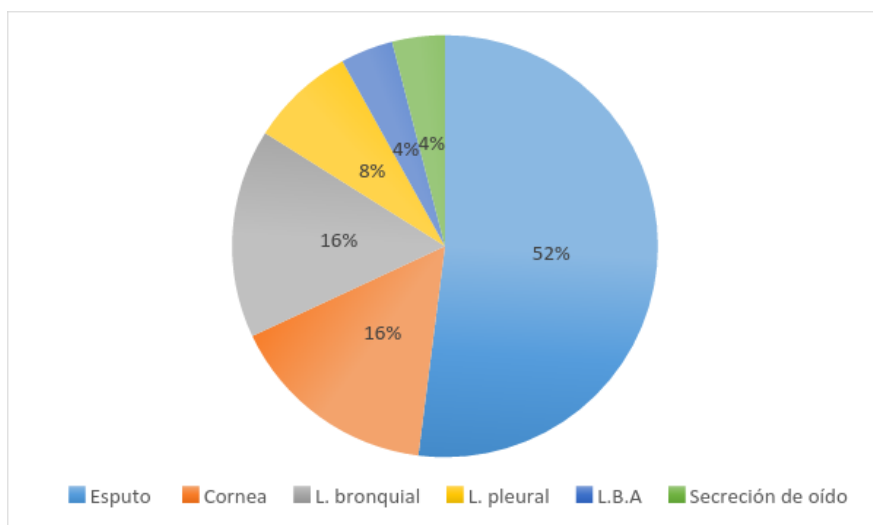


Figura 2. Porcentaje de aislamientos clínicos de *Aspergillus* sp. dependiendo del tipo de muestra.

6.3.4 Criterios de inclusión

Aislamientos de *Aspergillus* provenientes de muestras clínicas y muestras ambientales del HUSI

6.3.5 Criterios de exclusión

Aislamientos que no pertenezcan al género *Aspergillus* spp o que se encontraban contaminadas.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Reactivación y evaluación de viabilidad y pureza de cepas clínicas y ambientales de *Aspergillus*

- a) Se reactivaron 20 cepas conservadas en agar sabouraud de aislamientos clínicos y 25 aislamientos ambientales.
- b) Las cepas se recuperaron en placas de agar sabouraud suplementado con cloranfenicol, e incubadas a 28°C por 7 días
- c) Se confirmó la pureza de las cepas evaluando las características tanto macroscópicas como microscópicas mediante el uso de claves taxonómicas.
- d) Se realizó conservación en Agar sabouraud suplementado con cloranfenicol inclinado en tubo, el cual fue preparado según indicaciones de manufactura (Anexo 1).

7.2 Preparación del inóculo para aislamientos clínicos y ambientales

- a) A partir de repiques puros de 7 días de incubación en agar Sabouraud inclinado se realizó una recolección de conidios con ayuda de un escobillón.
- b) En 4ml de solución salina al 0,85 % con 10 uL de Tween 20, se introdujo el escobillón y se procedió a dejar 5 minutos en reposo.
- c) Del sobrenadante de la suspensión que contenía en su mayor parte conidios se obtuvieron 2 mL en un tubo estéril el cual se agitó en vórtex por 15 segundos.
- d) A partir de esta suspensión se realizó la confirmación de la presencia de solo estructuras conidiales con azul de lactonefol (Anexo 2) en microscopio (10x y 40x).
- e) Se ajustó por espectrofotómetro a una densidad óptica entre 0,09 hasta 0,1 a 530 nm.
- f) Se realizó una dilución 1:50 con 20 uL de la suspensión y 920 uL de solución salina al 0,85%.

7.3 Prueba de sensibilidad antifúngica

- a) Para la realización de la prueba se tuvo en cuenta la metodología recomendada por el documento M38-A del CLSI. El control de calidad se realizó con las cepas *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-3626, *Candida parapsilosis* ATCC 22016
- b) Procedimiento de E-test: A partir del inóculo se realizó una siembra masiva con escobillón estéril en agar RPMI, el cual se preparó según las indicaciones de la guía M-38 del CLSI (Anexo 1), la siembra se dejó 15 minutos para lograr adherencia de la suspensión a la superficie.
- c) Aplicación de las tiras de E-test: Las tiras para anfotericina B, itraconazol, voriconazol, anidulafungina y caspofungina se colocaron en la superficie del agar con pinzas estériles. Se evaluaron conjuntamente con las cepas control de calidad *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-3626, *Candida parapsilosis* ATCC 22016. El montaje se incubó a 35°C.
- d) Lectura: Para los antifúngicos anfotericina B, itraconazol y voriconazol, se realizó la lectura a las 48 y 72 horas mediante la determinación de la MIC en el punto de intersección de la elipse de inhibición del 100% del crecimiento. Para anidulafungina y caspofungina se realizó la lectura a las 48 horas de la MEC en la cual se ve un cambio significativo de morfología.

7.4 Criterios de interpretación

Para los azoles, polienos y caspofungina se usaron los siguientes criterios (Espinel-Ingroff, 2011):

- Itraconazol y voriconazol: Se considera susceptible menor a 1µg/mL para *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus*.
- Anfotericina B: Se considera susceptible menor a 1µg/mL, susceptibilidad intermedia de 1µg/mL a 2 µg/mL y resistente mayor a 4 µg/mL para *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus*.
- Caspofungina: Se considera susceptible menor a 0,5µg/mL para *A. fumigatus* y menor a 0,2µg/mL para *A. flavus* y *A. terreus*.

Para anidulafungina se usaron los siguientes criterios (EUCAST, 2015):

- Anidulafungina: Se considera susceptible menor a 0,002 µg/mL y resistente mayor a 4 µg/mL

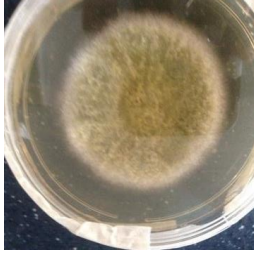





7.5 Análisis de resultados

Se realizó un estudio de tipo descriptivo de corte transversal, los datos obtenidos de las MIC se registraron en una base de datos en Excel. El análisis del componente descriptivo se fundamentó en el uso de medias geométricas (MG) para cada antifúngico y se establecieron los rangos de sensibilidad para la misma. Además, se determinan los percentiles 50 (MIC₅₀) y 90 (MIC₉₀).

8. RESULTADOS

Mediante el uso de claves taxonómicas y teniendo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas (Figura 3) se confirmó el género y especie de los aislamientos. Para los aislamientos clínicos *A. flavus* fue el agente etiológico predominante (75%) (Figura 3a) seguido de *A. fumigatus* (20 %) (Figura 3b) y *A. terreus* (5%) (Figura 3c). De los aislamientos ambientales el 100% fueron *A. fumigatus*.

Figura 3. Caracterización macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus* spp..
Fuente: Autoras

Especie	Características macroscópicas (Anexo 3)	Características microscópicas (Anexo 3)
<i>(a) Aspergillus flavus</i>		
<i>(b) Aspergillus fumigatus</i>		
<i>(c) Aspergillus terreus</i>		

Para la evaluación del perfil de sensibilidad, todos los controles de calidad, *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-3626 y *Candida parapsilosis* ATCC 22016, realizados para validar el montaje y lectura de las tiras de E-test se encontraron dentro de los puntos de corte establecidos por la guía M38-A del CLSI (Anexo 4).

En la tabla 1 se muestran los perfiles de susceptibilidad para los aislamientos clínicos, los cuales se interpretaron a las 48 horas de incubación, determinando las MG y las MIC para anfotericina B, voriconazol e itraconazol y las MG y MEC para anidulafungina y caspofungina

Tabla 1. E-test en aislamientos clínicos

Especies	Antifúngico	Rango (ug/ml)	MG*	MIC/MEC ₅₀	MIC/MEC ₉₀
<i>Aspergillus fumigatus</i> (4)	Anfotericina B	0,125-0,25	0,153	0,125	0,19
	Voriconazol	0,047-0,064	0,054	0,047	0,064
	Itraconazol	0,125-0,25	0,210	0,25	0,25
	Anidulafungina	0,002-0,004	0,003	0,003**	0,004**
	Caspofungina	0,023-0,047	0,035	0,032**	0,047**
<i>Aspergillus flavus</i> (15)	Anfotericina B	0,004-2	0,507	0,75	1
	Voriconazol	0,008-0,25	0,105	0,125	0,19
	Itraconazol	0,023-0,5	0,163	0,19	0,38
	Anidulafungina	0,003-0,094	0,008	0,006**	0,032**
	Caspofungina	0,002-0,19	0,029	0,023**	0,094**

<i>Aspergillus terreus</i> (1)	Anfotericina B	0,75	0,75	-	-
	Voriconazol	0,032	0,032	-	-
	Itraconazol	0,064	0,064	-	-
	Anidulafungina	0,032	0,032	-	-
	Caspofungina	0,125	0,125	-	-
*MG: Media geométrica					
**MEC					
MIC ₅₀ Concentración mínima inhibitoria en la que se inhibe el 50% de los aislamientos					
MIC ₉₀ Concentración mínima inhibitoria en la que se inhibe el 90% de los aislamientos					

Para los aislamientos clínicos, *A. flavus* y *A. fumigatus*, el antifúngico con mayor actividad fue anidulafungina, seguido por caspofungina, azoles y anfotericina B. Para *A. terreus* los antifúngicos que tiene mayor actividad son anidulafungina y voriconazol.

En la tabla 2 se observan las MG y los MIC₅₀ y MIC₉₀ de los antifúngicos evaluados para los aislamientos ambientales

Tabla 2. E-test en aislamientos ambientales

Especies	Antifúngico	Rango (ug/ml)	MG*	MIC/MEC	MIC/ME
				50	C ₉₀
<i>Aspergillus fumigatus</i> (25)	Anfotericina B	<0,002-0,38	0,075	0,0125	0,25
	Voriconazol	0,032-32	0,070	0,094	>32
	Itraconazol	0,125-4	0,469	0,25	3
	Anidulafungina	0,002-0,032	0,004	0,004**	0,008**
	Caspofungina	0,002-0,047	0,010	0,012**	0,023**

*MG: Media geométrica

**MEC

MIC₅₀ Concentración inhibitoria mínima a la que se inhibe el 50% de los aislamientos

MIC₉₀ Concentración inhibitoria mínima la que se inhibe el 90% de los aislamientos

Para todos los aislamientos de *A. fumigatus*, los antifúngicos más activos fueron anidulafungina y caspofungina, seguido de anfotericina B y azoles. Para voriconazol la MIC 90 fue >32ug/ml.

Teniendo en cuenta las especies identificadas en los aislamientos clínicos y ambientales, solo se realizó la comparación del perfil de susceptibilidad para *A. fumigatus*. Cabe resaltar que para los aislamientos clínicos esta especie corresponde al 20% y para los ambientales al 100%. En la tabla 3 se muestran los porcentajes de sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia para estos aislamientos, teniendo en cuenta los criterios de Espinel-Ingroff, 2011 y EUCAST, 2015. Se observa que para los azoles, voriconazol e itraconazol, hay una resistencia del 32% en los aislamientos ambientales.

Tabla 3. Comparación de los perfiles de susceptibilidad de aislamientos clínicos y ambientales para *Aspergillus fumigatus*

Antifúngico	Aislamiento	Perfil de Susceptibilidad		
		Sensibles	Intermedia	Resistentes
Anfotericina B	C	100%	0%	0%
	A	100%	0%	0%
Voriconazol	C	100%	0%	0%
	A	68%	0%	32%
Itraconazol	C	100%	0%	0%
	A	68%	0%	32%
Anidulafungina	C	100%	0%	0%
	A	100%	0%	0%
Caspofungina	C	100%	0%	0%
	A	100%	0%	0%

C: Clínicos. A: Ambientales

Para *A. flavus*, identificada a partir de aislamientos clínicos, se realizó la misma interpretación de sensible, sensible intermedio y resistente, como se muestra en la

tabla 4. Se observa para anfotericina B una sensibilidad del 74% y susceptibilidad intermedia del 36%.

Tabla 4. Perfiles de susceptibilidad de aislamientos clínicos de *Aspergillus flavus*

Antifúngico	Susceptibilidad		
	Sensibles	Intermedia	Resistentes
Anfotericina B	74%	26%	0%
Voriconazol	100%	0%	0%
Itraconazol	100%	0%	0%
Anidulafungina	100%	0%	0%
Caspofungina	100%	0%	0%

Para el aislamiento de *A. terreus* se observó sensibilidad frente a todos los antifúngicos evaluados.

9. DISCUSIÓN

En las dos últimas décadas se ha producido un incremento en la frecuencia de los casos de infecciones asociados a especies miceliales, especialmente de aspergilosis invasiva, debido al aumento en el número de pacientes inmunosuprimidos, en donde *A. flavus*, seguido de *A. fumigatus*, son los patógenos oportunistas que se asocian a esta patología con mayor frecuencia (Khodavaisy, 2016). En nuestro estudio también se identificaron en las muestras clínicas *A. flavus* seguido de *A. fumigatus*, resultados que concuerdan con la epidemiología reportada sobre aspergilosis.

Es importante tener en cuenta la muestra a partir de la cual se aísla el hongo, debido a que *Aspergillus* spp., al ser un hongo ubicuo, en pacientes inmunocompetentes puede significar colonización sin consecuencias clínicas (Kousha, 2011). En un estudio realizado en 66 pacientes hospitalizados con *Aspergillus* aislados de

esputos, se observó que el 92% de ellos tenían colonización por *Aspergillus*, de los cuales el 4,5% tenían Aspergilosis Pulmonar Invasiva (Soubani, 2004). Para nuestro estudio, el 52% de los aislamientos clínicos provenían de muestras de esputo. La infección fúngica del oído es casi exclusiva del conducto externo, en el caso de la otitis media crónica, los hongos pueden propagarse a la cavidad timpánica, pero por lo general no requiere una intervención clínica intensiva (Ohki, 2001). Cuando la infección micótica es del oído medio es una infección grave pero raramente sucede, siendo *Aspergillus* spp. la causa más frecuente de la enfermedad seguido de otros hongos raramente reportados como *Mucor* (Ayçiçek, 2009). En el caso de nuestro estudio, 4% de los aislamientos clínicos provenían de secreción de oído. Son pocos los estudios realizados referentes a la presencia de *Aspergillus* en muestras provenientes del líquido pleural, sin embargo, en un estudio hecho en Brasil, entre 1980 y 2009, 391 pacientes fueron diagnosticados con aspergiloma en la cavidad pleural diciendo que esta presentación clínica puede darse por distintos factores predisponentes como la edad (29-66 años), el sexo (masculino) y alguna inmunodeficiencia que ya presentaban, en este estudio el agente etiológico más aislado fue *A. fumigatus*, el 33% de los pacientes recibieron tratamiento antimicótico sistémico y anfotericina b (Guazzelli, 2012). En el caso de nuestro estudio, el 4% de las muestras clínicas provenían de líquido pleural.

Las drogas de elección para el tratamiento de las aspergilosis invasivas son anfotericina B e itraconazol, sin embargo, en la última década, también se han utilizado voriconazol y caspofungina, se ha reportado susceptibilidad disminuida frente a itraconazol, caspofungina y voriconazol para algunas especies de *Aspergillus* (Chavez, 2010), como también el reporte de especies diferentes a *Aspergillus fumigatus* resistentes a anfotericina B (Shivaprakash, 2011). En nuestro estudio se evidenció que el 26 % de los aislamientos clínicos de la especie *A. flavus* presentó susceptibilidad intermedia a anfotericina B. Según Perkhofer et al., se plantean que hay una tendencia de *A. flavus* a presentar una resistencia frente a anfotericina B en pruebas *in vitro* (Perkhofer, 2010), Sin embargo, se sabe que la resistencia a los polienos es una característica poco frecuente. Teniendo en cuenta que la anfotericina B actúa a nivel del producto de una vía biosintética (ergosteroles de la membrana) es poco probable la ocurrencia de una variación genética que altere tal ruta de síntesis y se genere una molécula biológicamente funcional que resista la acción de la Anfotericina B (Chandrasekar, 2005). Los mecanismos de resistencia son poco conocidos, aunque la mayor parte de ellos están relacionados con un descenso en la cantidad de ergosterol de la membrana o un aumento de los fosfolípidos que reduce la interacción del fármaco con los esteroides. Estas

alteraciones se han asociado con mutaciones en los genes ERG2 o ERG3, que codifican enzimas que participan en la vía de síntesis del ergosterol (Ruiz-Camps, 2009).

Para los aislamientos ambientales, donde todos correspondieron a *A. fumigatus*, el 32% presentaron resistencia a voriconazol (>32 µg/mL) y 32% susceptibilidad intermedia a itraconazol (1,5-4 µg/ml). En las pasadas dos décadas los registros de *A. fumigatus* resistente a azoles (AFRA) se han hecho cada vez más frecuentes aunque la resistencia adquirida o secundaria no puede considerarse un problema significativo en los hongos filamentosos, ya se han descrito cepas de *A. fumigatus* resistentes al itraconazol y, además, se ha comprobado que esta resistencia es cruzada para otros azoles (voriconazol, ravuconazol o posaconazol) (Mellado, 2002). En cuanto al voriconazol no está claro su origen, se le atribuye una posible fuente ambiental en relación con los abonos de jardinería y se asocian con un mecanismo de resistencia asociado a la mutación TR-L98H del gen que codifica *cyp51A* y que le confiere un carácter de clonalidad (Snelders, 2009). Estos estudios apoyan la sugerencia de que es probable que *A. fumigatus* desarrolle resistencia a los azoles agrícolas en situaciones específicas, y que las mutaciones que conducen a la resistencia a los azoles agrícolas también pueden dar lugar a la resistencia a los azoles utilizados a nivel clínico (Bowyer, 2012). Una estimación de la prevalencia global de resistencia a azol en *Aspergillus* parece ser de 3-6%. Esto todavía plantea preocupación ya que la resistencia fue un evento muy poco frecuente antes del cambio de milenio y se presenta también en los pacientes que no están en tratamiento antifúngico (Arendrup, 2014).

En nuestro estudio, en cuanto a la actividad farmacológica *in vitro* de los aislamientos clínicos para los diferentes agentes antifúngicos ensayados los más activos fueron anidulafungina (MIC: 0,008µg/ml) y caspofungina (MIC: 0,029 µg/ml) para las especies de *A. fumigatus* y para *A. flavus anidulafungina* (MIC: 0,003µg/ml) y caspofungina (MIC: 0,035 µg/ml). Para los aislamientos ambientales el antifúngico que presentó mayor actividad fue la anidulafungina (MIC: 0,004 µg/ml). En un estudio realizado por Pfaller et al., donde se comparó las MECs de las equinocandinas (anidulafungina, caspofungina y micafungina), se observó una buena actividad de los tres antifúngicos con más del 99% de todos los aislados inhibidos por 0.06 g/ml de los tres agentes. Los valores de MEC₅₀ y MEC₉₀ para todos los aislados fueron de 0,007 g/mL y 0,015 g/mL, para la anidulafungina y micafungina respectivamente, y 0,015 g / ml y 0,03 g / ml, para caspofungina respectivamente (Pfaller, 2009).

De acuerdo con varios estudios, el itraconazol tiene una aceptable actividad *in vitro* frente a especies de *Aspergillus* (García-Martos, P, 2005). En nuestro estudio no se observó debido a que la CMI₅₀ fue de 0,25 µg/ml la cual fue mayor comparado con los otros antifúngicos para los aislamientos ambientales.

Según un estudio realizado por Araujo et al., mencionan que es muy común encontrar especies de *A. fumigatus* resistentes tanto de aislamientos clínicos como ambientales (Araujo, 2007). En nuestro estudio no se evidenció debido a que *A. fumigatus* aislado del ambiente presentó resistencia azoles y esto no se observó en los aislamiento clínicos pertenecientes a esta especie. Para comprobar lo anteriormente dicho, es necesario aislar un mayor número de *A. fumigatus* provenientes de muestras clínicas, debido a que en nuestro estudio solo se lograron aislar 4 cepas clínicas.

Recientemente el E-test ha sido evaluado para detectar la sensibilidad disminuida de cepas de *A. fumigatus* a caspofungina. Se ha demostrado que caspofungina no sólo inhibe el crecimiento *in vitro* de aislamientos de *Candida* spp. sino de especies miceliales como *Aspergillus* sp. Sin embargo, a diferencia de las MIC, la determinación de la MEC ha probado ser una alternativa más práctica para evaluar la sensibilidad de los miceliales a este agente antifúngico. Entre las especies miceliales, las equinocandinas son generalmente utilizadas para el tratamiento de infecciones por *Aspergillus* sp. (Chavez, J, 2010). Nuestro estudio comprobó la buena actividad farmacológica de este agente antifúngico (MIC: <0.5 µg/ml) frente a todas las especies de *Aspergillus* de los aislamientos clínicos y ambientales. La combinación de voriconazol con anidulafungina, actualmente, puede mejorar los resultados de la terapia antifúngica resistente a azoles, debido a que muestran una buena respuesta *in vitro* contra la aspergilosis (Seyedmousavi, 2013).

El método de E-test tiene un valor potencial en las pruebas de sensibilidad para hongos miceliales patógenos, este método ha sido adaptado en varios estudios antifúngicos, puesto que las MIC obtenidas son fáciles de leer e interpretar. En general, la comparación de este método con los de referencia siempre han demostrado un buen porcentaje de acuerdo para los triazoles (>90%) y anfotericina B (>80%), (Lass-Flörl, 2010).

10. CONCLUSIONES

Todos los agentes antifúngicos presentaron una buena actividad antifúngica contra los aislamientos clínicos, donde anidulafungina fue el antifúngico que presentó la mayor actividad.

A. fumigatus obtenido de los aislamientos ambientales presentó una resistencia del 32% frente a voriconazol y 32% susceptibilidad intermedia frente a itraconazol. Esto es una señal de advertencia porque indica que pueden estar adquiriendo resistencia por la constante presión de azoles usados en la agricultura, en particular, difenoconazol, propiconazol, epoxiconazol, bromuconazol y tebuconazol debido a que son estructuralmente muy similares a los triazoles médicos y activos contra *A. fumigatus* lo que permite que el microorganismo cambie lo suficiente para que los sistemas que la droga normalmente modifica sean distintos.

11. RECOMENDACIONES

- Determinar la susceptibilidad en un mayor número de cepas, distribuidas entre especies.
- Caracterizar genotípicamente las cepas resistentes a azoles.
- Teniendo en cuenta que fue un estudio realizado a partir de un banco de cepas sería interesante realizar un estudio retrospectivo utilizando estos resultados frente a la historia clínica del paciente, teniendo en cuenta el desenlace en el tratamiento.
- Evaluar la aerobiología de las cepas de *Aspergillus fumigatus* resistentes en nuestro estudio.

12. REFERENCIAS

- Araujo, R., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A. (n.d). Susceptibility of environmental versus clinical strains of pathogenic *Aspergillus*. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 29(1), 108-111.
- Arendrup, M. C. (2014). Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical Microbiology And Infection: The Official Publication Of The European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases*, 20 Suppl 642-48. doi:10.1111/1469-0691.12513
- Arikan, S. (2007) Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology*, 45(7), 569-587
- Ayçiçek, A., Kenar, F., Çetinkaya, Z., Aşık, G., Kiyici, H., & Kiraz, N. (2009). The effects of caspofungin and voriconazole in an experimental fungal infection of the ear due to *Aspergillus*. *European Archives Of Oto-Rhino-Laryngology*, 266(11), 1703-1709. Doi: 10.1007/s00405-009-0963-2
- Baddley, J., Marr, K., Andes, D., Walsh, T., Kauffman, C., Kontoyiannis, D., & ... Moser, S. (n.d). Patterns of Susceptibility of *Aspergillus* Isolates Recovered from Patients Enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *Journal Of Clinical Microbiology*, 47(10), 3271-3275.
- Bowyer, P. (2012). Environmental fungicides and triazole resistance in *Aspergillus*. *Pest Management Science*, Vol. 70 (173-178).
- Cárdenas, M., Cortes, J., & Parra, C. (2008). Original: Presencia de *Aspergillus* spp. en áreas de riesgo en pacientes trasplantados en un hospital universitario. *Revista Iberoamericana De Micología*, 25232-236. doi:10.1016/S1130-1406(08)70055-X
- CDC. (13 de febrero de 2014). *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*. Obtenido de <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/symptoms/clinical-features.html><http://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/symptoms/clinical-features.html>
- Chandrasekar, P. H. (2005). Antifungal resistance in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 43(1) S295-S298.
- Chavez, Jenny, Rivas, Pilar, Cortés, Jorge, Cuervo, Sonia, Sánchez, Ricardo, & Parra, Claudia. (2010). Sensibilidad in vitro de hongos miceliales de aislamientos clínicos en pacientes con cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología ESE. *Infectio*, 14(Suppl. 2), s116-s126
- Espinel-Ingroff, A. (2008). In vitro susceptibility testing: When, where and what to use. *The Journal of Invasive Fungal Infections*, Vol. 2 (52-62).

- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Fuller, J., Johnson, E., Pelaez, T., & Turnidge, J. (2011). Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for caspofungin and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 55(6), 2855-2859. doi:10.1128/AAC.01730-10
- EUCAST. (Noviembre de 2015). *Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs*. Obtenido de http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_8.0_November_2015.pdf
- FICA C., ALBERTO. (2004). Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Revista chilena de infectología*, 21(1), 26-38.
- Fica C, Alberto. (2004). Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. III parte: Anfotericina B, aspectos farmacoeconómicos y decisiones terapéuticas. *Revista chilena de infectología*, 21(4), 317-326.
- García-Martos, P. (2005). Actividad in vitro de anfotericina B, itraconazol y voriconazol frente a 20 especies de *Aspergillus* empleando el método de microdilución Sensititre®. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(1) 15-18.
- Garcia-Vidal, C., & Carratalà, J. (2012). Pathogenesis of invasive fungal infections. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(3), 151-158. doi:10.1016/j.eimc.2011.09.01
- García-Vidal, C., & Salavert Lletí, M. (2014). Inmunopatología de las micosis invasivas por hongos filamentosos. (Spanish). *Revista Iberoamericana De Micología*, 31(4), 219-228. doi:10.1016/j.riam.2014.09.001
- Gavaldá, J. (2003). Recomendaciones para el tratamiento de la infección por *Aspergillus* spp. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 21(10) 47-54.
- Gobernado, M. (2008). Anidulafungina. *Revista Española Quimioterapia*, 21(99-114).
- Guazzelli, Luciana Silva, Severo, Cecília Bittencourt, Hoff, Leonardo Santos, Pinto, Geison Leonardo Fernandes, Camargo, José Jesus, & Severo, Luiz Carlos. (2012). *Aspergillus fumigatus* fungus ball in the pleural cavity. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 38(1), 125-132
- Guinea, J., Peláez, T., Alcalá, L., Ruiz-Serrano, M. J., & Bouza, E. (2005). Antifungal susceptibility of 596 *Aspergillus fumigatus* strains isolated from outdoor air, hospital air, and clinical samples: analysis by site of isolation. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 49(8), 3495-3497.

- Gupta, P., Kumar, D., Ahmad, A., Banerjee, G., Singh, M., & Khare, V. (2015). Comparative evaluation of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution in Susceptibility testing of amphotericin B, voriconazole and caspofungin against clinical *Aspergillus* isolates. *Journal Of Clinical And Diagnostic Research*, 9(1), DC04-DC07. doi:10.7860/JCDR/2015/10467.5395
- Hernández, A. M. (23 de septiembre de 2012). *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. España*. Obtenido de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Ficha%20Aspergillus%20spp.pdf>
- Howard, S. J., Pasqualotto, A. C., Anderson, M. J., Leatherbarrow, H., Albarrag, A. M., Harrison, E., & ... Denning, D. W. (2013). Major variations in *Aspergillus fumigatus* arising within aspergillomas in chronic pulmonary aspergillosis. *Mycoses*, 56(4), 434-441. doi:10.1111/myc.12047.
- Khodavaisy, S., Badali, H., Hashemi, S., Aala, F., Nazeri, M., Nouripour-Sisakht, S., & ... Rezaie, S. (2016). Original article/Article original: In vitro activities of five antifungal agents against 199 clinical and environmental isolates of *Aspergillus flavus*, an opportunistic fungal pathogen. *Journal De Mycologie Médicale*, 26116-121. doi:10.1016/j.mycmed.2016.01.002.
- Kousha, M., Tadi R., Soubani A. O., Pulmonary aspergillosis: a clinical review *European Respiratory Review*. Sep 2011, 20 (121) 156-174; DOI: 10.1183/09059180.00001011
- Kwon-Chung, K. J., & Sugui, J. A. (2013). *Aspergillus fumigatus*—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? *PLoS Pathogens*, 9(12), e1003743.
- Lass-Flörl, C., Perkhofer, S. and Mayr, A. (2010), *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses*, 53: 1–11. doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01813.x
- Lumbreras, C. (2003). Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20 79-89.
- Martin Juan, J. (1994). Guía de procedimientos LAVADO BRONCOALVEOLAR. *Revista de la asociación de neumólogos del sur*, Vol. 6 (34-39).
- Ohki, M. (2001). Fungal mastoiditis in an immunocompetent adult. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, Vol. 258 (106-108).
- Oxilia, Héctor Guillermo, Oxilia, Rodrigo Guillermo, Morales, Lorena, & Falco, Fernando. (2008). Aspergilosis: una patología a considerar. *Revista argentina de radiología*, 72(1), 55-60.

- Palacio, A. d. (2007). Estado actual del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24, Vol. 24 (187-197).
- Parra I, Remacha A, Rezusta A, Suárez D, Suárez J, Herreras J A, et al. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *Med Mycol* (2004) 42 (4): 369-371 doi: 10.1080/13693780410001657144
- Penan, J. (2003). Diagnóstico anatomopatológico de aspergilosis invasora. *Revista Iberoamericana de micología*, Vol. 20 (42-46).
- Pfaller, M. A., Boyken, L., Hollis, R. J., Kroeger, J., Messer, S. A., Tendolkar, S., & Diekema, D. J. (2009). In Vitro Susceptibility of Clinical Isolates of *Aspergillus* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: a Head-to-Head Comparison Using the CLSI M38-A2 Broth Microdilution Method. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(10), 3323–3325.
- Randiola, P. P. (2002). Diagnóstico de aspergilosis pulmonar invasiva y semiinvasiva. *SVNPAR ENAPE: Temas de actualidad neumológica*, (1-11).
- Refojo, N. (2013). Genotipificación de aislamientos clínicos de *Aspergillus flavus* y su relación con aislamientos ambientales de un centro oncohematológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1) 25-30.
- Rodrigo Cruz, C., & Eduardo Piontelli, L. (2011). Invasive fungal disease in patients from five hospitals in the Valparaiso Region, Chile. 2004 to 2009. *Revista Chilena De Infectología*, 28(2), 123-129. Doi: 10.4067/S0716-10182011000200004
- Rodriguez-Tudela, J. L., Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Monzon, A., & Cuenca-Estrella, M. (2008). Epidemiological Cutoffs and Cross-Resistance to Azole Drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2468–2472.
- Ruiz-Camps, I. (2009). Antifungals for systemic use. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, Vol. 27 (353-362).
- Saballs, P. (2000). Tratamiento de la aspergilosis invasiva. *Revista Iberoamericana de Micología*, Vol. 17 (S93-S96).
- Schwartz, S. and Thiel, E. (1997), Clinical presentation of invasive aspergillosis. *Mycoses*, 40: 21–24. doi:10.1111/j.1439-0507.1997.tb00559.x
- Seyedmousavi, S., Meletiadis, J., Melchers, W. J. G., Rijs, A. J. M. M., Mouton, J. W., & Verweij, P. E. (2013). In Vitro Interaction of Voriconazole and Anidulafungin against Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 796–803.
- Shivaprakash, M. R., Geertsen, E., Chakrabarti, A., Mouton, J. W. and Meis, J. F. (2011), In vitro susceptibility of 188 clinical and environmental isolates

of *Aspergillus flavus* for the new triazole isavuconazole and seven other antifungal drugs. *Mycoses*, 54: e583–e589. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01996.x.

- Snelders, E., Huis in 't Veld, R. A. G., Rijs, A. J. M. M., Kema, G. H. J., Melchers, W. J. G., & Verweij, P. E. (2009). Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4053–4057.
- Soubani, A. O. (2004). Clinical significance of lower respiratory tract *Aspergillus* culture in elderly hospitalized patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 23 (491-494).
- Tapia P, Cecilia V. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista chilena de infectología*, 26(2), 144-150.
- Zambrano F, Alcides, Biere A, Andrea, & Isamitt D, Dionis. (2007). Aspergilosis necrotizante crónica en un paciente con secuelas de tuberculosis pulmonar. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 23(1), 43-48

13. ANEXOS

Anexo 1

MEDIOS DE CULTIVO, COMPONENTES Y PREPARACIÓN

Medio Sabouraud suplementado con cloranfenicol

Digerido enzimático de caseína	10,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agar	15 g
Agua destilada estéril csp	1000 mL
pH final	5,6 ± 0,2

Suspender 65 g de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir y enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización

Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium)

Los componentes se preparan en dos soluciones separadas: RPMI x 2, y agar x 2

- Solución 1: RPMI 2% G x 2

RPMI 1640	10,4 g
MOPS	34,5 g
Glucosa	18 g
Agua destilada estéril csp	500 mL

Disolver en frío. Ajustar a pH 7,0 con NaOH (inicialmente a 450 mL). Llevar a 500 mL con agua destilada en probeta y comprobar el pH 7,0. Esterilizar por filtración o

esterilizar en autoclave por vapor fluyente durante 1 hora. Calentar y mantener a 65°C.

- Solución 2: Agar x 2 (30 g/L)

Agar-agar	15 g
Agua destilada	500 mL

Calentar y agitar hasta disolver completamente el agar. Esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C). Enfriar y mantener a 65°C

Una vez que se tienen ambas soluciones a 65°C, se mezclan evitando la formación de burbujas, en la siguiente proporción

- 500 mL de la solución 1
- 500 mL de la solución 2

Dispensar 20 mL por placa de Petri de 90 mm. Las placas con el medio solidificado se guardan sin secar a 4°C, antes de su utilización se secan destapadas durante 20 minutos a 37°C

Anexo 2

AZUL DE LACTOFENOL PARA VISUALIZACIÓN MICROSCOPICA DE *Aspergillus sp.*

Aplicación: El material se tiñe por tinción en un paso. Los elementos fúngicos aparecen azul oscuro.

Fundamento: Esta coloración se fundamenta en que las paredes de los hongos por sus radicales glúcidos (quitina y/o glucano) reaccionan con el azul de lactofenol, tomando una coloración azul, coloración que es mantenida gracias al pH ácido que ejerce el ácido láctico y a la glicerina que actúa preservando la integridad de la pared celular.

Técnica: Se toma una porción de cinta pegante y se pega por los extremos en el dedo pulgar y anular, de forma que el pegante quede hacia el exterior. Una vez la cinta esté en posición de arco tomar una impronta o huella del hongo. Posteriormente, se pega la cinta en la lámina portaobjetos que contiene una gota de azul de lactofenol previamente colocada. Finalmente se cubre el montaje con una laminilla y se observa al microscopio en 40x.

Anexo 3

CLAVES TAXÓNOMICAS DE IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus* sp

Aspergillus flavus

Ecología: Cosmopolita, aislado principalmente de plantas y tierra.

Apariencia macroscópica de la Colonia

1. Crecimiento rápido
2. Textura Pulverulenta
3. Superficie de tonos color verde–amarillosa.

Características microscópicas:

1. Conidióforo: Rugoso poco coloreado
2. Vesícula: Hemisférica, columnar o globosa
3. Fíalides: Biseriadas a menudo variando en la misma cabeza y rodeando toda la vesícula.
4. Conidios: Más o menos rugosos variando de color como la colonia.

Aspergillus fumigatus

Ecología: Cosmopolita, termo tolerante, aislado frecuentemente de material en descomposición y plantas. Uno de los más comunes de la naturaleza. Es la de mayor importancia médica.

Características macroscópicas de la Colonia:

1. Crecimiento rápido
2. Textura pulverulenta
3. Superficie de tonos azul-verdoso, amarillo y café.

Características microscópicas:

1. Conidióforo: Liso y ligeramente pigmentado de verde.
2. Fíalides: Una sola hilera en la mitad superior de la vesículas

3. Cabeza conidial: Es de columnas compactas y de color verde
4. Conidias: Redondas en cadenas.

Aspergillus terreus

Ecología: Cosmopolita, pero es más común en áreas tropicales o subtropicales. Asilado principalmente del suelo, abono y plantas.

Características macroscópicas de la colonia.

1. Crecimiento rápido
2. Textura arenosa y pulverulenta o aterciopelada
3. Superficie de tonos color canela en el centro café y el reverso va desde color amarillo a color marrón.

Características microscópicas:

1. Conidióforo: Lisos sin color.
2. Vesícula: Hemisférica, similar a una cúpula, a veces llega a ser imperceptible en el Conidióforo.
3. Fálides: Biseriadas
4. Conidios: Globosos a elípticos.

Anexo 4

CONTROL DE CALIDAD

Aspergillus flavus ATCC 204304, *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-3626, *Candida parapsilosis* ATCC 22016 la MIC y MEC estaban dentro de los puntos establecidos.

E-test en cepas ATCC

ATCC	Antifúngico	MIC/MEC	Rango MIC/MEC
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	Anfotericina B	1,5	0,5-4
	Voriconazol	0,50	0,5-4
	Itraconazol	0,25	0,2-0,5
	Anidulafungina	0,012	-
	Caspofungina	0,012	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC MYA-3626	Anfotericina B	0,75	0,5-4
	Voriconazol	0,25	0,25-1
	Itraconazol	0,25	0,25-2
	Anidulafungina	0,002	<0,015
	Caspofungina	0,0012	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22016	Anfotericina B	0,75	0,5-4
	Voriconazol	0,125	0,03-0,25
	Itraconazol	0,125	0,12-0,5
	Anidulafungina	0,75	0,5-2
	Caspofungina	0,5	0,5-4
Todos los aislamientos ATCC fueron leídos a las 48 horas			