

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA
Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla)



TESIS DOCTORAL

**Ampliación y validación de una nueva base de
datos para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF**

María de los Reyes Vidal Acuña

Sevilla, 2018

El **Dr. Javier Aznar Martín**, Jefe de Servicio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y Catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla; la **Dra. María José Torres Sánchez**, Profesora de Microbiología de la Universidad de Sevilla y la **Dra. Maite Ruiz Pérez de Pipaón**, Facultativa Especialista en Microbiología y Parasitología del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla,

Certifican:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla y que lleva por título **“Ampliación y validación de una nueva base de datos para la identificación de *Aspergillus* spp. mediante EM MALDI-TOF”** ha sido realizada por D^a María de los Reyes Vidal Acuña bajo su supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Sevilla, a / / 2018

Fdo. Dr. Javier Aznar Martín

Fdo. Dra. María José Torres Sánchez

Fdo. Dra. Maite Ruiz Pérez de Pipaón

A mis padres, Luis y Reyes

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de tesis; Javier Aznar, María José Torres y Maite Ruiz, la confianza depositada en mí para realizar este trabajo de investigación. Me han orientado y supervisado, pero sobre todo me han motivado y apoyado. Gracias a ellos dí mis primeros pasos en el difícil campo de la investigación, completando mi formación en hongos. Sería injusto acabar este párrafo sin volver a mencionar a la Dra. Torres por su inestimable ayuda, ya que siempre estuvo cuando la necesité, fuese cualquier hora o día de la semana, fuese de temas relacionados con biología molecular o cualquier otro, siempre estuvo conmigo y he de decir, que se reía mucho. De corazón, muchísimas gracias.

Gracias a todos los microbiólogos del H.U. Virgen del Rocío por su interés, su apoyo y sus miradas llenas de orgullo cuando les hablaba de la evolución de este trabajo.

Gracias a todos los compañeros de residencia, especialmente a Guillermo y Ángel, por sus consejos, su tiempo y su compañía. Trabajar con un equipo así hace que todo sea más fácil y, sobre todo, divertido.

Gracias a los TEL por su paciencia y ayuda, especialmente a Nati, Aurora e Isabel; por soportar mis placas, ocupar su campana de trabajo, almacenar alguna que otra caja, desconfigurar alguna que otra cosilla en el MALDI-TOF...

Gracias a todos los amigos, que siempre se han interesado por este trabajo y se han ofrecido para ayudarme en lo que necesitara. Tengo muy buenos referentes, y ellos son parte de la motivación que me ha llevado hasta aquí.

Por supuesto a mi familia. Mis padres, Luis y Reyes, han estado conmigo siempre, siempre y siempre. Son un ejemplo a seguir en todos los sentidos y su cariño y dedicación me han ayudado y guiado a conseguir cada una de mis metas. Nunca olvidaré las flores silvestres recogidas por mi padre para practicar para el examen de Botánica o las horas que mi madre me dedicó durante la preparación de los dos exámenes FIR. Este trabajo es un paso más en esta carrera y me siento tremendamente orgullosa de poderse los dedicar. Ya sólo nos queda la OPE.

No me olvido de mi hermano, cuñada, sobrinos y demás familia, que siempre se han interesado y me han animado a lo largo de este camino.

Y por ser el último, no es menos importante. Si hay una persona a la que tengo que dedicar esta tesis es a mi marido Javi. Cuántas horas me ha dedicado. No tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí. Me ha escuchado, me ha aconsejado, me ha guiado y me ha enseñado. A pesar de quitarle tiempo para su

estudio, siempre ha estado dispuesto a ayudarme. Ideó una caja para hacer fotos a los hongos, me enseñó a usar el programa de referencias bibliográficas, leyó una y otra vez los artículos antes de que pasaran el filtro de los directores, perfeccionó la presentación de la tesis... Podría decir que sabe de la tesis casi como yo. Muchas gracias por tu dedicación. Tenerte a mi lado en la sala de estudio ha sido la mejor de las motivaciones.

Soy muy afortunada por contar con personas tan buenas a mi alrededor. A todos ellas, muchas gracias.

Addendum

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han sido publicados en revistas científicas:

- Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar J. Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol* 2017. Available from: <https://academic.oup.com/mmy/advancearticle/doi/10.1093/mmy/myx115/4714789>.
- Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. Prevalence and *in vitro* antifungal susceptibility of cryptic species of *Aspergillus* isolated in clinical samples. *Med Mycol* (En revisión).

Además, se han presentado comunicaciones orales y pósters en congresos regionales, nacionales e internacionales:

- Identificación of *Aspergillus* section *Nigri* by MALDI-TOF MS using a proprietary library. Vidal-Acuña MR, Torres-Sánchez MJ, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Aznar-Martín J. 26th European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abril 2016.
- Prevalence of *Aspergillus* species in clinical samples isolates in the Reference Hospital Virgen del Rocío (Andalusia, Spain). Vidal-Acuña MR, Torres-Sánchez MJ, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Aznar-Martín J. 26th European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abril 2016.
- Identificación de *Aspergillus* sección *Flavi* por espectrometría de masas MALDI-TOF. Vidal-Acuña MR, Rodríguez-Villodres A, Gómez-Gómez MJ, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. XX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Mayo 2016.
- *Aspergillus* spp.: colonización versus infección. Vidal-Acuña MR, Rodríguez-Villodres A, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. XXIX Reunión de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínica. Octubre 2016.

- *Aspergillus* sección *Nigri*: desarrollo y validación de una base de datos para su identificación mediante espectrometría de masas. Vidal-Acuña MR, Rodríguez-Villodres A, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Mayo 2017.
- Secuenciación a la búsqueda de especies crípticas del género *Aspergillus*. Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Mayo 2017.
- *Aspergillus* sección *Nidulantes*: identificación molecular y estudio de sensibilidad antifúngica. Vidal-Acuña MR, Rodríguez-Villodres A, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Mayo 2017.
- Prevalence of *Aspergillus* species in respiratory tract samples of patients with cystic fibrosis in the University Hospital Virgen del Rocío (Andalusia, Spain). Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. 40th European Cystic Fibrosis Conference. Junio 2017.
- Development of an extended data-base for the identification of *Aspergillus* spp. by MALDI TOF mass spectrometry. Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar-Martín J. 28th European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abril 2018.

Índice de contenidos

Introducción	221
Género <i>Aspergillus</i>	23
Antecedentes históricos.....	23
Clasificación taxonómica.....	24
Identificación.....	27
1. Identificación fenotípica.....	27
2. Identificación molecular.....	29
Importancia del género	30
<i>Aspergillus</i> y enfermedad animal.....	31
Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	37
Fundamento teórico	37
Procedimiento experimental.....	39
Sensibilidad a los antifúngicos.....	42
Polienos.....	42
Azoles.....	44
Equinocandinas.....	45
Justificación y Objetivos	49
Materiales.....	53
Microorganismos.....	55
Cepas	55
Cepas de referencia.....	55
Productos químicos y biológicos	56
Agentes antifúngicos.....	57
Aparatos y materiales	57
Disoluciones y disoluciones reguladoras.....	58
Medios de cultivo	60
Métodos.....	63
Recogida de datos clínicos.....	65
Aislamiento e identificación de las especies de <i>Aspergillus</i> en el laboratorio	66
Conservación de cepas.....	68
Identificación molecular de las cepas estudiadas.....	68
Extracción de ADN cromosómico.....	68
Electroforesis de ADN.....	69
Amplificación	70

Purificación de los productos de PCR.....	71
Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias	71
Confección de una nueva base de datos en el espectrómetro de masas MALDI-TOF.....	72
Preparación de las muestras	72
Calibración del sistema	74
Adquisición de espectros (programa FlexControl)	75
Análisis de espectros (programa FlexAnalysis)	76
1. Revisión de los espectros adquiridos	76
2. Calibración.....	78
Creación de una nueva entrada en la base de datos (programa Maldi Biotyper)	79
1. Creación del MSP (<i>main spectrum</i>)	79
2. Herramientas para evaluar el MSP	80
3. Introducción de la nueva entrada en la base de datos.....	81
Validación de la nueva base de datos creada en el espectrómetro de masas MALDI-TOF.....	82
Preparación de las muestras	82
Interpretación de los resultados.....	83
Determinación de sensibilidad a los antifúngicos mediante dilución en caldo. ...	84
Medio de cultivo.....	85
Preparación de la disolución madre de antifúngico	85
Preparación de las diluciones de antifúngico	86
Preparación de las placas de microdilución.....	87
Preparación del inóculo	88
Inoculación de las placas de microdilución	89
Incubación de las placas de microdilución	89
Lectura e interpretación de los resultados.....	89
Cepas control de calidad.....	90
Análisis estadístico	90
Resultados.....	91
Aislamiento e identificación de las especies de <i>Aspergillus</i>	93
Identificación a nivel fenotípico.....	93
Identificación a nivel genotípico.....	93
EM MALDI-TOF:	97
Biblioteca original (Filamentous Fungi Library 1.0).....	97
Biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR.....	98
Dendograma de la biblioteca propia.....	101
Comparación de ambas bibliotecas.....	103
Validación de la biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR.....	105

Evaluación prospectiva de la base de datos.....	107
Identificación por métodos moleculares de las 379 cepas.....	109
Comparación entre identificación fenotípica e identificación molecular (secuenciación + EM MALDI-TOF).....	110
Descripción de los datos epidemiológicos de las cepas de <i>Aspergillus</i> aisladas en el H.U. Virgen del Rocío durante el período 2014-2015.....	111
Determinación de sensibilidad a los antifúngicos.....	120
Discusión	129
Conclusiones.....	153
Bibliografía	157
Anexos	175
Anexo 1. Espectros de <i>Aspergillus</i> spp.	177
Sección <i>Fumigati</i>	177
Sección <i>Flavi</i>	179
Sección <i>Nigri</i>	181
Sección <i>Circumdati</i>	182
Sección <i>Versicolores</i>	183
Sección <i>Nidulantes</i>	185
Sección <i>Terrei</i>	186
Sección <i>Usti</i>	186
Anexo 2. Publicación científica	187

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación por subgéneros y secciones de las 339 especies actualmente válidas del género <i>Aspergillus</i> .	26
Figura 2. Estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i> .	29
Figura 3. Componentes de un espectrómetro de masas.	38
Figura 4. Espectro de masas.	39
Figura 5. Principio de funcionamiento de un microcanal.	40
Figura 6. Proceso de análisis de un espectrómetro de masas MALDI-TOF.	41
Figura 7. Estructura química de los diversos fármacos antifúngicos ensayados en este estudio.	47
Figura 8. Mecanismo de acción de los diferentes antifúngicos.	47
Figura 9. Complejo Hospitalario Virgen del Rocío.	65
Figura 10. Representación de la preparación de la impronta para la observación de hongos filamentosos.	68
Figura 11. Aspecto del pase de una cepa de <i>A. flavus</i> tras 48 horas de incubación, previa a la extracción de ADN.	68
Figura 12. Aspecto que presentan el marcador de peso molecular utilizado y el gel de electroforesis revelado de los productos de PCR.	71
Figura 13. Diseño sobre la distribución de 10 muestras en la tarjeta de 96 posiciones.	74
Figura 14. Espectros obtenidos durante la fase de lectura.	76
Figura 15. Espectros tras el doble procesamiento (<i>Smooth Mass Spectrum</i> y <i>Subtract Mass Spectrum Baseline</i>).	77
Figura 16. Revisión de los espectros.	77
Figura 17. Proceso de calibración del espectro BTS+muestra.	78
Figura 18. Resultado final de los espectros de la muestra tras ser revisados y calibrados a 6150.86Da.	79
Figura 19. Lista de picos del MSP de una cepa en estudio: <i>Aspergillus fumigatus</i> isolate A48-23.	80
Figura 20. Matriz de correlación de un MSP.	81

Figura 21. Dendograma de MSPs de <i>Aspergillus</i> spp.....	82
Figura 22. Preparación de las disoluciones de trabajo de antifúngicos hidrófobos (disolvente: DMSO). Disolución madre de 1600 mg/L, a modo de ejemplo	87
Figura 23. Modo de llenado de las placas de microdilución	87
Figura 24. Portaobjetos Kova®-Slide 10 con retículos.....	88
Figura 25. Identificación fenotípica de <i>Aspergillus</i> spp. (n=379).....	93
Figura 26. Dendograma de las especies incluidas en la biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR.....	101
Figura 27. Distribución por frecuencias de las especies de <i>Aspergillus</i>	110
Figura 28. Distribución de los pacientes con aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp. según sexo y edad.	112
Figura 29. Enfermedad de base de los pacientes con aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp.	112
Figura 30. Enfermedades pulmonares de los pacientes con aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp.	113
Figura 31. Distribución de las muestras en las que se aislaron <i>Aspergillus</i> spp.	113
Figura 32. Distribución de las muestras respiratorias en las que se aislaron <i>Aspergillus</i> spp.	114
Figura 33. Representación gráfica de la valoración clínica de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp.	117
Figura 34. Representación gráfica de la valoración clínica de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp. en los diferentes tipos de muestras respiratorias.	119
Figura 35. Gráfico de frecuencias de los servicios peticionarios.....	120
Figura 36. Aplicación de los puntos de corte de EUCAST de la anfotericina B, en todas las especies estudiadas.	125
Figura 37. Aplicación de los puntos de corte de EUCAST de voriconazol, en todas las especies estudiadas.	126
Figura 38. Aplicación de los puntos de corte de EUCAST de posaconazol, en todas las especies estudiadas.	127

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación por subgéneros y secciones de <i>Aspergillus</i>	25
Tabla 2. Características morfológicas para la identificación fenotípica de <i>Aspergillus spp</i>	28
Tabla 3. Factores de riesgo para el desarrollo de micosis oportunistas.....	33
Tabla 4. Formas clínicas de aspergilosis	36
Tabla 5. Cepas de referencia utilizadas para la creación de la biblioteca.	55
Tabla 6. Cebadores y sus secuencias de nucleótidos empleados en el estudio.	70
Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR.	70
Tabla 8. Los puntos de calibración del BTS con su desviación máxima permitida (± 300 ppm)	75
Tabla 9. Disolventes para la preparación de las disoluciones madre, concentración de las mismas e intervalo de concentración adecuado para llevar a cabo los estudios de sensibilidad antifúngica	86
Tabla 10. Intervalos de referencia a los antifúngicos (mg/L) de las cepas utilizadas como control de calidad	90
Tabla 11. Aislamientos de <i>Aspergillus</i> (n=179) identificados por secuenciación. ...	94
Tabla 12. Identificación por métodos fenotípicos y por secuenciación de las 179 cepas estudiadas.	95
Tabla 13. Identificación de especies crípticas por secuenciación.....	97
Tabla 14. Especies de <i>Aspergillus</i> incluidas en la biblioteca Filamentous Fungi Library 1.0 (Bruker Daltonik).	99
Tabla 15. Aislamientos de <i>Aspergillus</i> usados para construir la base de datos Hongos Filamentosos-HUVR.....	100
Tabla 16. Características de las entradas que componen la biblioteca original (Filamentous Fungi Library 1.0) y la biblioteca propia (Hongos Filamentosos-HUVR).	103
Tabla 17. Comparativa de biblioteca original y biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR	104
Tabla 18. Identificación de aislamientos de <i>Aspergillus</i> utilizando la biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR.....	106

Tabla 19. Comparación de <i>scores</i> obtenidos tras identificación a partir de medio sólido y líquido.	107
Tabla 20. Evaluación prospectiva de la biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR...108	
Tabla 21. Identificación por métodos moleculares de las 379 cepas de <i>Aspergillus</i>	109
Tabla 22. Identificación por métodos fenotípicos y moleculares de las 379 cepas.	111
Tabla 23. Distribución de los aislamientos clínicos de <i>Aspergillus</i> spp. por tipo de muestra.	115
Tabla 24. Valoración clínica de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp.....	117
Tabla 25. Especies de <i>Aspergillus</i> aisladas en los casos con valoración clínica registrada.	118
Tabla 26. Valoración clínica de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp. en los diferentes tipos de muestras respiratorias.	118
Tabla 27. Servicios peticionarios de los cultivos en los que se aislaron <i>Aspergillus</i> spp.	119
Tabla 28. Actividad <i>in vitro</i> de los antifúngicos ensayados en las cepas seleccionadas.....	121

Abreviaturas

ABPA	Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Aspergilosis invasora
AmB	Anfotericina B
APC	Aspergilosis Pulmonar Crónica
API	Aspergilosis Pulmonar Invasora
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BTS	Bacterial Test Standard
CCI	Composite Correlation Index
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CME	Concentración mínima efectiva
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
ECOFF	Epidemiological cut-off
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de masas
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
HUVR	Hospital Universitario Virgen del Rocío
IDSA	Infectious Diseases Society of America
ITS	Internal Transcribed Spacer
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time of Flight
MCP	Multi channel plate
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
MSP	Main Spectrum
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNT	Protocolo Normalizado de Trabajo
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TBE	Tris, borato y EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
uma	Unidad de masa atómica

Introducción

Ampliación y validación de una nueva base de datos
para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF

Género *Aspergillus*

Antecedentes históricos

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli, que marcó el punto de partida de la Micología como ciencia en su obra *Nova Plantarum Genera*. En ella, describió las estructuras típicas del género, como son los conidióforos y sus cabezas conidiales. La forma de estas últimas le recordaron al hisopo usado para bendecir con agua bendita las ceremonias cristianas, de cuyo nombre latino "*aspergillum*" derivó el nombre asignado a este nuevo género. Micheli describió 9 especies dentro de *Aspergillus*, usando una nomenclatura latina bi o trinominal.

Link en 1809 restableció la definición de *Aspergillus* hecha por Micheli, restringiendo el género a aquellos taxones en los que las cadenas de conidios se originaban en el *capitulum* (cabeza). Se le considera el autor que validó el género, describiendo 6 especies, entre ellas algunas de las más conocidas del género como *A. flavus*, *A. candidus* o *A. glaucus*.

En 1926, Thom y Church publicaron el primer tratado en inglés sobre taxonomía del género *Aspergillus*: *The Aspergilli* (1). En él se redujeron las especies descritas hasta la fecha de 350 a 69, y las distribuyeron en 11 grupos según criterios morfológicos.

Años más tarde, en 1945, Thom y Raper revisaron el género y publicaron *A manual of the Aspergilli* (2), donde describían 80 especies y 10 variedades, divididas en 14 grupos. En este tratado, al igual que hicieron Thom y Church, el nombre genérico de *Aspergillus* se aplicó a todas las especies, presentaran éstas o no su forma teleomorfa (sexual). Benjamin en 1955 comparó las formas teleomorfas del género y las dividió en 3 series relacionadas con los grupos descritos por Thom y Raper; considerando que debían poseer el rango de género denominó a las series de la siguiente forma: *Eurotium* para el grupo *A. glaucus*, *Emericella* para el grupo *A. nidulans* y *Sartorya* para la serie *A. fischerianus* del grupo *A. fumigatus* (3).

The Genus Aspergillus (4), la tercera gran revisión del género, fue realizada por Raper y Fenell (1965). Dividieron al género en 18 grupos que agrupaban a 132 especies. No reconocieron la división genérica realizada por Benjamin, con lo que las formas teleomorfas descritas están incluidas en el género *Aspergillus*. Su clasificación, si bien con amplias modificaciones, aún es utilizada hoy en día.

Para concluir, Samson *et al.* realizaron en 1979 un compendio de las nuevas especies descritas desde la publicación del manual de Raper y Fennell (1965) (5), que ha sido recientemente actualizada (6) llegando a contar con más de 300 especies diferentes.

Clasificación taxonómica

Aspergillus es un hongo que se incluye dentro de la familia *Trichocomaceae*, del orden de los *Eurotiales* y perteneciente al *phylum Ascomycota* (7).

La clasificación de las especies de este género se ha basado tradicionalmente en características morfológicas. Basándose en estas características, Raper y Fennell en 1965 (4) dividieron el género *Aspergillus* en 18 grupos. En 1985 Gams *et al.* (8) decidieron dividir el género en subgéneros y secciones, correspondiendo en gran medida con las filogenias actuales publicadas. Peterson en 2008, aceptó 5 subgéneros y 16 secciones en *Aspergillus* (7).

Más recientemente, se han llevado a cabo estudios de análisis filogenético (7,9) para establecer la relación entre los diferentes *Aspergilli*, mostrando que los grupos basados en los fenotipos de Raper y Fennell se corresponden en gran parte con las clasificaciones vigentes. La clasificación actual consta de 4 subgéneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* y *Nidulantes*) y 20 secciones (10) (tabla 1).

Desde 1950, el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (que rige la denominación de plantas y hongos) ha permitido que dos nombres diferentes se apliquen al mismo organismo, dependiendo de si se ve en su estado sexual (teleomorfo) o asexual (anamorfo). Dentro del género *Aspergillus* existe este pleomorfismo, de manera que algunas especies producen regularmente esporas sexuales y asexuales; en otras especies la forma sexual es rara y para otras, las esporas sexuales nunca han sido vistas. Como consecuencia, la nomenclatura dual ha sido aplicada tradicionalmente a las especies de este género: con la denominación de *Aspergillus* para referirse al estado anamorfo y otras 9 opciones para estados teleomorfos (tabla 1).

Sin embargo, en el año 2011 se estableció en el Congreso Internacional de Botánica el concepto "un hongo, un nombre", que quedó recogido en el nuevo "Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Hongos y Plantas" (Código Melbourne). Este nuevo código supuso un cambio dramático que resultó en la transición a un nombre por especie (11). En cuanto a *Aspergillus*, el uso de nombres teleomorfos fue abandonado. Uno de los principales cambios en comparación con el código anterior es que el concepto de nomenclatura dual se suprime; dando a nombres anamorfos la misma prioridad que los nombres teleomorfos (12). Si el estado anamorfo representa el nombre válido y legítimo más antiguo, y es el más utilizado y preferido, entonces este nombre puede

aplicarse a todos los estados (12). A este respecto, *Aspergillus* tendría prioridad sobre los nombres correspondientes a estados teleomorfos como, por ejemplo, *Neosartorya*, *Emericella* y *Eurotium*.

Samson *et al.* han publicado una lista actualizada de las especies para el género *Aspergillus*, que actualmente consta de 339 (6). La distribución en subgéneros y secciones de las 339 especies actualmente válidas del género *Aspergillus* se ilustran en la figura 1.

Tabla 1. Clasificación por subgéneros y secciones de *Aspergillus*. Adaptado de: Jos Houbraken *et al.* (10). Las forma teleomorfas asociadas a cada sección están mencionadas entre paréntesis.

Subgénero	Sección
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> (<i>Eurotium</i>)
	<i>Restricti</i> (<i>Eurotium</i>)
<i>Circumdati</i>	<i>Candidi</i>
	<i>Circumdati</i> (<i>Neopetromyces</i>)
	<i>Cremeri</i> (<i>Chaetosartorya</i>)
	<i>Flavi</i> (<i>Petromyces</i>)
	<i>Nigri</i>
	<i>Sparsi</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Cervini</i>
	<i>Clavati</i> (<i>Neocarpenteles</i> , <i>Dichotomomyces</i>)
	<i>Fumigati</i> (<i>Neosartorya</i>)
<i>Nidulantes</i>	<i>Aeni</i> (<i>Emericella</i>)
	<i>Flavipedes</i> (<i>Fennellia</i>)
	<i>Jani</i>
	<i>Nidulantes</i> (<i>Emericella</i>)
	<i>Ochraceorosei</i>
	<i>Terrei</i>
	<i>Usti</i> (<i>Emericella</i>)
	<i>Versicolores</i>

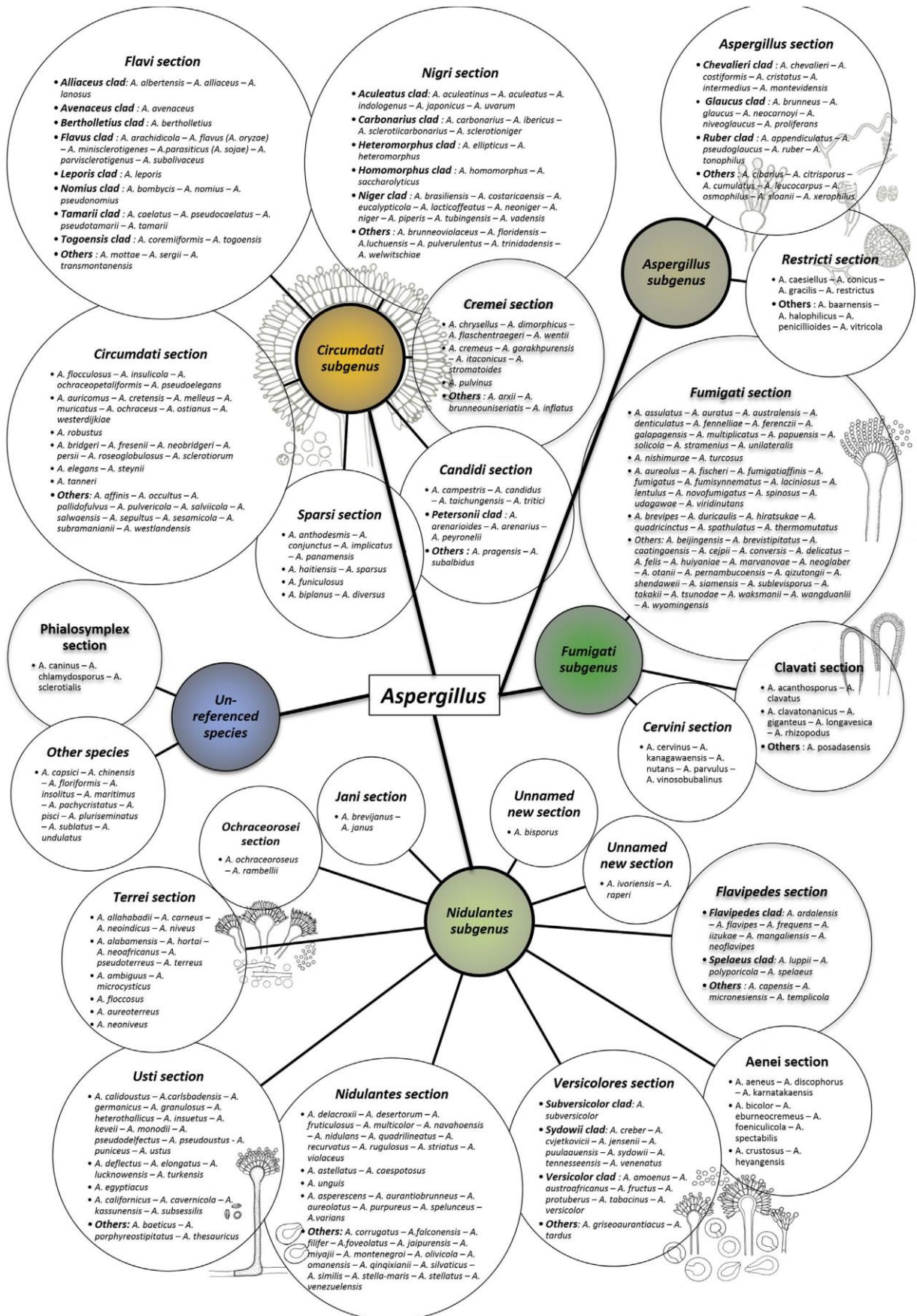


Figura 1. Clasificación por subgéneros y secciones de las 339 especies actualmente válidas del género *Aspergillus*. Adaptado de: Gautier *et al.* (13).

Identificación

La identificación convencional de hongos filamentosos en el laboratorio clínico se ha basado en criterios morfológicos macroscópicos y microscópicos (14). En la actualidad, el uso de técnicas moleculares (6) ha completado esta identificación y ha incrementado el número de especies conocidas, cambiando en gran medida la taxonomía del género *Aspergillus*.

Desde principios del año 2000, la identificación por secuenciación de ADN (ácido desoxirribonucleico) de cepas de *Aspergillus* puso de manifiesto la caracterización errónea de las denominadas especies "crípticas" en la literatura clínica (15,16). Bajo la denominación de especies crípticas se incluyen aquellas que son morfológicamente indistinguibles y, que sólo se pueden diferenciar por métodos moleculares. Debido a sus inusuales fenotipos de escasa esporulación y de resistencia a fármacos antifúngicos, especies anteriormente identificadas como *A. fumigatus* fueron reidentificadas mediante secuenciación, lo que permitió la caracterización de especies crípticas, como *A. lentulus* (17) y *Neosartorya pseudofischeri* (15), actualmente conocida como *A. thermomutatus* siguiendo la iniciativa "un hongo, un nombre" (11), pertenecientes a la sección *Fumigati*.

En la actualidad, una reciente revisión ha determinado el aumento exponencial de especies crípticas de *Aspergillus* descritas (18). Sin embargo, en estas investigaciones destaca que el contexto clínico en el que fueron aisladas estas nuevas especies fue detallado en un número muy limitado de los casos y, que los datos referentes al resultado del tratamiento antifúngico fueron aún más escasos.

Por todo lo anterior, se establece que el método convencional de identificación en el laboratorio clínico, basado en el estudio morfológico de la cepa, permite la identificación exacta de *Aspergillus* a nivel de sección o complejo, pero no a nivel de especie.

1. Identificación fenotípica

Se lleva a cabo mediante la observación de las características macroscópicas y microscópicas de las colonias, que quedan reflejadas en la tabla 2.

A nivel microscópico, *Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios (figura 2).

Tabla 2. Características morfológicas para la identificación fenotípica de *Aspergillus* spp. Adaptado de: Abarca *et al.* (19)

Principales características macroscópicas:	
Diámetro de las colonias	
Coloración del anverso y del reverso de las colonias	
Presencia de esclerocios	
Presencia de gotas de exudado	
Presencia de pigmento difusible	
Textura de las colonias	
Principales características microscópicas:	
Disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula	
Longitud y anchura de los estipes	
Forma y diámetro de las vesículas	
Longitud y anchura de las métulas y fiálides	
Forma, diámetro, ornamentación y color de los conidios	
Forma, tamaño y color de las células de Hülle	
Forma, tamaño y color de las ascosporas	

El conidióforo característico de *Aspergillus* (figura 2), aunque es una estructura unicelular está formado por tres partes bien diferenciadas:

- Vesícula: extremo apical hinchado
- Estipe: sección cilíndrica situada debajo de la vesícula
- Célula pie: sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio.

Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas. Los conidios se originan a partir de las fiálides y aparecen unidos formando cadenas.

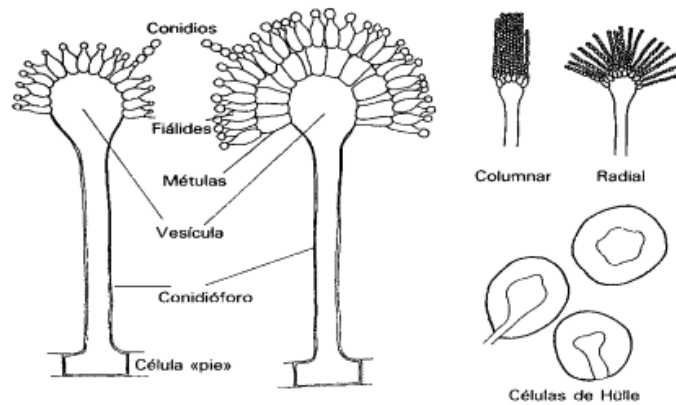


Figura 2. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*. Adaptado de: Minter *et al.* (20)

Dichas estructuras microscópicas se observan mediante el uso de la tinción de azul algodón de lactofenol. Esta tinción no se considera una tinción diferencial, sin embargo, posee características tintoriales que permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación.

El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula e impide que ésta se rompa; de igual forma, destruye la flora acompañante e inactiva a la célula, quitándole el grado de patogenicidad; además, actúa como mordiente cuando se usa en combinación con colorantes. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación.

2. Identificación molecular

A pesar de que la amplificación y secuenciación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosómico se considera el marcador universal para la identificación de los hongos (21) y su uso se recomienda siempre que se describan nuevas especies, su utilidad a la hora de identificar especies estrechamente relacionadas dentro del género *Aspergillus* es limitada, ya que la región no es lo suficientemente polimórfica. Por ello, son necesarios marcadores secundarios que al igual que el ITS, deben hacer uso de cebadores universales, ser fáciles de amplificar y en contraste con el ITS, deben ser capaces de distinguir entre todas las especies.

Basándose en estos criterios, existen tres opciones: calmodulina (*CaM*), β -tubulina (*BenA*) o la segunda subunidad de la ARN polimerasa II (*RPB2*). *RPB2* no es fácil de amplificar, haciendo su uso como marcador de identificación secundario

no adecuado. Por el contrario, *BenA* es fácil de amplificar, pero se ha informado que varía en el número de intrones y la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a veces resulta en la amplificación de genes paralogos, como el *tubC* en algunos taxones de la sección *Nigri* (9,22). Por otro lado, *CaM* es fácil de amplificar y distingue entre todos los *Aspergilli* (excepto *A. elegans* y *A. steynii*, donde ITS sí distingue entre ellos) (23). Sin embargo, la base de datos de la secuencia *CaM* es a día de hoy menos completa que la de *BenA* para las especies aceptadas, de ahí que la inmensa mayoría de los estudios publicados utilicen como principal marcador de identificación la *BenA*, solo o asociado a *CaM* (24–28).

Ahora bien, estas técnicas de biología molecular son costosas, requieren de personal cualificado y no son rápidas, lo que puede llevar a demorar en el tiempo el resultado definitivo de la identificación de la especie. Por ello, es necesaria la aplicación de nuevas técnicas que permitan una rápida y correcta identificación de las especies de *Aspergillus*.

Importancia del género

Las especies del género *Aspergillus* se consideran ubicuas, sus esporas están ampliamente distribuidas en el medio ambiente; las corrientes de aire las dispersan a cortas y largas distancias y si las condiciones de nutrientes y de agua son adecuadas, tanto en superficie sólida como líquida, éstas pueden germinar (29).

La importancia de este género es notable para el ser humano. Algunas especies se han utilizado desde la antigüedad para la producción de sustancias como aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y metabolitos secundarios.

Aspergillus niger es la principal especie utilizada para la producción de ácidos orgánicos, básicamente de ácido cítrico y ácido glucónico (30,31). El uso de *A. niger* en la producción de ácido cítrico es anterior a Curie (1917); siendo actualmente uno de los principales aditivos en la industria alimentaria, utilizándose entre otros productos en refrescos, zumos de frutas, mermeladas, caramelos y vino. También se ha usado en la industria farmacéutica y cosmética, como acidulante y ayudando en la disolución de ingredientes activos. Otras aplicaciones incluyen su uso como endurecedor en adhesivos y para retrasar la fijación del hormigón (32). La producción de ácido cítrico anual se estima en 1.6 billones de Kg (33). Respecto al ácido glucónico, se usa como aditivo para la limpieza de ciertos metales, así como en el tratamiento de las deficiencias de calcio y hierro.

En la producción industrial de enzimas, *A. niger* también ha sido utilizado como productor de catalasa (34). Otra especie con especial importancia dentro del

género es *A. oryzae*, que ha sido empleada, entre otras aplicaciones, para la producción de α -amilasa, una enzima de amplio uso en la industria panadera (34). En Asia, y en menor medida en países de África y América del Sur, se utiliza desde hace casi 2000 años como fermento natural en la producción de alimentos tradicionales, principalmente el koji, una masa elaborada a partir de cereales y legumbres fermentadas que constituye la base del miso, la salsa de soja o el sake (35). Los productos obtenidos de ambas especies, *A. niger* y *A. oryzae*, poseen la Categoría General de Alimentos Seguros (GRAS, *Generally Recognized as Safe*) de la Agencia Estadounidense de Alimentación y Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*).

Actualmente se están valorando nuevos y más extensos usos de estas enzimas fúngicas en el campo de la biotecnología, ya que expertos en energías “verdes” recomiendan su utilización para la transformación de la biomasa. Teóricamente la biomasa vegetal podría reemplazar a la industria petroquímica en ciertos procesos químicos. Los hongos filamentosos producen numerosas enzimas que pueden transformar polímeros complejos en azúcares, lípidos y otras moléculas simples, que pueden ser usadas como combustibles y en reacciones de síntesis química. Hasta la fecha, aunque la mayoría de los estudios se han centrado en el género *Trichoderma*, el género *Aspergillus* tiene un enorme potencial en el desarrollo de nuevas enzimas que puedan ser usadas para estos fines (36).

Respecto a los metabolitos secundarios del género *Aspergillus*, destacan las estatinas y sus derivados. Las estatinas representan un grupo de fármacos que reducen los niveles de colesterol, cuyo uso está ampliamente difundido en la medicina moderna. La primera estatina, mevastatina, se obtuvo a partir de *Penicillium citrinum* y fue descubierta por Endo *et al.* en 1976 (37). Un grupo de científicos del laboratorio farmacéutico Merck en Estados Unidos, desarrolló la primera estatina para uso humano: lovastatina, a partir de un metabolito secundario de un cultivo de *A. terreus* (38). Otros derivados con actividades farmacológicas incluyen colecistoquinina y antagonistas de neuroquininas, ligandos de canales iónicos y fármacos antifúngicos.

Sin embargo, es por su capacidad de producir diversas enfermedades de distribución universal en el ser humano y animales, por lo que su estudio y conocimiento en los últimos años ha aumentado en gran medida.

Aspergillus y enfermedad animal

Las esporas aerosolizadas de *Aspergillus* están ampliamente distribuidas en el medio ambiente, por lo que continuamente estamos en contacto con ellas. Son las unidades infectantes o sensibilizantes, y su penetración en el organismo puede

ocurrir por muchas vías, siendo la respiratoria, con diferencia, la más importante. Esta exposición es parte normal de la condición humana y generalmente no provoca efectos adversos sobre la salud, desempeñando un papel decisivo en ello los macrófagos alveolares.

Sin embargo, las especies de *Aspergillus* pueden y causan enfermedad animal, agrupándose bajo el término de aspergilosis (39). Al usar este término nos referimos a todas las infecciones causadas por *Aspergillus*, incluyendo tanto enfermedades veterinarias como humanas, y de un rango que va desde males menores y localizados a aquellos que son sistémicos y ponen en riesgo la vida del paciente.

Casos de aspergilosis han sido descritos en todas las especies de animales domésticos y numerosas especies salvajes. Los pájaros muestran una sensibilidad particularmente elevada; de hecho, la aspergilosis fue reconocida inicialmente como una enfermedad aviar: la primera descripción de una patología provocada por *Aspergillus* la hacen Meyer y Emmert en 1815, que descubrieron la enfermedad pulmonar en el grajo (*Corvus frugilegus*). Posteriormente, en 1847 Sluyter publica la primera descripción de neumomicosis humana causada por *Aspergillus*, y tres años más tarde, Fresenius cultiva el hongo a partir de las lesiones del tracto respiratorio en pájaros y denomina a la especie aislada *Aspergillus fumigatus*, introduciendo además el término de aspergilosis.

El desarrollo de una aspergilosis puede tener lugar de tres maneras posibles: a través de la producción de micotoxinas, a través de la inducción de respuestas alérgicas y a través de infecciones localizadas o sistémicas (39). En los dos últimos casos el estado inmune del hospedador es primordial. Las alergias y el asma se cree que son debidas a una respuesta inmune activa del hospedador contra la presencia de esporas o hifas fúngicas. En contraste, en la aspergilosis invasora, el sistema inmune está colapsado, con pocas defensas o ninguna. Por lo tanto, la gravedad de la aspergilosis depende de varios factores, aunque uno de los más determinantes es el estado del sistema inmune del enfermo (40,41) (tabla 3). Así, las especies de *Aspergillus* se comportan como patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos como son los pacientes VIH, los transplantados y los oncológicos, entre otros.

Tabla 3. Factores de riesgo para el desarrollo de micosis oportunistas. Adaptado de: Curbelo *et al.* (41)

Factores de riesgo para el desarrollo de micosis oportunistas
Disrupción de las barreras naturales: mucositis, vías venosas, heridas quirúrgicas, intubación
Neutropenia prolongada
Neoplasias hematológicas, asociadas o no a trasplante de precursores hematopoyéticos o enfermedad injerto contra huésped
Neoplasias malignas sólidas diseminadas
Trasplantes de órganos sólidos
Infección por VIH, especialmente con recuento de linfocitos CD4 menor de 200 células/mm ³
Neumopatías crónicas
Conectivopatías
Fármacos inmunosupresores: principalmente los corticoides. Otros inmunosupresores son los fármacos anti-TNF α y el alemtuzumab

En la actualidad se conocen más de 300 especies de *Aspergillus*, de las cuales sólo un pequeño número son causantes de infecciones oportunistas. La especie que con mayor frecuencia causa aspergilosis es *A. fumigatus*, la cual es responsable aproximadamente del 90% de las infecciones por este género (42). Otras especies, como *A. flavus*, *A. nidulans* y *A. terreus* se aíslan cada vez con más frecuencia, dependiendo de factores geográficos, tipo de huésped o prescripción de antifúngicos, viéndose aumentado su papel como agentes etiológicos (43).

Micotoxinas:

En agricultura, los *Aspergillus* se han considerado durante mucho tiempo como un serio problema por su prevalencia en la biodegradación de alimentos almacenados, particularmente bajo altas condiciones de humedad (44).

A comienzos de la década de los 60, el descubrimiento de las aflatoxinas asociadas con las muertes masivas en todo el mundo de aves de corral, truchas y otras especies de animales domesticados, aumentaron la conciencia de que estos hongos planteaban amenazas para los alimentos y, por tanto, para los seres humanos.

Las aflatoxinas son consideradas las micotoxinas más importantes. Son producidas por algunas especies de *Aspergillus*, de las cuales *A. flavus* y *A. parasiticus* son las más importantes. La ingestión de aflatoxinas puede producir una enfermedad conocida como aflatoxicosis. El principal órgano diana en

mamíferos es el hígado, así que la aflatoxicosis es una enfermedad hepática principalmente. Las condiciones que aumentan la probabilidad de aflatoxicosis en el ser humano incluyen la disponibilidad limitada a alimentos, las condiciones ambientales que favorezcan el crecimiento de hongos en alimentos, y la pérdida de los sistemas de regulación para la monitorización y control de aflatoxinas (45,46).

Los alimentos más susceptibles a la contaminación fúngica y consecuente producción de aflatoxinas son los granos y cereales (maní, maíz, trigo, cebada, avena, sorgo, arroz, almendra, frijoles, semillas oleaginosas de algodón, girasol, soja), frutos secos, frutas deshidratadas, leche y productos lácteos, hierbas, especias, café, cacao, piensos, aceites vegetales y cerveza, entre otros. Las aflatoxinas presentes en los piensos son ingeridas por los animales y se excretan en la leche o aparecen como residuo en carnes y huevos (47). Una característica de estos metabolitos es que no pierden su toxicidad ni por tratamiento térmico ni por la acción de las enzimas del aparato digestivo, siendo consideradas por esto de mayor acción tóxica que las bacteriotoxinas.

El ser humano se intoxica al ingerir estos alimentos contaminados; de hecho se han descrito casos de aflatoxicosis aguda en humanos en varios países como India y Tailandia. Los síntomas de aflatoxicosis severa incluyen edema, necrosis hemorrágica del hígado y letargia profunda (45). Además, las aflatoxinas son potentes carcinógenos, especialmente la aflatoxina B1. En 1988 la OMS (Organización Mundial de la Salud) situó a la aflatoxina B1 en la lista de carcinógenos humanos. En los países desarrollados, el énfasis en mantener la aflatoxina fuera de la cadena alimentaria se debe a su potencial carcinogénico y para ello, se han establecido fuertes límites regulatorios para muchos productos básicos.

Alergias y asma:

La atopia es una predisposición genética para desarrollar ciertas reacciones de hipersensibilidad tales como el asma, fiebre de heno (rinitis alérgica) y alergias alimentarias. Las reacciones alérgicas frente *Aspergillus* en individuos atópicos pueden ser causadas por esporas fúngicas presentes en el aire o por la ingesta de hongos en los alimentos. Los hongos filamentosos están involucrados en la iniciación y exacerbación de enfermedades del tracto respiratorio inferior, tales como asma, aunque la etiología es poco conocida (48).

El nivel de inhalación de esporas varía enormemente con las condiciones medioambientales locales. En ciertos ambientes como los graneros, existen altas concentraciones de esporas. La masiva exposición, incluso en individuos no alérgicos o asmáticos, debe evitarse porque el contacto repetido con grandes cantidades de esporas de hongos puede inducir alveolitis alérgica, en la que puede

ocurrir una reacción de hipersensibilidad linfocítica. Las micosis ocupacionales son formas de alveolitis extrínseca alérgica. Son reacciones inflamatorias causadas por la respiración de altas concentraciones de esporas y otras materias orgánicas antigénicas. Algunas formas de estas enfermedades humanas han sido asociadas con la exposición a altas concentraciones de esporas de *Aspergillus*, incluyendo el pulmón del granjero, el pulmón del trabajador de la malta, el pulmón del compost y el pulmón del aficionado a las aves. El pulmón del trabajador de la malta, uno de los mejor conocidos, es una micosis ocupacional producida durante la manufactura de la cerveza y relacionada con la inhalación de elevadas concentraciones de esporas de *A. clavatus* y *A. fumigatus* procedente de la cebada contaminada.

Infecciones:

El espectro de la aspergilosis abarca una amplia gama de entidades clínicas, desde formas no invasoras, como la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) y la aspergilosis pulmonar crónica, a la aspergilosis pulmonar invasora (API) con posible diseminación generalizada.

Las vías aéreas superiores, la tráquea, los bronquios, el parénquima pulmonar y las estructuras contiguas son las más frecuentemente involucradas; sin embargo, la aspergilosis puede desarrollarse en cualquier sistema orgánico, siendo la enfermedad diseminada particularmente común entre los pacientes con granulocitopenia prolongada. La presentación clínica de la aspergilosis es diversa y depende tanto del sitio de la infección como de la capacidad del huésped para generar una respuesta inmune robusta y coordinada. Los síndromes clínicos pueden clasificarse en manifestaciones alérgicas de aspergilosis, infecciones saprofitas o colonizaciones no invasivas, y enfermedad invasora (tabla 4) (43).

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento de la aspergilosis invasora (AI), las tasas de mortalidad siguen siendo altas, especialmente en el huésped inmunodeprimido. Durante el último decenio, la resistencia a los antifúngicos triazoles (49) ha surgido en algunas regiones del mundo y, es particularmente preocupante para el tratamiento de las infecciones por *Aspergillus* debido a las limitadas opciones terapéuticas que existen y a la posibilidad de que esto podría conducir al fracaso de la profilaxis en los pacientes inmunodeprimidos. Además, las especies crípticas de *Aspergillus* se han vuelto cada vez más importantes debido a las sensibilidades antimicóticas disminuidas que presentan, a la dificultad de diferenciarlas basándonos sólo en la apariencia fenotípica (criterios morfológicos) y a los inciertos resultados clínicos y desafíos terapéuticos que representan (50).

Para superar estos retos, han surgido nuevos métodos de diagnóstico y fármacos antifúngicos en un intento por reducir aún más la mortalidad de la API.

Introducción

Estos nuevos agentes poseen ventajas potenciales en comparación con los fármacos ya existentes, tales como biodisponibilidad (comprimidos de posaconazol) y toxicidad reducida (isavuconazol). Estas nuevas incorporaciones al arsenal terapéutico, han sido bien recibidas y ofrecen a los clínicos opciones adicionales durante el tratamiento.

Tabla 4. Formas clínicas de aspergilosis. Adaptado de: Gavaldá *et al.* (51)

Aspergilosis respiratorias de causa inmunoalérgica
Asma aspergilar
Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)
Broncoalveolitis alérgicas extrínsecas
Aspergilosis de colonización
Aspergiloma
Aspergilosis del conducto auditivo externo y de los senos
Aspergilosis invasora
Aspergilosis pulmonar invasora aguda
Neumonía crónica necrotizante
Traqueobronquitis aspergilar
Sinusitis aspergilar invasora
Aspergilosis cerebral
Aspergilosis cutánea
Otras formas clínicas
Infección nosocomial epidémica por <i>Aspergillus</i>

Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas (EM) es probablemente de entre todas las técnicas analíticas, la de aplicación más general ya que es capaz de suministrar información sobre la composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas, permite elucidar las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares, conocer las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras, así como la estructura y composición de superficies sólidas.

En 1975 se propone por primera vez su uso para la identificación de bacterias, aunque no era posible analizar proteínas intactas porque se fragmentaban durante el proceso (52). La tecnología para el análisis de macromoléculas intactas se desarrolló en la década de los 80, permitiendo el análisis de proteínas. Koichi Tanaka describe en 1985 un método “suave” de desorción-ionización utilizando polvo de metal ultrafino y glicerol, que permitió el análisis por espectrometría de masas de macromoléculas biológicas, por lo que recibió el Premio Nobel de Química en 2002 (53). Años más tarde, Franz Hillenkamp y Michael Karas describieron un proceso suave de desorción-ionización usando una matriz orgánica (54), acuñando el término de **MALDI**: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz).

Desde entonces se han producido enormes avances en la tecnología del propio equipo instrumental, así como en las aplicaciones informáticas y en el desarrollo de bases de datos completas y validadas, que representan diversas especies de bacterias y hongos. Esto ha permitido la automatización de la EM MALDI y su incorporación como herramienta de identificación en los laboratorios de Microbiología Clínica.

Fundamento teórico

La EM está basada en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

Los fundamentos de las medidas espectrales de masas son sencillos y comprensibles, pero esta simplicidad no corresponde a la instrumentación. En la figura 3 se detallan los componentes principales de los espectrómetros de masas, que son:

1. **Sistema de entrada:** permite introducir una pequeña cantidad de muestra en el espectrómetro de masas, donde sus componentes se convierten en iones gaseosos.
2. **Fuente de iones:** convierte los componentes de una muestra en iones por bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones. Alternativamente, la ionización se puede llevar a cabo con energía térmica o eléctrica. Se obtiene un haz de iones positivos (en algunos casos negativos), el cual es entonces acelerado en el analizador de masas.
3. **Analizador de masas:** utiliza un campo eléctrico para acelerar los iones producidos y separarlos en función de su relación masa/carga.
4. **Detector:** convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser entonces procesada, almacenada en la memoria de un ordenador y mostrada o registrada de varias maneras.

Para que los procesos que tienen lugar en el interior del espectrómetro puedan llevarse a cabo con éxito, se necesita en el interior de este equipo un ambiente de alto vacío (10^{-4} a 10^{-8} torr), de manera que el recorrido libre medio de los iones formados, sin colisiones en su camino, sea acorde con la longitud de la trayectoria que deben recorrer hasta el detector.

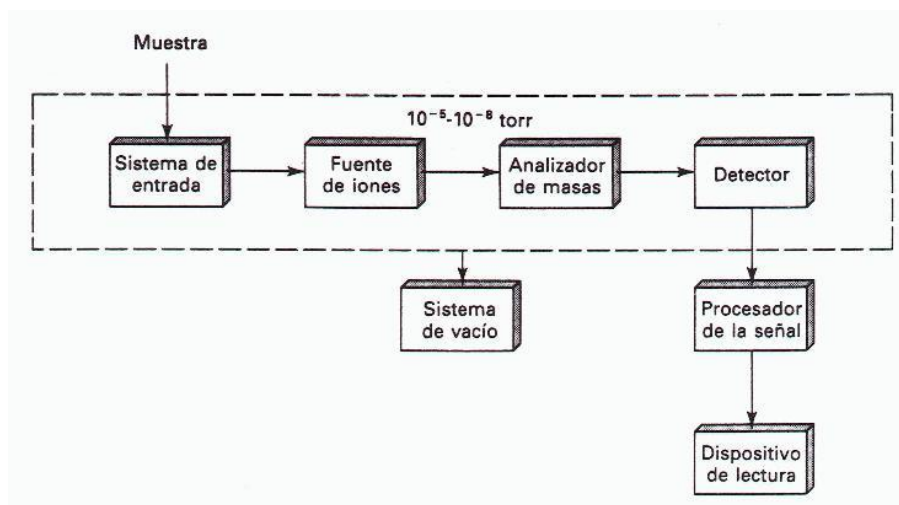


Figura 3. Componentes de un espectrómetro de masas. Adaptado de: Skoog *et al.* (55)

El resultado es un espectro de masas (figura 4). La relación masa/carga (m/z) de un ión atómico o molecular se obtiene dividiendo la masa atómica o molecular de un ión (m) por el número de cargas (z) que tiene el ión. Debido a que la mayoría de los iones en EM tienen una carga unidad, el término masa/carga se reduce al término masa. Los pesos atómicos y moleculares se expresan generalmente en términos de unidades de masa atómica-*uma* (también llamado *dalton*), que se define como $1/12$ de la masa de un átomo neutro de ^{12}C . En el

gráfico se representan los fragmentos obtenidos por orden creciente de masas en el eje de abscisas y en ordenadas su abundancia relativa. Este perfil generado es específico de cada compuesto, permitiendo de este modo la identificación del mismo mediante comparación con los perfiles registrados en una base de datos.

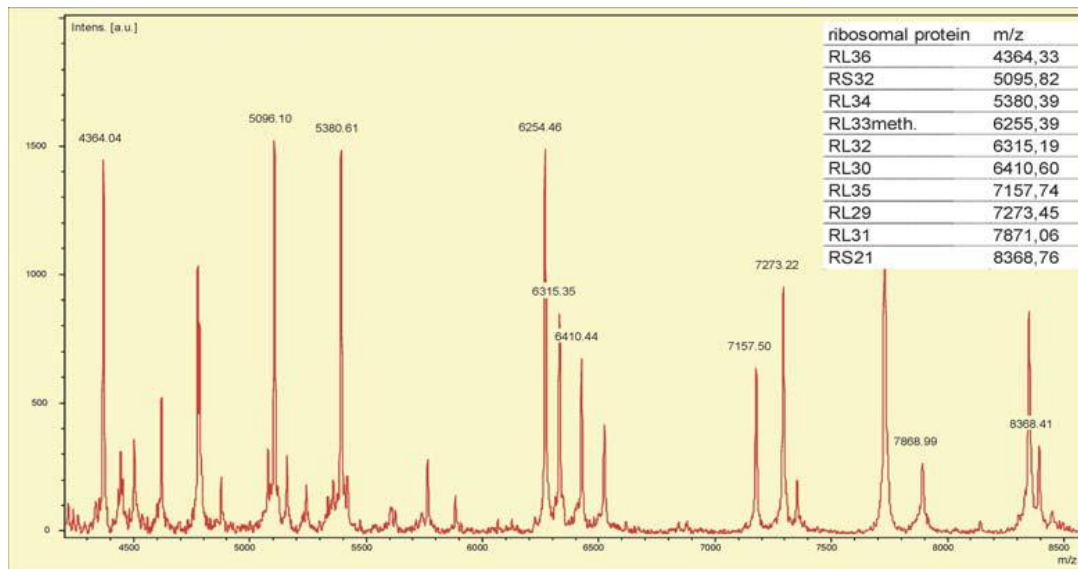


Figura 4. Espectro de masas. Adaptado de: Manual de usuario de Bruker Daltonics.

Procedimiento experimental

En nuestro caso, trabajamos con un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Se trata de una técnica de EM de ionización suave, que permite detectar moléculas termolábiles (como son las proteínas) de forma intacta.

Se denomina **MALDI** por sus siglas en inglés: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz). Hace referencia al tipo de fuente de ionización. Se trata de un láser, un tipo de fuente que aplica energía a la muestra sólida en nuestro caso, produciendo la ionización y la transferencia directa de iones de la fase condensada al estado gaseoso, permitiendo el examen de moléculas no volátiles y térmicamente inestables. Al tratarse de una fuente de ionización blanda, la excitación de los iones es relativamente baja, por lo que tiene lugar poca fragmentación de la muestra y los espectros son sencillos.

Durante este proceso de ionización, se utiliza una disolución “matriz” constituida principalmente por un ácido orgánico (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico). Esta matriz funciona como un transmisor, transfiriendo la energía necesaria para la desorción/ionización, del láser a las moléculas de la muestra. La matriz elegida forma una mezcla con la muestra que cristaliza de forma homogénea, garantizando una resolución óptima del espectro. Además,

protege a la muestra de un exceso de energía proporcionada por el láser, que podría destruirla.

Las siglas **TOF** hacen referencia al analizador de masas y su nombre procede de sus siglas en inglés *Time Of Flight* (Tiempo de Vuelo). En este analizador los iones son acelerados al pasar por el tubo analizador sobre el que no actúa ningún campo. Debido a que todos los iones que entran en el tubo tienen idealmente la misma energía cinética, sus velocidades en el tubo deberán variar de modo inverso a sus masas y, por tanto, las partículas ligeras llegarán antes al detector que las pesadas.

El sistema detector que utiliza el MALDI-TOF es una variante del multiplicador de electrones, conocido como placa de microcanales (MCP, *multi channel plate*) (figura 5). Este detector consiste en un núcleo sólido de poros con millones de pequeños orificios (microcanales), que están revestidos interiormente con una capa semiconductor. Cada orificio funciona como un multiplicador de electrones, independiente de los adyacentes, sobre el que se establece una diferencia de potencial que acelera a los electrones que se van generando en “ráfaga” a medida que atraviesan el microcanal. Para obtener un rendimiento máximo de electrones, todos estos canales están conectados eléctricamente en paralelo.

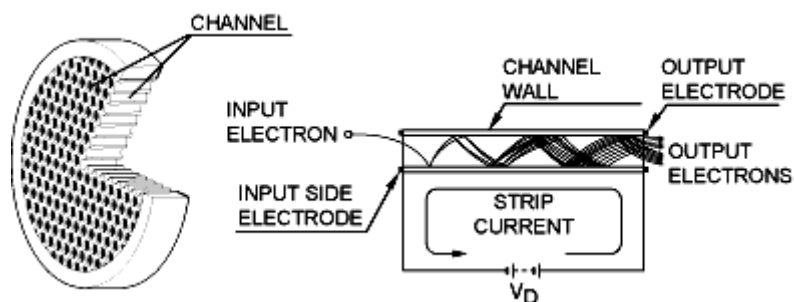


Figura 5. Principio de funcionamiento de un microcanal.

Durante el proceso de preparación de la muestra, se produce la ruptura de la pared celular y se liberan las proteínas contenidas en el citoplasma. La muestra se mezcla con la disolución de un ácido orgánico (matriz), cristalizando sobre la superficie de una placa de acero. Dicha placa se introduce en el espectrómetro de masas MALDI-TOF y se irradia con el láser en condiciones de alto vacío. La matriz absorbe esta energía y la transfiere a la muestra, provocando su ionización (las proteínas quedan cargadas eléctricamente). El área irradiada de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción (paso de sólido a gas) de las moléculas ionizadas. Las proteínas se liberan en forma ionizada desde la superficie de la placa, quedando por encima de la misma en forma de nube (figura 6).

Un campo eléctrico acelera las proteínas ionizadas, en condiciones de vacío, que “vuelan” hacia el detector. Las proteínas más pequeñas son aceleradas a mayor velocidad que las más pesadas, siendo el “tiempo de vuelo” proporcional a su masa. Por último, en el detector se genera el perfil o huella química específica de esa muestra.

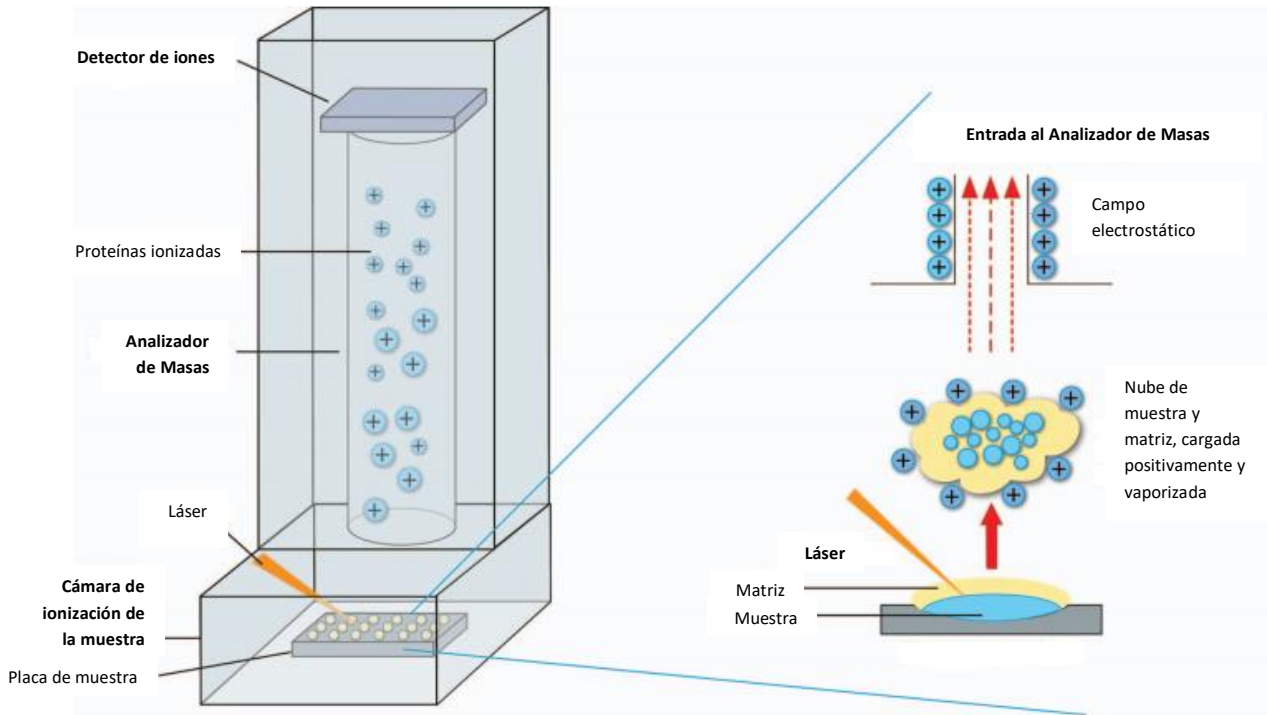


Figura 6. Proceso de análisis de un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Adaptado de: Patel *et al.* (56)

Sensibilidad a los antifúngicos

El término antifúngico o antimicótico incluye aquellas sustancias que pueden producir modificaciones en las estructuras básicas de la célula fúngica, inhibiendo su desarrollo o alterando su viabilidad y produciendo las mínimas alteraciones posibles en las células del hospedador (57).

La similitud de las dianas de algunos antifúngicos con estructuras o rutas metabólicas de las células humanas determina el menor número de estos fármacos en comparación con los agentes antibacterianos existentes, así como la posibilidad de aparición de efectos secundarios y/o tóxicos (58). La membrana celular de los hongos está situada en la parte interna de la pared y tiene una estructura parecida a la membrana de las células animales, de la que se diferencia por la presencia de ergosterol en lugar de colesterol.

Los fármacos antifúngicos se clasifican basándose en su estructura química, su origen (natural o de síntesis química), su espectro y su mecanismo de acción (59).

El estudio de la sensibilidad antifúngica *in vitro* juega un papel creciente en la selección de los agentes antifúngicos, como ayuda en estudios de desarrollo de nuevos fármacos y como vigilancia de las resistencias a los antifúngicos en estudios epidemiológicos (60). En el caso concreto de la infección por *Aspergillus* spp., el estudio de sensibilidad antifúngica no está recomendado de forma rutinaria, debiéndose realizar tan sólo cuando el hongo se aísla en localizaciones profundas, cuando hay un fracaso terapéutico, cuando participan especies raras y/o emergentes o cuando se sabe que la especie es resistente o menos sensible a un agente antifúngico (61,62).

En la guía IDSA (*Infectious Diseases Society of America*-Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas) del año 2016 sobre el diagnóstico y manejo de la aspergilosis (63) son tres los grupos de antifúngicos disponibles, con distinto grado de recomendación y evidencia, que han demostrado su eficacia para el tratamiento y prevención de las diferentes formas clínicas:

- ❖ Anfotericina B
- ❖ Triazoles: voriconazol, posaconazol, isavuconazol.
- ❖ Equinocandinas: caspofungina, micafungina.

Polienos

Los polienos son sustancias antibióticas sintetizadas por actinomicetos del género *Streptomyces*, y tienen probablemente el mayor espectro de actividad

antifúngica de los fármacos disponibles. Se conocen más de 100 compuestos distintos, cuyas características son: escasa biodisponibilidad digestiva, baja solubilidad en agua y elevada toxicidad.

De todos ellos, el más importante es la anfotericina B (figura 7), que se obtuvo a partir de *Streptomyces nodosus* y fue comercializada en 1957. A pesar de su toxicidad y escasa solubilidad, se convirtió en el tratamiento de referencia de las infecciones fúngicas sistémicas (64). Para superar sus limitaciones se desarrollaron formulaciones lipídicas, que reducían la toxicidad y permitían aumentar la dosis del antifúngico, y que son: anfotericina B liposomal, anfotericina B en complejo lipídico y anfotericina B en dispersión coloidal; todas ellas de administración intravenosa.

La actividad antifúngica de los polienos se basa en su capacidad para unirse a los esteroides (ergosterol, colesterol...) de las membranas celulares, aunque afortunadamente muestran mayor especificidad por el ergosterol de la célula fúngica. Esta unión provoca la formación de pequeños canales que conllevan a la despolarización de la membrana y a un aumento de la permeabilidad de protones y cationes monovalentes. Su acción requiere sólo algunos minutos para alterar el equilibrio osmótico de la célula fúngica y provocarle la muerte (figura 8).

Respecto a su perfil de actividad es muy amplio, mostrando actividad frente a levaduras, hongos filamentosos (como *Aspergillus*) y hongos patógenos primarios (como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, etc). Aun así, se han descrito especies resistentes como *Scedosporium* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *Thicosporon asahii*, *Aspergillus terreus* y algunas cepas de *Fusarium* spp. (65).

Más del 50% de los casos de AI están producidos por especies de la sección *Fumigati*, principalmente por *A. fumigatus*, siendo la mayoría de sus especies sensibles a anfotericina B y a otros antifúngicos. Sin embargo, esta sección cuenta con más de 30 especies que no pueden ser diferenciadas morfológicamente entre sí o de *A. fumigatus*, y que han demostrado que son intrínsecamente resistentes a uno o más antifúngicos (66,67), incluido la anfotericina B. Entre éstas encontramos especies como *A. lentulus*, *A. fumigataffinis* o *N. udagawae* (68). La resistencia intrínseca a la anfotericina B se ha reconocido en *A. terreus* durante muchas décadas, pero también *A. flavus* y otras especies menos comunes tienen una sensibilidad reducida a este fármaco antifúngico (69).

Respecto a la interpretación de las CMI (concentraciones mínimas inhibitorias) obtenidas frente a la anfotericina B, EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en su documento "*Antifungal Agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.1*" (70) sólo establece puntos de corte para dos especies, *A. fumigatus* y *A. niger*, considerando una CMI > 2 mg/L como resistente y una CMI ≤ 1 mg/L como sensible. Para el resto de especies, salvo

A. terreus donde su uso está contraindicado independientemente de la CMI obtenida, no se establecen puntos de corte al no existir datos suficientes que avalen su uso. En estos casos se recomienda informar la CMI al fármaco, pero sin categorizarlo como sensible, intermedio o resistente.

Finalmente, las recomendaciones de la guía IDSA (63) respecto al uso de anfotericina B en la AI son:

- El desoxicolato de anfotericina B (AmB) y sus derivados lipídicos son opciones apropiadas para la terapia inicial y de rescate de las infecciones por *Aspergillus* cuando el voriconazol no puede administrarse. Sin embargo, el desoxicolato de AmB debe reservarse para uso en entornos de recursos limitados en los que no hay agentes alternativos disponibles. Las formulaciones lipídicas de AmB deben considerarse en situaciones en las que los azoles están contraindicados o no son tolerados.
- Las formulaciones aerosolizadas de AmB pueden considerarse como profilaxis en pacientes con neutropenia prolongada y en los receptores de los trasplantes de pulmón.

Azoles

El desarrollo de los azoles modificó el panorama de los antifúngicos, al ser un grupo con un amplio espectro de actividad y reducidos efectos adversos. Los azoles son moléculas sintéticas que tienen un anillo de 5 carbonos unido a una cadena alifática que cuenta con un grupo fenilo. Existen dos familias de azoles que se distinguen por el número de átomos de nitrógeno que tiene el anillo azólico: 2 en el caso de los imidazoles y 3 en el de los triazoles (figura 7).

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de las enzimas oxidativas asociadas al citocromo P-450 (lanosterol 14- α -desmetilasa), bloqueando la conversión de lanosterol en ergosterol, produciendo una alteración en la permeabilidad de las membranas fúngicas y, como consecuencia, la acumulación de peróxido de hidrógeno capaz de lesionar la estructura de los orgánulos intracelulares del hongo (figura 8). Los imidazoles muestran buena actividad, pero tienen una toxicidad significativamente superior a la de los triazoles, quedando los primeros relegados prácticamente a presentaciones de uso tópico.

Respecto al uso de los triazoles, existe un amplio consenso para considerar al voriconazol como el tratamiento de elección de la AI, a raíz del estudio llevado a cabo por Herbrecht *et al.* (71) que mostró la superioridad del triazol sobre la anfotericina B convencional, donde consiguió una respuesta del 53% vs. 32% y un aumento de supervivencia a las 12 semanas (71% vs. 58%).

La resistencia a los azoles no es frecuente en el género *Aspergillus*, aunque hay especies como *A. calidoustus* que manifiestan inactividad *in vitro* frente a estos antifúngicos (72). Sin duda, lo más preocupante es la aparición en los últimos años de cepas de *A. fumigatus* resistentes a voriconazol e itraconazol, fundamentalmente en Holanda y norte de Europa (49). Su origen se atribuye a una posible fuente ambiental, relacionada con su uso como plaguicida en jardinería y que se asocia con la mutación TR-L98H del gen *cyp51A*, que codifica la lanosterol 14- α -desmetilasa, y que le confiere un carácter de clonalidad (73). También se han documentado el desarrollo de resistencias adquiridas a voriconazol en tratamientos prolongados (74).

EUCAST en su documento “*Antifungal Agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.1*” (70) establece los siguientes puntos de corte:

- Voriconazol frente a *A. fumigatus*, considerando una CMI > 2 mg/L como resistente y una CMI \leq 1 mg/L como sensible.
- Posaconazol frente a *A. fumigatus* y *A. terreus*: CMI > 0.25 mg/L como resistente y una CMI \leq 0.125 mg/L como sensible.
- Itraconazol frente a *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans* y *A. terreus*: CMI > 2 mg/L como resistente y una CMI \leq 1 mg/L como sensible.

Para el resto de las especies, los ECOFFs (*epidemiological cut-offs*- puntos de corte epidemiológico) frente a estos fármacos antifúngicos suelen ser un escalón superior que para *A. fumigatus*.

Por último, las recomendaciones de la IDSA (63) sobre el uso de triazoles para la AI son las siguientes:

- Los triazoles son los fármacos de elección para el tratamiento y la prevención de AI en la mayoría de los pacientes.
- Se recomienda la monitorización de los niveles séricos de estos fármacos en pacientes que lo reciban como tratamiento dirigido o profiláctico.
- Se recomienda la monitorización de los niveles séricos de otros medicamentos que pueden interaccionar potencialmente con los triazoles, como son: ciclosporina, tacrólimus y sirólimus.

Equinocandinas

En 1974 se inició el desarrollo de este grupo de antifúngicos, pero hasta 2001 no se aprobó el uso de caspofungina en humanos, convirtiéndose en el primer antifúngico disponible cuya diana de acción residía en la pared fúngica (75).

Las equinocandinas son polipéptidos cíclicos (figura 7) que actúan sobre la 1,3-β-D-glucano sintetasa, enzima que participa en la formación de polímeros de 1,3-β-D-glucano, uno de los principales componentes de la pared fúngica. Al disminuir la síntesis de este componente, se produce una inestabilidad osmótica en la célula fúngica y su posterior muerte. Al ser la diana de acción diferente a la de los polienos y azoles no existe resistencia cruzada. Además, el 1,3-β-D-glucano no está presente en las células de los mamíferos, lo que explicaría la escasa toxicidad del fármaco sobre la célula humana (figura 8).

Estos fármacos presentan una excelente actividad *in vitro* frente a *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis carinii* y los hongos dimórficos. Se ha descrito un descenso de actividad *in vitro* frente a *Candida parapsilosis* y *Candida guilliermondii*, y son inactivas frente a las especies que tienen 1,6-β-glucano en su pared como *Cryptococcus* spp., otros Basidiomycetos y los Mucorales. También son inactivas frente a *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp.

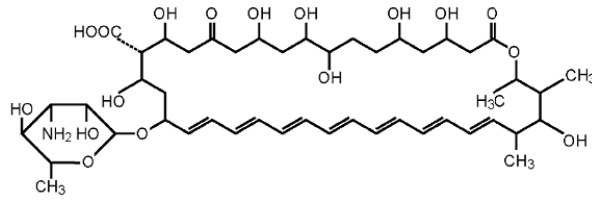
Las equinocandinas tienen una forma específica de actividad contra las especies de *Aspergillus*, causando daño en los extremos de las hifas y puntos de ramificación de las células en crecimiento, disminuyendo así la invasión. Esto se debe a que las nuevas unidades de 1,3-β-D-glucano se incorporan en estos puntos de crecimiento en las hifas de *Aspergillus* (76).

Aunque tienen efecto fungistático contra las especies de *Aspergillus*, las equinocandinas exhiben excelente actividad *in vitro* e *in vivo* contra muchas especies del género, incluyendo *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* (77,78).

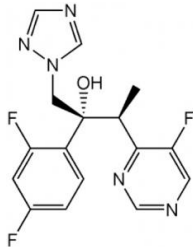
Pfaller *et al.* (78), confirmaron en un estudio llevado a cabo en 526 aislamientos de *Aspergillus* spp. que las actividades inhibitoras de las 3 equinocandinas eran comparables, aunque las CMEs (concentraciones mínimas efectivas) de micafungina y anidulafungina fueron de 2 a 10 veces menores que las de caspofungina. Con independencia de las CMEs, más del 99% de todos los aislamientos fueron inhibidos por una concentración ≤ 0.06 µg/mL de los tres agentes.

Respecto a la interpretación de las CMEs, EUCAST en su documento “*Antifungal Agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.1*” (70) no establece ningún punto de corte. Considera que no existe la suficiente evidencia como para establecer las categorías clínicas de sensible/intermedio/resistente, recomendando informar tan sólo los valores de CMEs obtenidos.

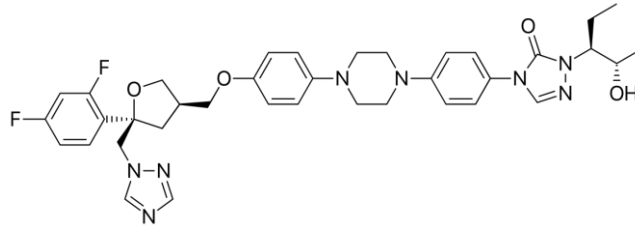
A pesar de su gran actividad, la guía IDSA (63) establece que las equinocandinas son efectivas en la terapia de rescate (ya sean solas o en combinación con otros antifúngicos) frente a la AI, pero no recomiendan su uso de rutina en monoterapia.



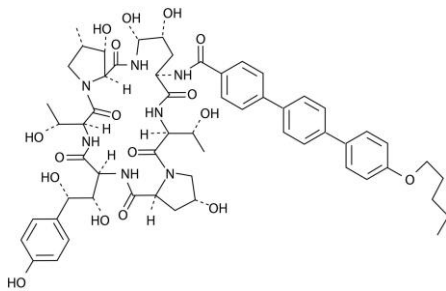
Anfotericina B



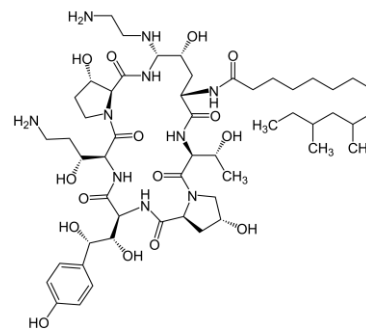
Voriconazol



Posaconazol



Anidulafungina



Caspofungina

Figura 7. Estructura química de los diversos fármacos antifúngicos ensayados en este estudio.

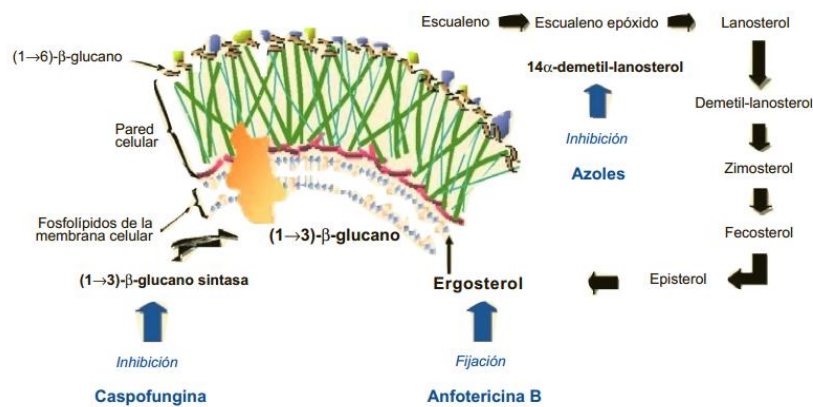


Figura 8. Mecanismo de acción de los diferentes antifúngicos. Adaptado de: Catalán *et al.* (60)

Justificación y Objetivos

Ampliación y validación de una nueva base de datos
para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF

En los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia de las micosis invasoras en pacientes inmunodeprimidos, originando tasas elevadas de morbilidad y mortalidad, con el consiguiente aumento de la carga de trabajo asistencial y del gasto económico. A pesar de la mejora en los métodos diagnósticos y de la introducción y uso de nuevos fármacos antifúngicos en la última década, la tasa de mortalidad asociada a la AI es mayor del 50%. Posiblemente, esto sea debido a la dificultad de realizar un diagnóstico precoz y seguro de este tipo de infecciones.

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido por otra parte un mejor conocimiento y organización del género *Aspergillus*, apareciendo nuevas especies (crípticas) difíciles de identificar por métodos convencionales y con un patrón de sensibilidad a los fármacos antifúngicos disminuido, debiendo llamar nuestra atención por sus implicaciones clínicas.

Finalmente, destacar cómo la tecnología basada en la espectrometría de masas ha irrumpido en el laboratorio de Microbiología ofreciendo una alternativa rápida y fiable para la identificación de microorganismos, basándose en el perfil proteico específico de cada uno de ellos. En el caso de los hongos filamentosos, concretamente del género *Aspergillus*, las bases de datos comerciales presentan un bajo número de especies disponibles, limitando así su capacidad de identificación y, por tanto, la toma de decisiones clínicas que de él se derivan.

Por todo lo anterior, tanto desde un punto de vista clínico como epidemiológico, es necesario la puesta a punto de métodos diagnósticos rápidos y fiables que permitan una correcta identificación a nivel de especie dentro del género *Aspergillus*.

La posibilidad que ofrece la EM MALDI-TOF de crear bibliotecas propias, ha permitido plantearnos el desarrollo de una metodología, para su aplicación rutinaria en la identificación de especies del género *Aspergillus* aisladas en muestras clínicas, que permitiera la identificación correcta de las especies, incluidas las crípticas, acortando significativamente el tiempo de respuesta.

Por ello, en el presente trabajo planteamos la consecución de los siguientes objetivos generales y específicos:

General

- Creación y validación de una base de datos propia (biblioteca) en el espectrómetro de masas MALDI-TOF, para la identificación rápida y fiable de especies del género *Aspergillus* aisladas a partir de muestras clínicas.
- Aplicación de forma rutinaria de esta tecnología en un Servicio de Microbiología Clínica, con la finalidad de disminuir el tiempo de respuesta en el proceso de identificación de los aislamientos en muestras clínicas y mejorar la calidad del mismo.

Específicos

- Identificación genotípica de una colección de cepas de *Aspergillus* spp. mediante la amplificación y secuenciación de los genes β -tubulina y calmodulina.
- Diseño y evaluación del método de procesamiento de las cepas para su identificación por EM MALDI-TOF.
- Desarrollo de una base de datos propia en el espectrómetro de masas MALDI-TOF, que incluya a todas las especies distintas identificadas en nuestra serie mediante secuenciación.
- Validación de la base de datos creada.
- Aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación rápida de las especies de *Aspergillus* aisladas a partir de muestras clínicas.
- Aplicación de la EM MALDI-TOF para el estudio epidemiológico de las especies de *Aspergillus* aisladas en pacientes con diferentes patologías.
- Estudio de sensibilidad a antifúngicos de todas las especies crípticas identificadas.

Materiales

Ampliación y validación de una nueva base de datos
para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF

Microorganismos

Cepas

Se han utilizado un total de 379 cepas de *Aspergillus* spp. aisladas a partir de muestras clínicas, procesadas desde enero de 2014 a diciembre de 2015, en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla).

Todas las cepas se identificaron atendiendo a sus características morfológicas, y 179 fueron seleccionadas para ser identificadas por secuenciación de genes por ofrecer algún tipo de duda en la identificación convencional fenotípica, o bien, por presentar características morfológicas infrecuentes o por ser éstas desconocidas.

Cuarenta y dos de estas cepas, representativas de las 20 especies diferentes del género *Aspergillus* encontradas (incluyendo las crípticas) y 11 cepas de referencia [10 de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) y 1 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España)] se utilizaron para crear la nueva base de datos propia (Hongos Filamentosos-HUVR) en el espectrómetro de masas MALDI-TOF.

El total de las 179 cepas secuenciadas se emplearon en la posterior validación de la nueva base de datos y las restantes 200 cepas se utilizaron en la fase prospectiva del estudio, para demostrar la utilidad de la base de datos creada.

Cepas de referencia

En la elaboración de la biblioteca en el espectrómetro de masas MALDI-TOF se utilizaron las siguientes cepas control:

Tabla 5. Cepas de referencia utilizadas para la creación de la biblioteca.

Cepas de referencia
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 76668 (CECT 2686)
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305
<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>fumigatus</i> ATCC 16907 (CECT 20228)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9029 (CECT 2088)

Cepas de referencia

Aspergillus oryzae var. *oryzae* ATCC 1011 (CECT 2094)

Aspergillus parasiticus ATCC 15517(CECT 2680)

Aspergillus tamarisii CECT 20399

Aspergillus terreus var. *terreus* ATCC 10690 (CECT 2808)

Aspergillus tubingensis ATCC 11394 (CECT 2089)

Aspergillus versicolor ATCC 42039 (CECT 2544)

En la fase de estudio de sensibilidad a los antifúngicos, las cepas control utilizadas fueron *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 y *Aspergillus flavus* ATCC 204304.

Productos químicos y biológicos

- Acetonitrilo (Sigma-Aldrich)
- Ácido fórmico (Sigma-Aldrich)
- Ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich)
- Agarosa en polvo (Bio-Rad)
- Agua desionizada (Sigma-Aldrich)
- Agua destilada estéril
- Agua MiliQ estéril
- Caldo Sabouraud líquido (Becton Dickinson)
- Calibrador BTS (*Bruker Bacterial Test Standard*) (Bruker Daltonics)
- Cebadores específicos (TIB-MOLBIOL)
- Colorante del gel de agarosa BLUXYO Safe (gTPbio). Se trata de una mezcla de 3 colorantes, que no incluye bromuro de etidio.
- DMSO (dimetilsulfóxido) 99% (Sigma-Aldrich)
- dNTP-Desoxinucleótidos trifosfato (10 mM) (Roche Diagnostics)
- EDTA Na₂ (ácido etilendiaminotetracético disódico) (Sigma-Aldrich)
- Enzima HotStar *Taq*® DNA Polymerase (Qiagen)
- Enzima lytica liofilizada (10000 U)
- Etanol absoluto (Panreac)
- Glicerol (Panreac)
- Glucosa (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido sódico (NaOH) (Panreac)
- Kit de extracción de ADN QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)

- Kit de purificación de ADN E.Z.N.A.®Gel Extraction Kit (Omega Biotek, Norcross, GA, USA)
- Matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) (Bruker Daltonics)
- MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico) (Sigma-Aldrich)
- Patrón de peso molecular 100pb DNA gTP-Ladder (gTPbio)
- Placas de Sabouraud dextrosa agar con cicloheximida (Oxoid)
- Placas de Sabouraud dextrosa agar con cloranfenicol (Oxoid)
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- Tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich)
- Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 10X (Bio-Rad)
- Tris-HCl (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)

Agentes antifúngicos

En la realización de las pruebas de sensibilidad de las cepas estudiadas se emplearon los siguientes antimicrobianos, en forma de polvo valorado:

- Anfotericina B (Sigma-Aldrich, Y0001361), potencia del 94.7%
- Voriconazol (Pfizer), potencia del 99.9%
- Posaconazol (MSD), potencia del 98.8%
- Anidulafungina (Pfizer), potencia del 87.3%
- Caspofungina (MSD), potencia del 92.3%

Aparatos y materiales

- Agitador magnético
- Agitador rotatorio tipo vórtex
- Asas bacteriológicas de 100 μ L estériles
- Autoclave
- Balanza de precisión (sensibilidad para 0.001g)
- Barras magnéticas de agitación
- Bomba de vacío
- Cámara de recuento (Kova® Slide 10 with grids)
- Campana de bioseguridad nivel II
- Cubeta de electroforesis horizontal para gel de agarosa
- Elementos para la confección de geles de agarosa: molde, peines, etc.
- Espectrofotómetro NanoDrop®ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos)
- Espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics)
- Estufa de cultivo de 30 ± 2 °C

Materiales

- Filtros de 22 μm de diámetro de poro, ajustables a bomba de vacío
- Frascos de vidrio con tapón de rosca de capacidad 250, 500 y 1000 mL
- Fuente de electroforesis
- Lavaplatos
- Lupa microscópica
- Microcentrífuga de tubos *eppendorf*
- Microscopio de campo claro
- Neveras y congeladores (-20°C y -70°C)
- pHmetro
- Pipetas de volúmenes variables, unicanal y multicanal.
- Pipetas Pasteur estériles
- Placas de microtitulación de 96 pocillos estériles con fondo plano
- Puntas de pipetas de volúmenes variables estériles, con y sin filtro
- Tapas de plástico para placas de microtitulación de 96 pocillos estériles
- Tarjeta metálica de 96 posiciones (Bruker Daltonics)
- Termobloque
- Termociclador
- Torundas de algodón estériles
- Transiluminador de luz ultravioleta y cámara fotográfica con analizador de imágenes
- Tubos de conservación de cepas
- Tubos de PCR de 0.6 mL
- Tubos de plástico de 50 mL tipo Falcon
- Tubos de vidrio de 5 mL y de 10 mL
- Tubos *eppendorf*® de 1.5 mL

Disoluciones y disoluciones reguladoras

- ✓ Disolución de la enzima lyticasa
 - Tampón PBS.....0.5 mL
 - Glicerol.....2.5 mL
 - NaOH 5M.....0.1 mL
 - Agua destilada estéril c.s.p.5.0 mL

Tomar 2 mL de la disolución previamente preparada y añadirlos al envase de la enzima lyticasa (10,000 U). Hacer alícuotas de 50 μL (5U/ μL lyticasa) y conservar a -20°C.

- ✓ Disolución reguladora para la enzima lyticasa
 - Tris-HCl a pH=7.5.....7.88 g
 - EDTA.....2.92 g

- β -mercaptoetanol.....2.19 ml

Finalmente, la solución de lyticasa debe contener: 10 U/mL lyticasa, 50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM EDTA y 28 mM β -mercaptoetanol. Almacenar a temperatura ambiente.

✓ Solvente orgánico:

- Agua desionizada.....475 μ L
- Acetonitrilo.....500 μ L
- Ácido trifluoroacético.....25 μ L

Preparar en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Agitar en vórtex.

✓ Disolución de Matriz HCCA

- Tubo de Matriz liofilizada (tapón rojo)
- Solvente orgánico.....250 μ L

Agitar en vórtex durante 2-3 minutos hasta su completa disolución. Almacenar a temperatura ambiente y protegido de la luz.

✓ Disolución de calibrador BTS

- Tubo de calibrador BTS (tapón amarillo)
- Solvente orgánico.....50 μ L

Disolver mediante pipeteo, dejar incubar 5 minutos a temperatura ambiente y volver a pipetear. Finalmente, se centrifuga durante 1 minuto a 13,000 rpm. Distribuir en alícuotas de 10 μ L y conservar a -18°C.

✓ Disolución de ácido fórmico al 70%:

- Ácido fórmico.....700 μ L
- Agua desionizada.....300 μ L

Distribuir 1 mL en tubos *eppendorf* de 1.5 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

✓ Disolución reguladora de NaOH 1M:

- NaOH.....40 g
- Agua destilada estéril.....1000 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

Medios de cultivo

- ✓ Sabouraud dextrosa agar (Oxoid)
 - Peptona.....10 g
 - Dextrosa.....40 g
 - Agar.....15 g
 - Agua destilada.....1000 mL

Mezclar los ingredientes y hacerlos hervir hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15 min. pH final a 25°C: 5.6 ± 0.2. Aspecto: medio sólido, ámbar, transparente.

- ✓ Sabouraud dextrosa agar con cloranfenicol (Oxoid)
 - Peptona.....10 g
 - Dextrosa.....40 g
 - Cloranfenicol.....0.05 g
 - Agar.....15 g
 - Agua destilada.....1000 mL

El pH final estará ajustado a 5.6 ± 0.2. Disolver los componentes mediante ebullición. Distribuir en tubos y esterilizar 10 minutos a 121°C. Dispensar el contenido en placas con el espesor suficiente para evitar la desecación.

- ✓ Sabouraud dextrosa agar con cicloheximida (Oxoid)
 - Peptona.....10 g
 - Dextrosa.....40 g
 - Cicloheximida.....0.4 g
 - Agar.....15 g
 - Agua destilada.....1000 mL

Mezclar bien y disolver por calentamiento con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- ✓ Caldo Sabouraud líquido (Becton Dickinson)
 - Peptona.....10 g
 - Dextrosa.....20 g
 - Agua destilada.....1000 mL

Esterilizar en autoclave y almacenar protegido de la luz.

✓ Disolución de RPMI suplementado con un 2% Glucosa (2x)

El medio de cultivo recomendado por EUCAST en su documento E.DEF 9.3 (79) es RPMI 1640 suplementado con glucosa a una concentración final del 2%, que permite un mejor crecimiento del hongo filamentoso y una mejor detección de los puntos finales. Los componentes de esta disolución son:

- Agua destilada..... 900 mL
- RPMI 1640.....20.8 g
- MOPS.....69.06 g
- Glucosa.....36 g

La elaboración de la misma comprende los siguientes pasos:

- Añadir los componentes previamente nombrados a 900 mL de agua destilada.
- Agitar hasta que los componentes estén totalmente disueltos. Nos podemos ayudar de un agitador magnético.
- Ajustar el pH a 7.0 a 25°C con NaOH 1M.
- Añadir agua hasta un volumen final de 1 L.
- Esterilizar por filtración usando un filtro de 22 µm de tamaño de poro.
- Almacenar a 4°C.

Métodos

Ampliación y validación de una nueva base de datos
para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF

Recogida de datos clínicos

El estudio se ha realizado en el Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla), un centro hospitalario de tercer nivel que atiende a una población de referencia como hospital básico de 554,981 habitantes, tiene 1,901,617 habitantes asignados como hospital de referencia provincial y 282,998 habitantes como hospital de referencia regional. Estos datos proceden de la base de datos de usuarios del Servicio Andaluz de Salud (Junta de Andalucía).

El **Hospital Universitario Virgen del Rocío** está formado por el campus principal (ubicado al Sur de la ciudad de Sevilla), el Hospital Duques del Infantado (próximo al campus) y los centros de especialidad Dr. Fleming y Virgen de los Reyes (en diferentes localizaciones de la capital). El complejo hospitalario (figura 9) está compuesto a su vez por varios hospitales: el Hospital General, el Hospital de Rehabilitación y Traumatología, el Hospital Infantil y el Hospital de la Mujer; contando con unas 1200 camas de hospitalización funcionantes.



Centros Asistenciales

1. Hospital General
2. Hospital de Rehabilitación y Traumatología
3. Hospital de la Mujer
4. Hospital Infantil
5. Edificio de Laboratorios
6. Centro de Diagnóstico y Tratamiento
7. Anatomía Patológica
8. Unidad de Salud Mental

Centros Administrativos

9. Centro de Documentación Clínica Avanzada
10. Edificio de Gobierno
11. Edificio de Gestión de Recursos

Centros Docentes y de Investigación

12. EU de Enfermería
13. IBIS

Centros Servicios Generales

14. Cocina
15. Lavandería

Figura 9. Complejo Hospitalario Virgen del Rocío. Fuente: Memoria 2015 H.U.Virgen del Rocío.

Todas las cepas incluidas en el estudio se aislaron a partir de muestras clínicas recepcionadas y procesadas en el Servicio de Microbiología.

Cada muestra se acompañó de información relativa al paciente: datos demográficos (número de historia clínica, sexo, edad, servicio médico peticionario), datos microbiológicos (tipo de muestra, aislamientos previos) y datos clínicos (enfermedad de base, presencia o no de enfermedad pulmonar, presencia o no de Fibrosis Quística, administración o no de tratamiento antifúngico).

Atendiendo a si el paciente recibió o no tratamiento antifúngico dirigido, debido al aislamiento de *Aspergillus* spp., dividimos a los aislamientos en dos grupos: colonizantes y clínicamente relevantes.

Para ello, hicimos uso del programa informático del laboratorio de Microbiología y de la historia clínica electrónica. Todo ello aprobado previamente por el Comité de Ética Hospitalaria.

Aislamiento e identificación de las especies de *Aspergillus* en el laboratorio

Las cepas incluidas en el estudio se aislaron a partir de distintas muestras clínicas remitidas a la sección de Hongos y otras secciones del Servicio de Microbiología. Cada una de las muestras se procesó atendiendo a los protocolos normalizados de trabajo (PNT) de la sección correspondiente del laboratorio al que iba destinado. El aislamiento de hongos filamentosos siempre se deriva a la sección de Hongos, donde se realiza su identificación.

Las muestras destinadas a cultivo son sembradas en Sabouraud-dextrosa, Sabouraud-cloranfenicol y Sabouraud-cicloheximida (Oxoid), incubadas a 25°C y 30°C, con revisión de dos veces a la semana durante un máximo de 3 semanas, antes de informar un cultivo como negativo.

La identificación de hongos miceliales, como *Aspergillus*, se ha basado tradicionalmente en el examen de sus características macroscópicas (aspecto de la colonia) así como de las características microscópicas de los cultivos. Este último es un paso esencial en la identificación, siendo la forma, tamaño y disposición de las conidias en el micelio datos indispensables para consultar las claves dicotómicas.

Cuando se detecta crecimiento de un hongo filamentosos sobre el medio de cultivo, se procede a su identificación haciendo uso de claves dicotómicas como la de Hoog *et al.* (14):

- **Examen macroscópico:** forma, color, textura, velocidad de crecimiento y reverso de la colonia.

En general, las especies de *Aspergillus* se desarrollan a partir de las 48-72 horas. El color del micelio aéreo varía según la especie y puede ser blanco, verde, negro o amarillento. El reverso del cultivo suele ser incoloro o mostrar tonos claros, nunca negros.

- **Examen microscópico:** si el hongo tiene abundantes formas de reproducción, como es el caso del género *Aspergillus*, se emplea la técnica de “scotch” o papel de celofán, que consiste en tocar la superficie de la colonia con la cinta adhesiva y colocarla sobre un portaobjeto, sobre el que se ha depositado previamente una gota de azul algodón de lactofenol, y observar al microscopio (objetivo 40x).

Para la identificación de las especies de *Aspergillus* se consideran: forma y tamaño de la vesícula aspergilar, características de los conidióforos, disposición columnar o radiada de las fiálides, características de las conidias y presencia de células de Hülle.

Brevemente, los pasos a seguir son (figura 10):

- i) Colocar el material necesario en la campana de bioseguridad nivel II.
- ii) Seleccionar las colonias para realizar las improntas.
- iii) Cortar segmentos de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 cm².
- iv) Pegar los segmentos de cinta en un asa bacteriológica.
- v) Poner una gota de azul algodón de lactofenol en el portaobjetos.
- vi) Con el lado adhesivo de la cinta, tocar la parte superior de hongo.
- vii) Colocar la cinta sobre la gota de azul algodón de lactofenol y poner otra gota más.
- viii) Poner un cubreobjetos sobre la preparación.
- ix) Observar al microscopio a 40x.

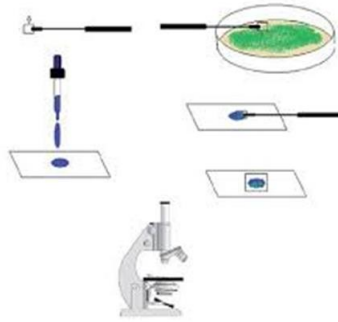


Figura 10. Representación de la preparación de la impronta para la observación de hongos filamentosos.

Conservación de cepas

La conservación de las cepas de *Aspergillus* se basó en suspensiones de esporas obtenidas a partir de cultivos esporulados de 4-5 días en agar Sabouraud dextrosa. Las esporas se separaron del micelio haciendo pasar una torunda de algodón estéril por la superficie del mismo y sumergiéndola a continuación en un vial de tapón de rosca con 3 mL de agua destilada estéril. Los viales se almacenaron a temperatura ambiente.

Identificación molecular de las cepas estudiadas

Sólo 179 cepas, que ofrecieron una identificación incierta basándose en sus características fenotípicas, fueron seleccionadas para ser identificadas por secuenciación.

Extracción de ADN cromosómico

A partir del vial de conservación de cada cepa, introducimos un asa bacteriológica estéril y realizamos 5 improntas en forma de cruz en el agar. El micelio estará en el momento adecuado para la extracción de ADN tras una incubación a 30°C durante 48 horas (figura 11).

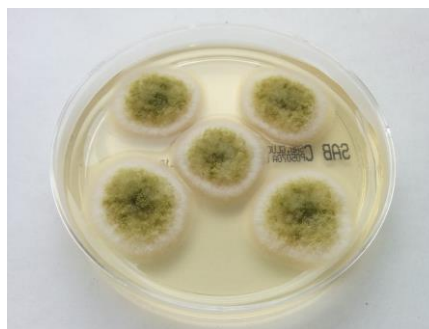


Figura 11. Aspecto del pase de una cepa de *A. flavus* tras 48 horas de incubación, previa a la extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó mediante el kit de extracción manual QIAmp® DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, Francia), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El laboratorio desarrolló un pretratamiento de las muestras con una disolución enzimática de lyticasa, capaz de romper la pared celular fúngica y aumentar así el rendimiento de la extracción. Este pretratamiento consistió en los siguientes pasos:

1. Añadir aproximadamente 500 µL de agua estéril en un *ependorf* de 1.5 mL.
2. Tomar una torunda de algodón estéril y hacerla pasar por los bordes de las colonias e introducirla en el tubo preparado en el paso 1. Hacer rotar la torunda dentro del agua, hasta que se aprecie turbidez en la misma.
3. Centrifugar a 15,000 rpm durante 5 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante de cada tubo.
5. Preparar la disolución de lyticasa (enzima más tampón) tal y como se especificó en el apartado de “Materiales” y añadir 500 µL a cada muestra.
6. Homogenizar en vórtex.
7. Incubar a 37°C en el termobloque durante 1 hora.
8. Centrifugar a 15,000 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.

El producto obtenido será el material de partida para el kit comercial. Para su uso se siguieron las recomendaciones dadas por el fabricante. Finalmente, se obtiene el ADN que se conserva a -4°C.

La concentración de ADN fue estimada por absorción a 260 nm mediante el espectrofotómetro NanoDrop®ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos), asumiendo que una concentración de 50 µg/mL corresponde a una unidad de densidad óptica. La integridad del ADN fue comprobada en geles de agarosa como se describe en el siguiente apartado.

Electroforesis de ADN

El análisis electroforético de ADN se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% de concentración en tampón TBE 0.5X. Las muestras se disolvieron en el colorante BLUXYO Safe (gTPbio) en una proporción 5:1, aplicando 5 µL de muestra. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE 0.5X a voltaje constante y, una vez finalizada, las muestras se visualizaron mediante irradiación con luz UV. El marcador de peso molecular utilizado fue DNA gTP-Ladder (gTPbio) de 100 pb que abarca un rango de tamaños desde 100 a 1500 pb.

Amplificación

En todas las cepas se llevó a cabo la amplificación parcial del gen de la β -tubulina (*BenA*) usando los cebadores β -tub1 y β -tub4 (tabla 6) (24). La identificación de especies crípticas se confirmó por una segunda amplificación, esta vez del gen de la calmodulina (*CaM*), haciendo uso de los cebadores Cmd5 y Cmd6 (tabla 5) (80). Todos los cebadores fueron sintetizados por TIB-MOLBIOL (Berlín, Alemania).

Tabla 6. Cebadores y sus secuencias de nucleótidos empleados en el estudio.

Cebador	Secuencia
β -tub1	5' AAT TGG TGC CGC TTT CTG G 3'
β -tub4	5' AGC GTC CAT GGT ACC AGG 3'
Cmd5	5' CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC 3'
Cmd6	5' CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG 3'

La amplificación del ADN molde, con las distintas parejas de cebadores, se realizó siguiendo el protocolo llevado a cabo por Alastruey-Izquierdo *et al.* (24) en un termociclador GeneAmp® PCR System 2720 (Applied Biosystems) mediante una PCR convencional. Los componentes de la PCR se indican en la tabla 7.

Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR.

Componente	Concentración	Volumen (μ L)
H ₂ O		23.5
Tampón PCR	10x	5
Solución Q	5x	10
dNTP	200 μ M	1
Cebadores	10 μ M	5
HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase	5 U/ μ L	0.5
ADN		5
Volumen total (por muestra)		50

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- Un ciclo inicial de desnaturalización + activación de la enzima (HotStar *Taq* DNA Polymerase) a 95°C durante 15 minutos.
- Amplificación (35 ciclos):
 - 95°C durante 30 segundos
 - 55°C durante 45 segundos
 - 72°C durante 2 minutos
- Ciclo final de extensión a 72°C durante 5 minutos

Los productos de la reacción se analizaron en gel de agarosa al 1% del mismo modo que el especificado en el apartado “Electroforesis de ADN” de “Métodos”. Los productos obtenidos de la amplificación presentan un peso molecular en torno a los 600pb (figura 12).

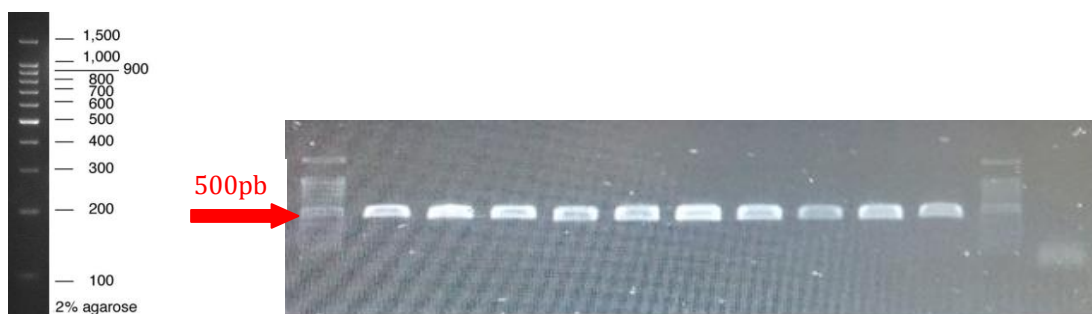


Figura 12. Aspecto que presentan el marcador de peso molecular utilizado y el gel de electroforesis revelado de los productos de PCR.

Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR en la mezcla de reacción se realizó con el kit E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega Biotek, Norcross, GA, USA) siguiendo las recomendaciones de uso del fabricante. Así, la banda de ADN de interés se separa del gel o bien, se parte del producto total de PCR, que se disuelve en un tampón de unión y se transfiere a una columna HiBind® DNA Mini. Después de tres etapas de lavado rápido, el ADN se eluye con el tampón de elución y de este modo queda listo para secuenciar.

Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias

Los productos de PCR purificados se enviaron a Macrogen (Korea) para su secuenciación, haciendo uso de los mismos cebadores utilizados en la

amplificación. En todos los casos se analizaron las dos hebras de ADN, a una concentración de 10 μ M.

La identificación de las especies se llevó a cabo mediante un análisis de búsqueda BLAST en la base de datos genómica NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Confección de una nueva base de datos en el espectrómetro de masas MALDI-TOF

La estandarización del método de trabajo en el espectrómetro de masas MALDI-TOF ha sido primordial para conseguir crear una base de datos funcional, y con ello, alcanzar el objetivo de este estudio.

Preparación de las muestras

Partir de cultivos puros, incubados en el mismo medio y a la misma temperatura, constituyen el punto de partida para crear una base de datos propia en el espectrómetro de masas MALDI-TOF.

Los pasos a seguir para la preparación de las muestras son los siguientes:

1. Partir de un cultivo puro de *Aspergillus* spp. en medio Sabouraud-cloranfenicol de unos 5 días de incubación a 30°C.
2. Hacer alícuota en agua estéril: tomar un vial con tapón de rosca y rellenar de agua estéril. En campana de bioseguridad hacer pasar una torunda de algodón por la superficie del cultivo de *Aspergillus* spp. y disolver en agua.
3. Agitar la alícuota de *Aspergillus* spp. y transferir 150 μ L del contenido al tubo de **medio Sabouraud líquido** previamente atemperado. Mezclar bien y cerrar el tubo con el tapón de rosca, sin llegar al tope, de manera que entre aire (son microorganismos aerobios). Realizar este paso en la proximidad de un mechero Bunsen, para evitar la contaminación del caldo.
4. Incubar a 30°C durante 17-24 horas, agitando manualmente a lo largo del período de incubación.

El tiempo de incubación es variable: hay especies que crecen rápido y dan lugar a un micelio de buen tamaño (ej. sección *Flavi*); en cambio otras (ej. sección *Versicolores*) pueden necesitar incluso más de 24 horas.

5. Tras la incubación, tomar una pipeta Pasteur y un tubo *ependorf* por muestra. Llevar todo el micelio al tubo *ependorf*. Una vez en el tubo es

aconsejable intentar disgregar el micelio aspirando varias veces con la pipeta.

6. Centrifugar a 13,000 xg durante 2 minutos.
7. Eliminar el sobrenadante con una pipeta.

En este punto es importante destacar que si nos hemos dejado micelio en el tubo original, y tenemos poco *pellet* en el tubo *eppendorf*, podemos volver a tomar muestra y repetir los pasos 6-8.

8. Lavar el *pellet* añadiendo 500 μ L de agua al tubo *eppendorf* con el *pellet* y aspirar varias veces con la pipeta, intentando disolverlo. A continuación, centrifugar a 13,000 xg durante 2 minutos (repetir 2 veces más).
9. Añadir 300 μ L de agua sobre el *pellet* limpio y homogenizar. A continuación, se añaden 900 μ L de etanol. Vortear durante unos 10 segundos.
10. Centrifugar a 13,000 xg durante 2 minutos y eliminar todo el sobrenadante.

Este paso es muy importante: no deben quedar restos de etanol. Una vez aspirado todo, se le puede dar un pulso de centrifuga al *eppendorf* y volver a quitar los posibles restos.

11. Mantener el tubo *eppendorf* abierto e introducir en la estufa de 50°C para que se seque completamente durante unos 20-30 minutos. El tiempo dependerá del volumen del *pellet*.
12. Preparar ácido fórmico al 70%. Añadir al tubo *eppendorf* un volumen que va desde 25-40 μ L, dependiendo del volumen del *pellet*. Cuánto más ácido fórmico se use, más diluida estarán las proteínas. Este paso es muy importante, porque es aquí donde se liberan las proteínas que van a generar el espectro característico de cada cepa. Dejar actuar unos 5 minutos.
13. Añadir el mismo volumen que se usó en el paso anterior de acetonitrilo y homogeneizar.
14. Centrifugar a 13,000 xg durante 1 minuto. El sobrenadante con las proteínas se usará para la lectura espectrométrica.

Finalizada la extracción de proteínas, se depositan las muestras en la tarjeta metálica de 96 pocillos, donde se realizará la lectura. No hay un esquema definido de cómo distribuir las muestras en la tarjeta (figura 13), pero sí unos requisitos a considerar:

Métodos

- Depositar la cepa en estudio en un mínimo de 8 posiciones.

En nuestro protocolo de trabajo utilizamos 2 μL de muestra por pocillo: depositamos 1 μL , dejamos secar y depositamos otro μL .

- Poner por cada cepa en estudio, un pocillo con 1 μL BTS + 1 μL cepa (en este orden), que constituirá el “espectro ayuda” para la calibración de los espectros de la cepa en cuestión.
- Poner 2 pocillos con BTS: uno para la calibración del equipo y otro para la calibración de los espectros.
- Depositar 1 μL de matriz en todos los pocillos con muestras y/o BTS, previamente secados a temperatura ambiente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		X			X			X			X	
C												
D					X	BTS		X				
E												
F												
G		X			X			X			X	
H												

Figura 13. Diseño sobre la distribución de 10 muestras en la tarjeta de 96 posiciones. Las “X” marcan las posiciones de los espectros mixtos (“espectros de ayuda”). Adaptado de: Manual de usuario de Bruker Daltonics.

Calibración del sistema

Una vez secada la matriz depositada sobre la tarjeta, ésta se introduce en el espectrómetro para la calibración del equipo, haciendo uso de una de las dos posiciones de BTS. No debe transcurrir más de 30 minutos desde que se deposita la matriz sobre los pocillos del BTS hasta que se inicia el proceso de calibración.

El denominado BTS (*Bruker Bacterial Test Standard*), usado como calibrador en los procesos de medida del espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics), contiene un extracto cuidadosamente elaborado de *Escherichia coli* DH5-alfa que muestra una mezcla de péptidos y un perfil proteico en los espectros de masas MALDI-TOF característicos. El extracto se completa con dos proteínas adicionales, que extienden el límite superior del rango de masas

cubierto. Finalmente, el rango de masas total cubierto por el BTS es de 3,6 a 17 kDa (tabla 8).

Tabla 8. Los puntos de calibración del BTS con su desviación máxima permitida (± 300 ppm). Adaptado de: Manual de usuario de Bruker Daltonics.

Protein	Reference mass (average mass)	± 300 ppm range
RL29 [M+2H] ²⁺	3637.8 Da	3636.7 Da – 3638.8 Da
RS32 [M+H] ⁺	5096.8 Da	5095.3 Da – 5098.3 Da
RS34 [M+H] ⁺	5381.4 Da	5379.8 Da – 5383.0 Da
RS33meth [M+H] ⁺	6255.4 Da	6253.5 Da – 6257.3 Da
RL29 [M+H] ⁺	7274.5 Da	7272.3 Da – 7276.7 Da
RS19 [M+H] ⁺	10300.1 Da	10297.0 Da – 10303.2 Da
RNAse A [M+H] ⁺	13683.2 Da	13679.1 Da – 13687.3 Da
Myoglobin [M+H] ⁺	16952.3 Da	16947.2 Da – 16957.4 Da

La calibración confirma el correcto funcionamiento de los parámetros del equipo, los cuales son una condición previa para obtener espectros de calidad. Este proceso se puede realizar automática o manualmente, decantándonos en nuestro estudio por el primero de ellos. En la calibración automática hay una serie de parámetros establecidos por defecto y que deben cumplirse para dar por válida la calibración:

- Número mínimo de picos asignados en la lectura: 7
- Desviación estándar: ± 300 ppm
- Rango de masas a cubrir: 60%

Adquisición de espectros (programa FlexControl)

Una vez aprobada la calibración del instrumento, se procede a la programación de las lecturas de las diferentes posiciones de la tarjeta, mediante el programa FlexControl.

Por cada tanda de trabajo habrá:

- BTS \rightarrow 1lectura/ posición
- 1-10 Muestras, estando cada una de ellas representada por:
 - 8 posiciones (como mínimo) \rightarrow 3lecturas/ posición
 - 1 posición BTS+muestra \rightarrow 1lectura/ posición

Finalmente, por cada muestra en estudio se obtendrán un máximo de 24 espectros (8 posiciones x 3 lecturas) más el “espectro ayuda”. Todos ellos junto con el espectro de BTS son necesarios para el procesamiento de los mismos (figura 14).

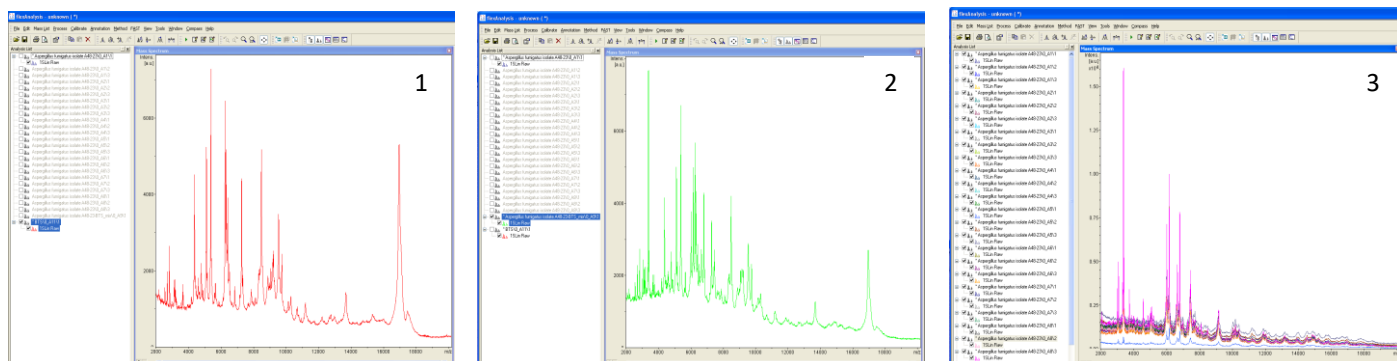


Figura 14. Espectros obtenidos durante la fase de lectura: 1) 1 espectro de BTS, 2) 1 espectro de BTS+muestra y 3) 24 espectros de la muestra.

En el modo automático, se aplican los ajustes por defecto del método MBT_AutoX. Los parámetros por defecto incluyen: modo lineal positivo; frecuencia del láser, 60 Hz; voltaje de fuente de iones 1, 20 kV; voltaje de la fuente de iones 2, 18,5 kV; voltaje de la lente, 6.0 kV y rango de masa, 2.000 a 20.000 Da. En este rango de masas es donde se sitúan la mayor parte de las proteínas ribosómicas liberadas, ofreciendo para la gran mayoría de las especies microbianas un perfil específico, permitiéndolas diferenciar del resto.

Cada espectro se obtiene tras 240 disparos láser en tandas de 40 disparos, que se realizan desde diferentes posiciones del punto de muestra y que posteriormente son acumulados y analizados.

Análisis de espectros (programa FlexAnalysis)

1. Revisión de los espectros adquiridos

Tras comprobar que los valores de calibración c_0 , c_1 y c_2 del BTS coinciden con los obtenidos en los espectros de la muestra, éstos se seleccionan y se abren con el método MBT_Standard.FAMSMMethod. A continuación, se someten a dos procesos (figura 15): *Smooth Mass Spectrum* (suavizado del espectro) y *Subtract Mass Spectrum Baseline* (alineado de la línea base del espectro).

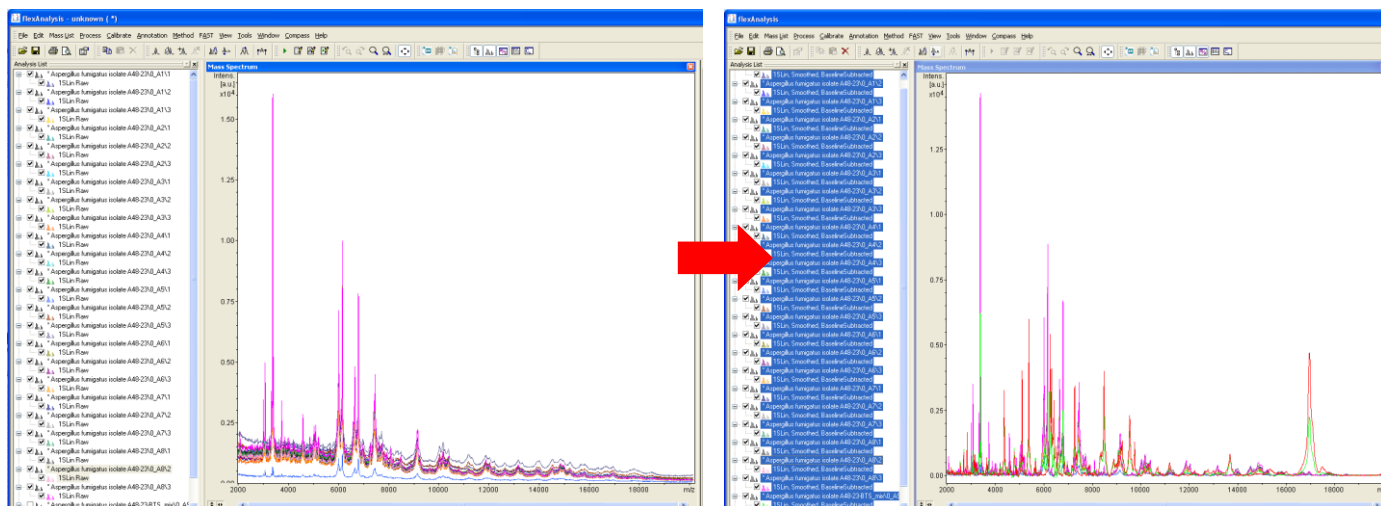


Figura 15. Espectros tras el doble procesamiento (*Smooth Mass Spectrum* y *Subtract Mass Spectrum Baseline*).

Para terminar el proceso de revisión, se comparan los espectros de la muestra recorriéndolos de izquierda a derecha, poniendo el mismo color a los espectros similares y de otro color distinto a aquellos espectros que se salgan de la tónica general (figura 16). Anotar las posiciones de estos últimos, ya que serán candidatos a ser eliminados, teniendo en cuenta que a mayor número de espectros para crear la entrada en la base de datos, mejor. En nuestro estudio, el número mínimo de espectros a partir del cual se creó una entrada fue de 18.

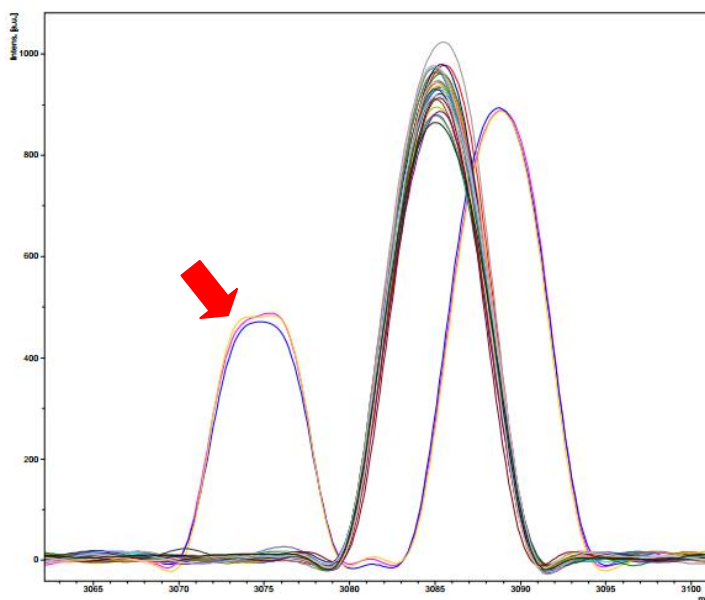


Figura 16. Revisión de los espectros. La fecha roja señala dos espectros que se desmarcan del resto de espectros de la serie.

2. Calibración

a. Pocillo “mezcla” (BTS+muestra)

Abrir los espectros de BTS y de BTS+muestra, buscando un pico en el que coincidan ambos espectros. Generalmente se utiliza el pico correspondiente a 6255.4 Da, que se utilizará como referencia para la calibración. Tras realizar este paso, todos los picos del “espectro ayuda” se desplazarán ligeramente. Aquellos picos del “espectro ayuda” que no coincidan con el espectro de BTS, corresponderán a proteínas específicas de la muestra (figura 17).

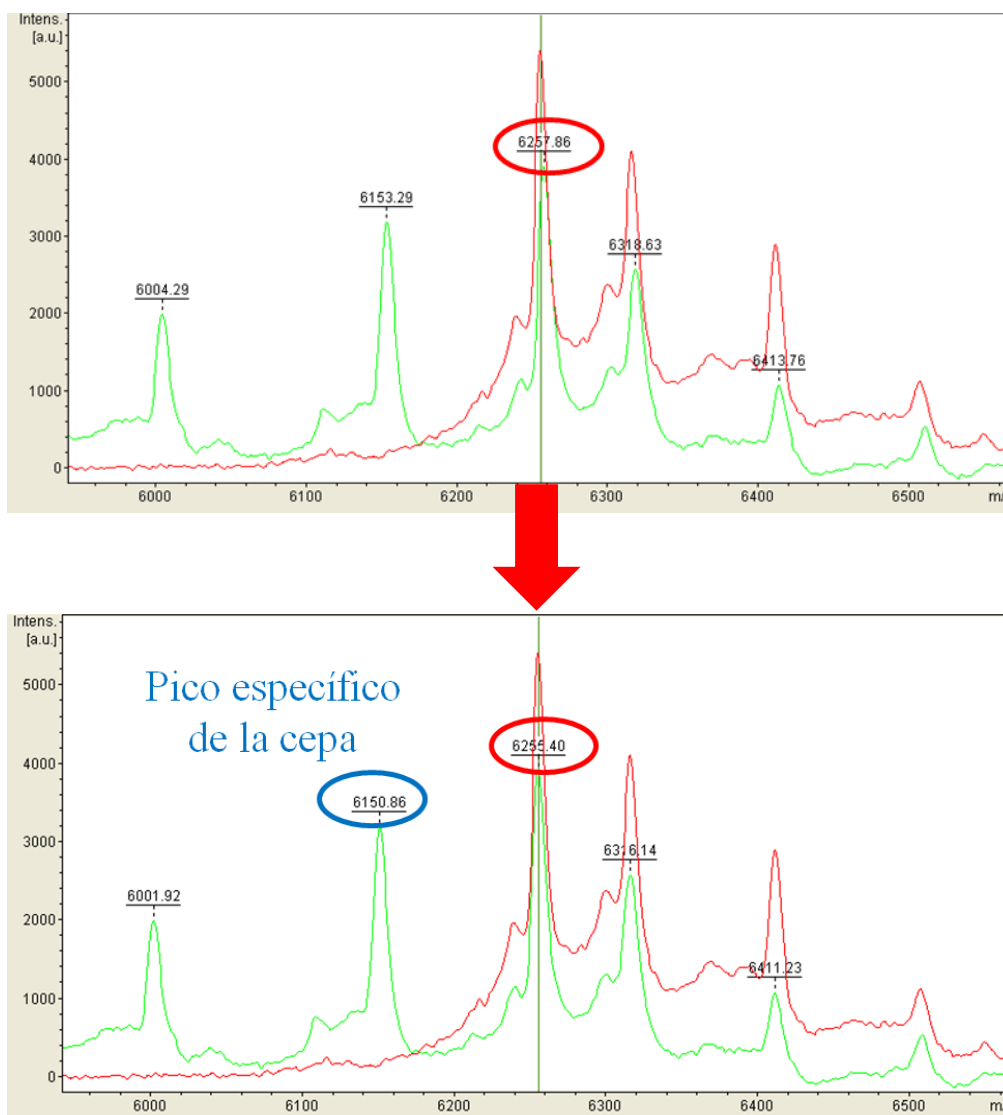


Figura 17. Proceso de calibración del espectro BTS+muestra. En color rojo se representa el espectro de BTS y en color verde el espectro BTS+muestra. Tras la calibración del espectro ayuda, se selecciona el pico correspondiente a 6150.86 Da como específico de la muestra.

b. Pocillos muestras

Abrir todos los espectros de la muestra y el espectro BTS+muestra previamente calibrado. Seleccionar un pico presente en todos los espectros y que corresponderá a una proteína específica de la muestra. Generalmente se selecciona un pico cercano al usado en la calibración del “espectro ayuda” para que el error cometido sea el menor posible. En el caso representado en la figura 17, el pico específico de la muestra seleccionado para la calibración del resto de los espectros es de 6150.86 Da (figura 18).

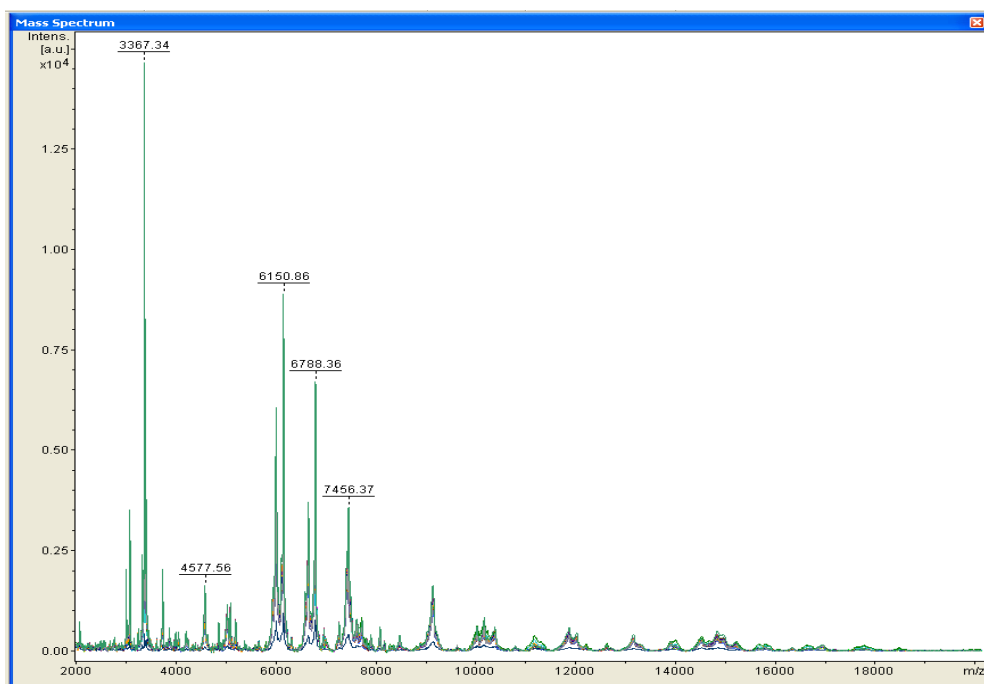


Figura 18. Resultado final de los espectros de la muestra tras ser revisados y calibrados a 6150.86Da.

Creación de una nueva entrada en la base de datos (programa Maldi Biotyper)

1. Creación del MSP (*main spectrum*)

A partir de los espectros revisados y calibrados, se crea con el programa Maldi Biotyper, el denominado espectro principal o MSP (*main spectrum*). Este consiste en el sumatorio de todos los espectros, conteniendo hasta un máximo de 70 picos de los más prominentes de la colección de espectros, que representa la cepa e incluyendo información sobre la intensidad máxima, la posición y la frecuencia de aparición de cada uno de ellos (figura 19). Es en forma de MSP como un nuevo microorganismo, en nuestro caso una nueva especie del género *Aspergillus*, pasa a formar parte de la base de datos.

Aspergillus fumigatus isolate A48-23 (70 Peaks)					
	m/z [Da]	Intensity [%]	Weight [%]	Frequency [%]	In Peak Lists
▶	3074.82	19,36	100,00	100,0	21
	3324,54	16,81	100,00	100,0	21
	3351,68	13,08	100,00	100,0	21
	3368,30	100,00	100,00	100,0	21
	3395,10	21,86	100,00	100,0	21
	3728,67	12,18	100,00	100,0	21
	4575,78	12,15	100,00	100,0	21
	5021,20	9,27	100,00	100,0	21
	5940,42	9,88	100,00	100,0	21
	5980,14	16,42	100,00	100,0	21
	6003,16	45,99	100,00	100,0	21
	6040,33	11,06	100,00	100,0	21
	6151,78	70,34	100,00	100,0	21
	6623,68	11,61	100,00	100,0	21
	6647,30	26,77	100,00	100,0	21
	6789,99	56,33	100,00	100,0	21
	7420,73	16,75	100,00	100,0	21
	7458,00	24,64	100,00	100,0	21
	9146,33	18,84	100,00	100,0	21
	5086,99	7,71	100,00	95,2	20

Figura 19. Lista de picos del MSP de una cepa en estudio: *Aspergillus fumigatus* isolate A48-23.

2. Herramientas para evaluar el MSP

El programa Maldi Biotyper ofrece diversas herramientas para la reevaluación de los espectros ya seleccionados y procesados, que queremos transformar en una nueva entrada en forma de MSP.

a. Matriz CCI (Composite Correlation Index)

Mediante el análisis del índice de correlación compuesto o CCI (*Composite Correlation Index*) se determina el grado de similitud existente entre el conjunto de espectros de la cepa en estudio. Para ello, se compara cada espectro con cada uno de los que forman el conjunto. El índice obtenido puede tomar valores que van de 0 a 1, donde 0 indica una clara diversidad de los espectros y 1 representa una alta conformidad entre los mismos. La representación de dichos valores origina una matriz de colores, donde los más fríos representan índices más bajos y los más cálidos índices más elevados (figura 20). Los espectros que muestren una clara diferencia con el resto, serán candidatos a ser eliminados y, por lo tanto, no formarán parte del MSP.

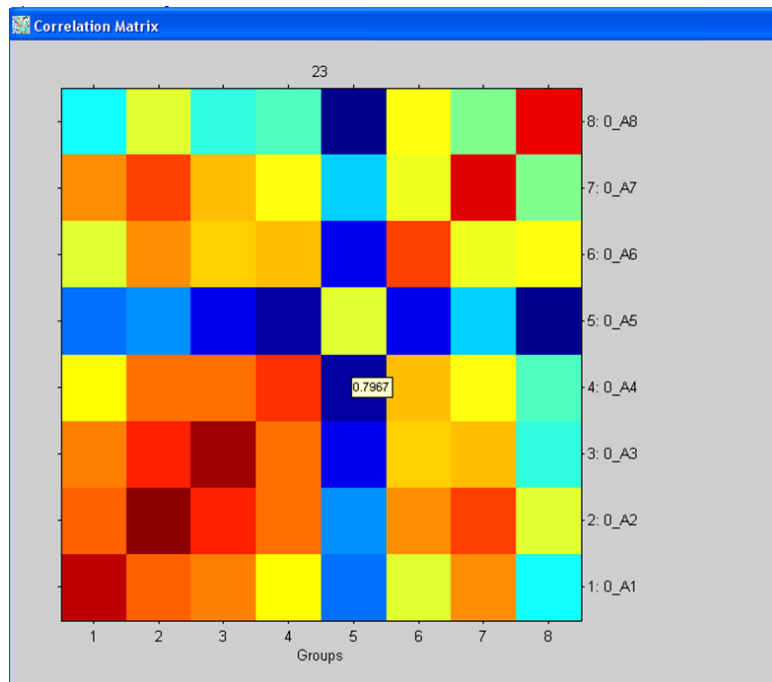


Figura 20. Matriz de correlación de un MSP. Los espectros generados a partir de la lectura de la posición A5 muestran una clara diferencia con los generados a partir del resto de posiciones.

b. Dendograma

El dendograma es la representación gráfica que mejor ayuda a interpretar el resultado de un análisis de agrupamiento o *clustering* (figura 21). Con este tipo de representación se puede apreciar claramente las relaciones de agrupación entre los datos e incluso entre grupos de ellos. En el programa Maldi Biotyper, los *clusters* se clasifican tras aplicar algoritmos jerárquicos disminutivos (partiendo de un solo grupo se separan los elementos en grupos cada vez más pequeños). La cercanía se define en términos de una determinada función de distancia, como la euclídea, expresada en unidades arbitrarias.

3. Introducción de la nueva entrada en la base de datos

Tras la revisión y comprobación de la calidad del MSP creado, éste pasa a ser incluido en la nueva base de datos creada: Hongos filamentosos-HUVR.

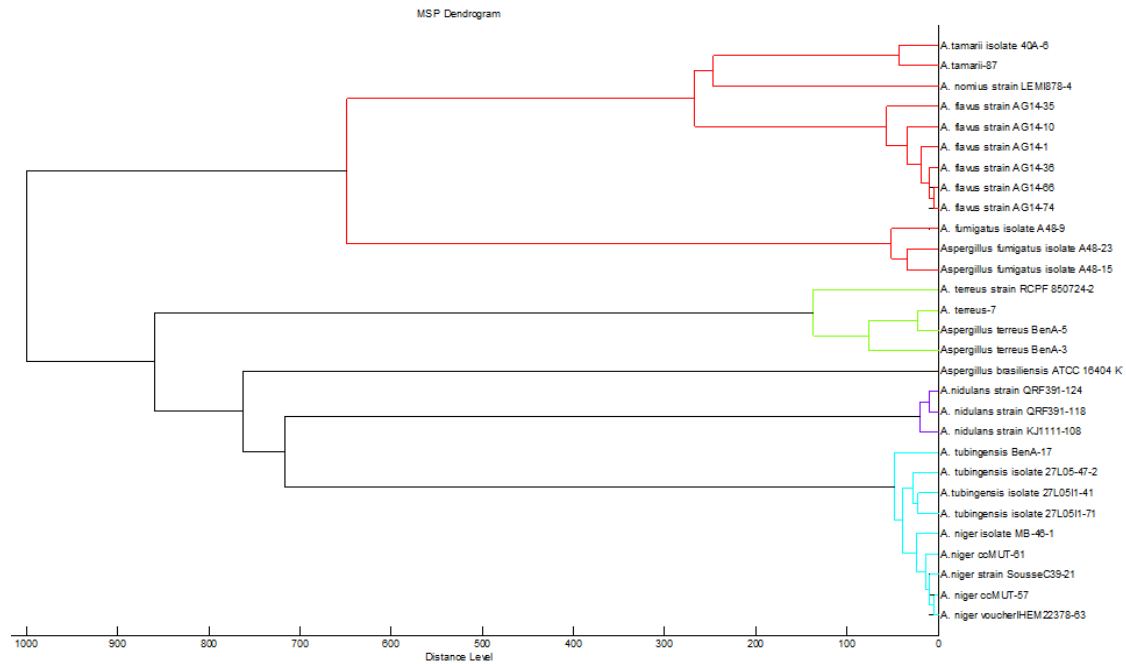


Figura 21. Dendrograma de MSPs de *Aspergillus* spp.

Validación de la nueva base de datos creada en el espectrómetro de masas MALDI-TOF

Después de la creación de la nueva base de datos se procedió a su validación. Para ello, y con la idea de aproximar su uso a la rutina de trabajo instaurada en el laboratorio de Microbiología, se decidió comprobar su utilidad partiendo de cepas de *Aspergillus* crecidas en **medio sólido** y no en medio líquido, como fue el utilizado en la creación de la biblioteca. De tal modo, que la validación de la misma se haría en condiciones diferentes a las que fue creada, pero que se adapta mejor a la rutina diaria de la Sección de Hongos. La identificación de cada cepa se realizó por triplicado (3 pocillos/muestra).

Preparación de las muestras

1. Subcultivo de la alícuota del hongo filamentoso (vial con agua estéril) a dos placas de Sabouraud-cloranfenicol: introducir el asa bacteriológica de 100 μ L en el vial y realizar de 4-5 improntas por placa.
2. Incubar a 30 °C durante 36-48 horas.
3. Añadir 1 mL de agua desionizada a un tubo *ependorf*. Pasar un escobillón estéril de algodón por la periferia de las colonias crecidas en el medio

Sabouraud-cloranfenicol, que se corresponden con las zonas más jóvenes del micelio, introduciéndolo en el tubo *ependorf*. A continuación, agitar en vórtex durante 15 segundos para homogenizar la suspensión.

4. Centrifugar a 13,000 xg durante 5 minutos.
5. Eliminar todo el sobrenadante.
6. Añadir 500 μL de agua y aspirar varias veces con la pipeta, intentando disolver el *pellet*. Centrifugar a 13,000 xg durante 2 minutos (repetir 2 veces más).
7. Añadir 300 μL de agua sobre el *pellet* limpio y homogeneizar. A continuación, se añaden 900 μL de etanol. Se vortea durante unos 10 segundos.
8. Centrifugar a 13,000 xg durante 2 minutos y se elimina todo el sobrenadante, procurando que no queden restos de etanol.
9. Mantener el tubo *ependorf* abierto e introducir en estufa a 50°C durante 20-30 minutos hasta que se seque completamente.
10. Preparar ácido fórmico al 70%. Añadir al tubo *ependorf* un volumen que va desde 25-40 μL , dependiendo del volumen del *pellet*. En este paso es donde se liberan las proteínas que van a generar el espectro característico de cada cepa. Dejar actuar unos 5 minutos.
11. Añadir el mismo volumen que se usó en el paso anterior, pero esta vez de acetonitrilo. Homogenizarlo bien.
12. Centrifugar a 13,000 xg durante 1 minuto. Usaremos el sobrenadante, lugar donde quedan las proteínas.
13. Transferir a la tarjeta metálica de 96 posiciones 1 μL del sobrenadante por muestra. Dejar secar y añadir otro μL del sobrenadante en la misma posición.
14. Por último, añadir 1 μL de matriz y dejar secar antes de introducir en el EM MALDI-TOF para su identificación.

Interpretación de los resultados

La identificación de una cepa desconocida se realiza al comparar la relación de picos derivada de su espectro de masas con cada entrada de referencia de la base de datos. La puntuación obtenida se calcula por multiplicación de tres factores (cada factor puede alcanzar un máximo de 1), que son:

- coincidencias del espectro desconocido con el MSP
- coincidencias del MSP con el espectro desconocido
- similitud del perfil de intensidad de los picos de coincidencia.

El logaritmo de estas puntuaciones calculadas y multiplicado por 1000 da un registro de valor máximo 3 [$\log (1 \times 1 \times 1 \times 1000) = 3$]. Los resultados obtenidos, denominados *scores* (puntuaciones), pueden oscilar de 0 a 3 y se acompañan de un código de colores. Atendiendo a las recomendaciones del fabricante (<http://maldibiotyper.com/literature.html>) los posibles resultados son:

- **score ≥ 2.3** , proporciona una “identificación altamente probable a nivel de especie”
- **$2.0 \leq \text{score} < 2.3$** , indica “identificación segura a nivel de género, probable a nivel de especie”
- **$1.7 \leq \text{score} < 2.0$** , indica “probable identificación de género”
- **score < 1.7** , proporciona una “identificación no fiable”

A pesar de estas categorías, en la práctica clínica se acepta un *score* ≥ 2.0 como indicativo de correcta identificación a nivel de especie; asumiendo que a mayor *score*, mayor seguridad de que el resultado obtenido sea el correcto.

La interpretación de los resultados obtenidos al usar nuestra biblioteca implica que como mínimo 2 de las 3 identificaciones de una cepa de *Aspergillus* deben coincidir en la especie y que al menos una de ellas debe tener un *score* ≥ 2.0 para que la identificación sea considerada correcta a nivel de especie o un *score* ≥ 1.7 y < 2.0 para que sea considerada correcta a nivel de género. La obtención de 3 identificaciones diferentes con independencia del *score* obtenido, se considera una identificación errónea.

Determinación de sensibilidad a los antifúngicos mediante dilución en caldo.

El método de dilución en caldo es el método de referencia para determinar la sensibilidad *in vitro* de levaduras y hongos filamentosos a los fármacos antifúngicos.

Los métodos de CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) y EUCAST son los más difundidos y de los que se disponen más estudios de validación. Ambos métodos son muy similares, diferenciándose en: concentración de glucosa del medio de cultivo, forma del fondo de la microplaca, inóculo, tipo de lectura y tiempo de incubación. Los resultados obtenidos por ambos métodos son muy

similares, aunque las CMIs obtenidas por EUCAST son sistemáticamente 1 ó 2 diluciones más bajas.

En este estudio se siguieron las directrices del documento “E.DEF 9.3 *Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds*” (79) de EUCAST.

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado es el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico (MOPS) 0.165 M, ajustado a un pH 7.0 y suplementado con glucosa en una concentración final del 2%. Los componentes y modo de preparación están especificados en el apartado de “Materiales”.

Preparación de la disolución madre de antifúngico

El polvo valorado de los antifúngicos anidulafungina, caspofungina, posaconazol y voriconazol fue obtenido directamente del fabricante. La anfotericina B fue obtenida a través de una fuente comercial. En todos los casos, el antifúngico fue suministrado con la potencia del polvo valorado.

Dado que partíamos de pequeñas cantidades de antifúngicos (menos de 100 mg, cantidad mínima recomendada para pesar), hicimos los cálculos en función del volumen de disolvente necesario para conseguir las disoluciones madre a la concentración requerida, que en este caso era 200 veces superior con respecto a la concentración más alta que se iba a probar.

La cantidad de disolvente necesario para preparar una disolución madre se calcula como sigue:

$$\text{Volumen (L)} = \frac{\text{Peso (g)} \times \text{Potencia (mg/g)}}{\text{Concentración (mg/L)}}$$

En la tabla 9 se recogen las concentraciones deseables de los antifúngicos que utilizamos, así como el disolvente más adecuado para cada uno de ellos.

Tabla 9. Disolventes para la preparación de las disoluciones madre, concentración de las mismas e intervalo de concentración adecuado para llevar a cabo los estudios de sensibilidad antifúngica.

Antifúngico	Disolvente	Concentración de la disolución madre (mg/L)	Rango de concentraciones (mg/L)
Anfotericina B	DMSO	3200	0.0312-16
Anidulafungina	DMSO	3200	0.0312-16
Caspofungina	DMSO	3200	0.0312-16
Posaconazol	DMSO	1600	0.0156-8
Voriconazol	DMSO	3200	0.0312-16

DMSO, dimetilsulfóxido

Una vez preparadas las disoluciones madres, se reparten en alícuotas de 1 mL y se congelan a -70°C hasta su utilización (máximo 6 meses o 2 meses para las equinocandinas).

Preparación de las diluciones de antifúngico

Los pasos para preparar las disoluciones de trabajo de antifúngico (a una concentración final de 2x) fueron (figura 22):

- Tomar un tubo de antifúngico del congelador de -70°C .
- Rotular diez tubos de vidrio del 1 al 10. 1 Añadir 300 μL de la disolución madre de antifúngico (200x) al tubo número 1 y añadir 150 μL de DMSO al resto de los tubos (del 2 al 10). A continuación, transferir 150 μL del tubo 1 al 2. Repetir este paso hasta llegar al tubo número 10, tras el cual se desecharán los últimos 150 μL para que todos los tubos queden con el mismo volumen. Los tubos quedan de esta manera con una concentración de antifúngico 200 veces superior a la deseada.
- Rotular diez tubos de vidrio del 1 al 10. Añadir a cada uno de ellos 9.9 mL de RPMI 2% G (2x). A continuación, transferir 100 μL de cada uno de los tubos del paso anterior al respectivo tubo nuevo. Finalmente, tras realizar una dilución 1:100 de las disoluciones anteriores, los tubos quedan con una concentración de antifúngico 2 veces superior a la deseada.

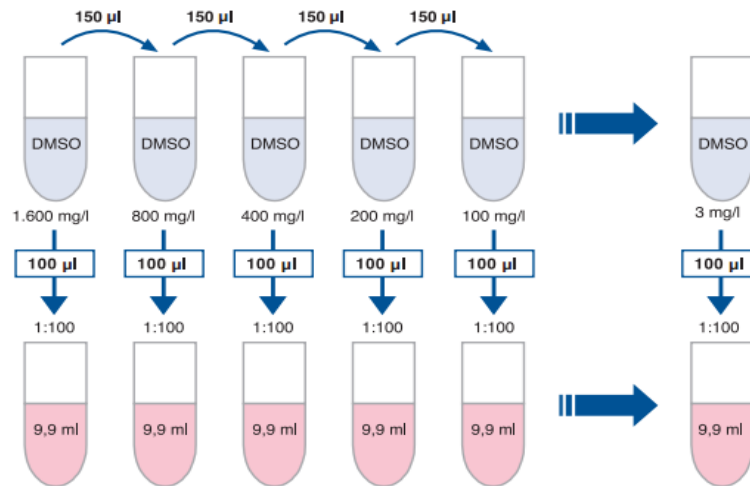


Figura 22. Preparación de las disoluciones de trabajo de antifúngicos hidrófobos (disolvente: DMSO). Disolución madre de 1600 mg/L, a modo de ejemplo. Adaptado de: Cantón *et al.* (81)

Preparación de las placas de microdilución

Se utilizan placas desechables, estériles, de 96 pocillos, con fondo plano y con una capacidad de unos 300 µL aproximadamente. Para cada columna del 1 al 10 se dispensan 100 µL de cada uno de los tubos que contienen el agente antifúngico (2x), de tal manera que con el tubo número 1 se rellenarán los pocillos de la columna número 1 y así sucesivamente. De este modo cada pocillo de las columnas 1 a 10 contendrá 100 µL de antifúngico a concentración 2x (en medio RPMI 2% G al 2x y MOPS 1%). Los pocillos de las columnas 11 y 12 de las placas de microdilución se llenan con 100 µL del medio RPMI 2% G (2x) (figura 23).

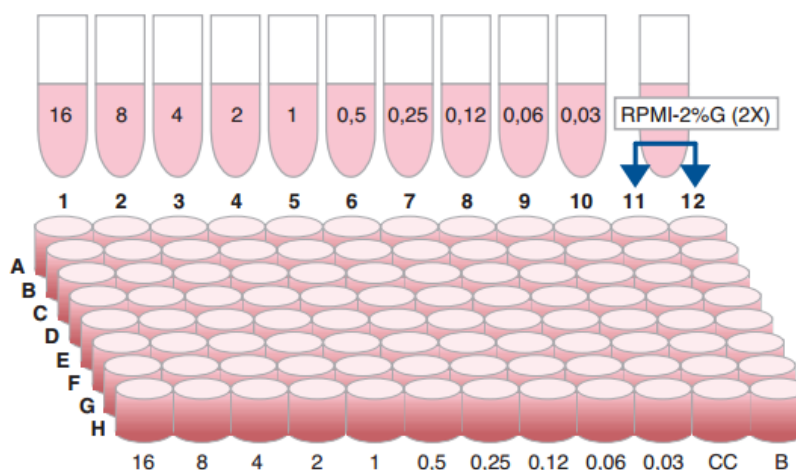


Figura 23. Modo de llenado de las placas de microdilución. Adaptado de: Cantón *et al.* (81)

Preparación del inóculo

El inóculo final debe tener entre 1.5×10^5 UFC/mL y 2.5×10^5 UFC/mL, que se obtiene a partir de un cultivo de 5 días de crecimiento a 35°C en agar patata dextrosa u otro medio de cultivo donde el hongo sea capaz de esporular con facilidad, como por ejemplo agar Sabouraud dextrosa (utilizado en este estudio). Los pasos a seguir son:

- Introducir el asa de cultivo en Tween 20 y después pasarla por la superficie de las colonias.
- Resuspender en agua destilada estéril y homogenizar la suspensión durante 15 segundos con un vórtex a 2,000 rpm.
- Realizar las diluciones necesarias hasta conseguir una concentración de $2-5 \times 10^6$ UFC/mL en una cámara de recuento. Después diluir la suspensión a 1:10 con agua destilada estéril hasta obtener el inóculo de trabajo de $2-5 \times 10^5$ UFC/mL.

En nuestro estudio hicimos uso de la cámara de recuento “Kova® Slide 10 with grids” (figura 24). Se presenta como una lámina portaobjetos que contiene 10 cámaras individuales con retículos cuadriculados. Cada retículo está compuesto por 9 sub-retículas, cada una de las cuales está subdividida a su vez en 9 cuadrados pequeños. El volumen de cada retículo es de $1 \mu\text{L}$ (1 mm^3). Siguiendo las instrucciones del fabricante, el número total N de conidias por μL localizadas en el interior de un retículo se calcula como sigue:

$$N = n \text{ (n}^\circ \text{ de conidias en la cuadrícula)} \times 81 \text{ (n}^\circ \text{ total de cuadrículas que tiene el retículo)} \times 1.1 \text{ (factor de corrección por líneas que delimitan la superficie)} \approx n \times 90 = \text{UFC}/\mu\text{L}$$

Contando una media de 23-57 conidias/cuadrícula, estaremos ante una suspensión de $2-5 \times 10^3$ UFC/ μL , o de $2-5 \times 10^6$ UFC/ mL.

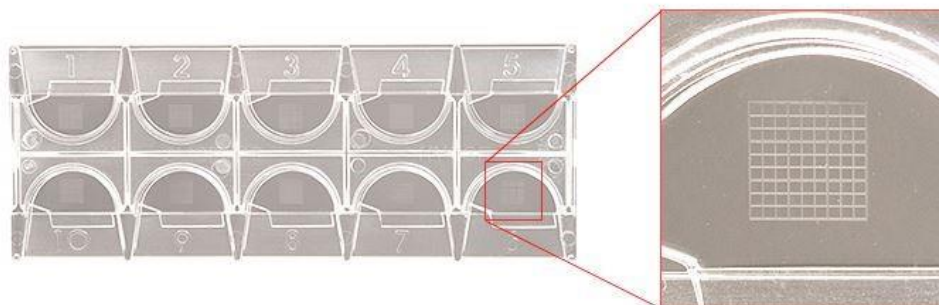


Figura 24. Portaobjetos Kova®-Slide 10 con retículos.

Inoculación de las placas de microdilución

- Inocular con 100 µL de la suspensión de conidias cada pocillo de la placa. De este modo se diluyen a la mitad, tanto la concentración del antifúngico como del inóculo (1×10^5 UFC/mL- 2.5×10^5 UFC/mL).
- Inocular con 100 µL de la suspensión de conidias en los pocillos de la columna 11 (control de crecimiento).
- Rellenar con 100 µL del agua destilada estéril, del lote empleado para preparar el inóculo, los pocillos de la columna 12 (control de esterilidad o blanco).

Incubación de las placas de microdilución

Las placas de microdilución se incuban sin agitación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas.

Lectura e interpretación de los resultados

Los puntos finales se leen visualmente mediante un espejo de aumento, registrando el grado de crecimiento para cada pocillo.

Se valoran dos tipos de puntos finales:

- Concentración mínima inhibitoria (CMI), para todos los fármacos excepto las equinocandinas, y que representa la concentración de fármaco que no produce crecimiento.
- Concentración mínima efectiva (CME), sólo para las equinocandinas, y que representa la concentración más baja del fármaco que produce un crecimiento aberrante del hongo filamentoso, es decir, da lugar a colonias pequeñas, redondas y compactas, en comparación con el crecimiento de hifas en el pocillo control que no contiene el fármaco antifúngico.

La interpretación de las CMIs es un reto, aun así EUCAST en su documento “*Antifungal Agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.1*” (70) ha establecido puntos de corte para diversos antifúngicos como anfotericina B, isavuconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol, y algunas especies de *Aspergillus* (69,82). Todavía no se dispone de datos que sugieran una correlación entre la CME de las equinocandinas y el resultado del tratamiento.

La interpretación de las CIMs para otros hongos filamentosos en ausencia de puntos de corte es un desafío y se debe realizar cuidadosamente teniendo en cuenta todos los datos disponibles; incluyendo la experiencia clínica, la exposición al fármaco durante la terapia, etc.

Cepas control de calidad

Se usaron indistintamente las dos cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection-ATCC*) como control de calidad, incluyendo una de ellas por placa de microdilución realizada. Las cepas control utilizadas en este estudio, así como los intervalos de CMI's aceptables están recogidas en la tabla 10.

Tabla 10. Intervalos de referencia a los antifúngicos (mg/L) de las cepas utilizadas como control de calidad (83).

Fármaco antifúngico	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Aspergillus flavus</i>	
	ATCC 204305		ATCC 204304	
	CMI ó CME (mg/L)			
	Diana	Rango	Diana	Rango
Anfotericina B	0.5	0.25-1.0	1.0	0.5-2.0
Anidulafungina	ND	ND	ND	ND
Caspofungina	ND	ND	ND	ND
Posaconazol	0.06-0.125	0.03-0.25	0.25	0.125-0.5
Voriconazol	0.5	0.25-1.0	1.0	0.5-2.0

ND, no disponible.

Análisis estadístico

Se realizó el test de Chi cuadrado, con el factor de corrección de continuidad de Yates, para determinar la asociación entre el aislamiento de especies crípticas y el valor clínico de los mismos (clínicamente relevante o colonizante), considerándose que la diferencia era significativa cuando $p < 0.05$.

Resultados

Ampliación y validación de una nueva base de datos
para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF

Aislamiento e identificación de las especies de *Aspergillus*

Identificación a nivel fenotípico

Los aislamientos fueron identificados por sus características morfológicas como *A. fumigatus* (n=161), *A. flavus* (n= 67), *A. niger* (n=59), *A. terreus* (n=53), *A. nidulans* (n=4), *A. versicolor* (n=1) and *Aspergillus* spp. (n=34); (figura 25).

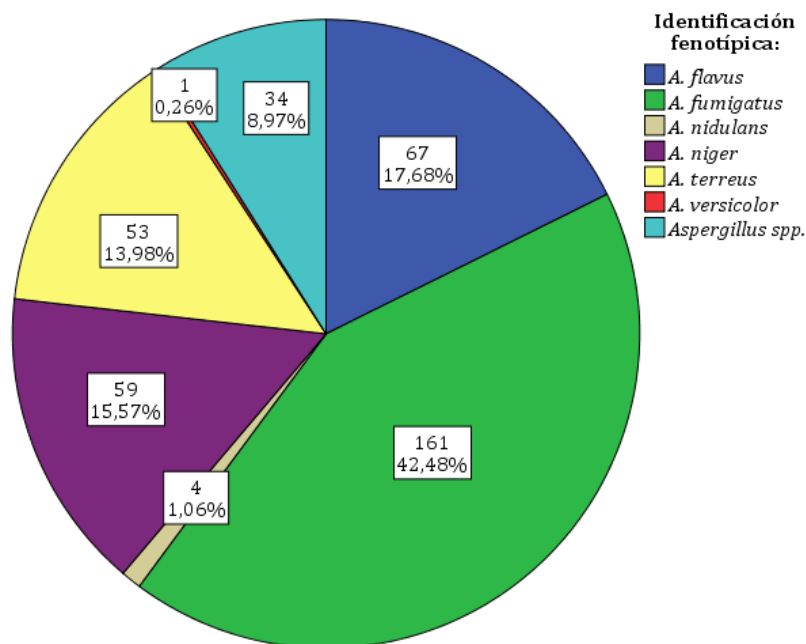


Figura 25. Identificación fenotípica de *Aspergillus* spp. (n=379).

Identificación a nivel genotípico

La identificación de aislamientos fúngicos por medio de la biología molecular ha permitido descubrir especies fúngicas no diferenciables a partir de sus características morfológicas.

La identificación por secuenciación de genes sólo se realizó en 179 (47.23%) cepas, que ofrecían algún tipo de duda en la identificación convencional fenotípica, o bien, presentaban características morfológicas infrecuentes o desconocidas.

En las 179 cepas se procedió a la secuenciación del gen de la β -tubulina (*BenA*), realizando la secuenciación del gen de la calmodulina (*CaM*) para aquellas cepas que no pudieron ser identificadas o lo fueron como especies crípticas. En la tabla 11 se recogen los resultados de identificación por secuenciación de las 179 cepas estudiadas de *Aspergillus* y en la tabla 12 se comparan dichos resultados con los obtenidos por identificación fenotípica.

Resultados

Las especies con un mayor número de aislamientos fueron *A. fumigatus* con 47 (26.25%) y *A. flavus* con 46 (25.7%) aislamientos cada una; seguidas de *A. terreus* con 31 (17.32%), *A. tubingensis* con 16 (8.93%) y *A. niger* con 15 (8.38%). El resto de las especies identificadas tuvieron menos de 5 representantes cada una.

Tabla 11. Aislamientos de *Aspergillus* (n=179) identificados por secuenciación.

Subgénero	Sección	Nº aislamientos (%)	Identificación por secuenciación	Diana	Nº acceso GenBank
Fumigati	<i>Fumigati</i>	47(26.25%)	<i>A. fumigatus</i>	β -tubulina	KF921489, DQ438532, KF921476, KP784370, KU198177, KJ527255, KX165400, KU885422, KU737561
		1(0.56%)	<i>A. lentulus</i>	β -tubulina	AB910085
		1(0.56%)	<i>Neosartorya fischeri</i>	β -tubulina	EF669828
Circumdati	<i>Flavi</i>	46(25.7%)	<i>A. flavus</i>	β -tubulina	KJ482657, KJ482657, KT354304, HQ400610, KT354304, KT275168, KU737557, KX306819
		3(1.68%)	<i>A. minisclerotigenes</i>	β -tubulina	JX456195
		1(0.56%)	<i>A. nomius</i>	β -tubulina	KJ767725
		3(1.68%)	<i>A. tamaraii</i>	β -tubulina	KP067209, KP641150, KJ767722
	<i>Nigri</i>	15(8.38%)	<i>A. niger</i>	β -tubulina	KJ136073, KT805426, KM502177, HQ632737, LN482544, KT354315, HQ632737, KT965696, KT149875, KT965691
		16(8.93%)	<i>A. tubingensis</i>	β -tubulina	LC000547, KT965707, KT354311, KT965718, KR064543, KJ938412
	<i>Circumdati</i>	1(0.56%)	<i>A. ochraceus</i>	β -tubulina	KR737581
		1(0.56%)	<i>A. persii</i>	β -tubulina	KT253228
		1(0.56%)	<i>A. pseudoelegans</i>	β -tubulina	EU014095
	Terrei	<i>Terrei</i>	31(17.32%)	<i>A. terreus</i>	β -tubulina
Nidulantes	<i>Versicolores</i>	1(0.56%)	<i>A. creber</i>	β -tubulina	KP329888
		1(0.56%)	<i>A. sydowii</i>	β -tubulina	KT253232
		1(0.56%)	<i>A. tabacinus</i>	Calmodulina	LT594402
	<i>Nidulantes</i>	2(1.12%)	<i>A. nidulans</i>	β -tubulina	KP278196
		5(2.79%)	<i>A. quadrilineatus</i>	Calmodulina	KU866794, KU866777, EF591681
		1(0.56%)	<i>A. rugulosus</i>	Calmodulina	KU866801
	<i>Usti</i>	1(0.56%)	<i>A. calidouustus</i>	β -tubulina	KJ777803

Tabla 12. Identificación por métodos fenotípicos y por secuenciación de las 179 cepas estudiadas.

Especies	Nº de cepas identificadas fenotípicamente	Nº de cepas que coinciden con la secuenciación	Nº de cepas que no coinciden con la secuenciación	Identificación de las especies que no coinciden
<i>A. flavus</i>	43	39	4	1 <i>A. minisclerotigenes</i> 3 <i>A. tamarii</i>
<i>A. fumigatus</i>	41	40	1	1 <i>A. lentulus</i>
<i>A. nidulans</i>	3	1	2	2 <i>A. quadrilineatus</i>
<i>A. niger</i>	31	15	16	16 <i>A. tubingensis</i>
<i>A. terreus</i>	26	26	0	-
<i>A. versicolor</i>	1	0	1	1 <i>A. tabacinus</i>
<i>Aspergillus spp.</i>	34	-	-	*

*1 *A. calidouustus*, 1 *A. creber*, 7 *A. flavus*, 7 *A. fumigatus*, 2 *A. minisclerotigenes*, 1 *A. nidulans*, 1 *A. nomius*, 1 *A. ochraceus*, 1 *A. persii*, 1 *A. pseudoelegans*, 3 *A. quadrilineatus*, 1 *A. rugulosus*, 1 *A. sydowii*, 5 *A. terreus* y 1 *Neosartorya fischeri*.

Se identificaron 20 especies diferentes del género *Aspergillus*, pertenecientes a 8 secciones distintas:

-Sección *Fumigati*:

- 47 *A. fumigatus*
- 1 *A. lentulus*
- 1 *Neosartorya fischeri*

- Sección *Flavi*:

- 46 *A. flavus*
- 3 *A. minisclerotigenes*
- 1 *A. nomius*
- 3 *A. tamarii*

- Sección *Nigri*:

- 15 *A. niger*
- 16 *A. tubingensis*

- Sección *Terrei*:

- 31 *A. terreus*

- Sección *Nidulantes*:

- 2 *A. nidulans*
- 5 *A. quadrilineatus*
- 1 *A. rugulosus*

- Sección *Versicolores*:

- 1 *A. creber*
- 1 *A. sydowii*
- 1 *A. tabacinus*

- Sección *Circumdati*:

- 1 *A. ochraceus*
- 1 *A. pseudoelegans*
- 1 *A. persii*

- Sección *Usti*:

- 1 *A. calidoustus*

De las 20 especies distintas identificadas, 14 (70%) fueron especies crípticas y sólo 6 (30%) fueron especies no crípticas. Las especies crípticas incluyeron: *A. calidoustus*, *A. creber*, *A. lentulus*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. persii*, *A. pseudoelegans*, *A. quadrilineatus*, *A. rugulosus*, *A. sydowii*, *A. tabacinus*, *A. tamarii*, *A. turingensis* y *Neosartorya fischeri*. Las especies no crípticas estuvieron representadas por: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus* y *A. terreus*.

Del total de las especies identificadas, 17 lo fueron por secuenciación parcial del gen β -tubulina y sólo 3 especies, correspondientes a 7 cepas (5 *A. quadrilineatus*, 1 *A. rugulosus* y 1 *A. tabacinus*), fueron exclusivamente identificadas por secuenciación del gel Calmodulina (tabla 13). Todas las especies crípticas fueron confirmadas por una segunda secuenciación del gen de la Calmodulina.

En resumen, 172 (92%) cepas fueron identificadas por secuenciación parcial del gen β -tubulina, mientras que las 7 (8%) cepas restantes fueron exclusivamente identificadas por secuenciación del gen de la Calmodulina.

Tabla 13. Identificación de especies crípticas por secuenciación.

Especie críptica identificada (n)	Nº acceso GeneBank	
	β -tubulina	Calmodulina
<i>A. lentulus</i> (1)	AB910085	KJ775274
<i>Neosartorya fischeri</i> (1)	EF669828	DQ438599
<i>A. minisclerotigenes</i> (3)	JX456195	JX456212
<i>A. nomius</i> (1)	KJ767725	KP330060
<i>A. tamaritii</i> (3)	KP067209, KP641150, KJ767722	KX400732
<i>A. tubingensis</i> (16)	LC000547, KT965707, KT354311, KT965718, KR064543, KJ938412	KR824169, KR064411, KR064445, KR064393
<i>A. persii</i> (1)	KT253228	FJ491559
<i>A. pseudoelegans</i> (1)	EU014095	FJ491553
<i>A. creber</i> (1)	KP329888	LT594393
<i>A. sydowii</i> (1)	KT253232	KU554605
<i>A. tabacinus</i> (1)	*	LT594402
<i>A. quadrilineatus</i> (5)	*	KU866794, KU866777, EF591681
<i>A. rugulosus</i> (1)	*	KU866801
<i>A. calidoustus</i> (1)	KJ777803	LT558757

*Identificación no obtenida.

EM MALDI-TOF:

Biblioteca original (Filamentous Fungi Library 1.0)

La biblioteca de hongos filamentosos incluida en el *software* Bruker MALDI Biotyper, Filamentous Fungi Library 1.0, aporta 89 entradas correspondientes a 18 especies diferentes del género *Aspergillus*: 11 especies no crípticas (*A. candidus*, *A. clavatus*, *A. A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. ustus* y *A. versicolor*) y 7 especies crípticas (*A. amstelodami*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sclerotiorum*, *A. tamaritii* y *A. unguis*) (tabla 14).

Biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR

A partir de las 179 cepas estudiadas y teniendo en cuenta las especies de *Aspergillus* introducidas en la biblioteca propia del *software* Bruker MALDI Biotyper, Filamentous Fungi Library 1.0, se seleccionaron 42 cepas para crear nuestra nueva biblioteca (Hongos Filamentosos-HUVR).

En las 42 cepas seleccionadas quedan representadas todas las especies, incluyendo las crípticas. A excepción de *A. tubingensis* de la que sólo se incluyeron 5 de las 16 cepas (número suficiente para una correcta identificación), se introdujeron la totalidad de las cepas crípticas identificadas. Respecto a las especies no crípticas, se incluyeron hasta un máximo de 5 cepas por especie, que ya estaban representadas en la biblioteca original de Bruker.

Nuestra biblioteca se completó con 11 cepas de referencia (tabla 5), que también se utilizaron como control de calidad en la confección de la misma. Estas cepas representan 9 especies diferentes, de las cuales 3 [*Aspergillus oryzae* var. *oryzae* ATCC 1011 (CECT 2094), *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517 (CECT 2680) y *Aspergillus versicolor* ATCC 42039 (CECT 1544)] son las únicas representantes de la base de datos.

Finalmente, la biblioteca quedó formada por 53 entradas que comprenden (tabla 15):

- 42 procedentes de las cepas secuenciadas
- 11 procedentes de cepas de referencia

incluyendo 23 especies diferentes de 8 secciones:

- 16 especies crípticas (con 30 entradas)
- 7 especies no crípticas (con 23 entradas).

Tabla 14. Especies de *Aspergillus* incluidas en la biblioteca Filamentous Fungi Library 1.0 (Bruker Daltonik).

Filamentous Fungi Library 1.0 (Bruker Daltonik)			
Subgénero	Sección	Especies	Nº entradas
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. glaucus</i>	3
		<i>A. amstelodami</i>	1
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	12
	<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	1
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	4
		<i>A. sclerotiorum</i>	1
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	12
	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	7
		<i>A. nomius</i>	1
		<i>A. tamarii</i>	1
		<i>A. parasiticus</i>	3
		<i>A. oryzae</i>	4
<i>Candidi</i>	<i>Candidi</i>	<i>A. candidus</i>	6
<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	10
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	9
		<i>A. unguis</i>	2
	<i>Versicolores</i>	<i>A. versicolor</i>	10
	<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	2

Las especies sombreadas son exclusivas de esta biblioteca, no encontrándose en Hongos Filamentosos-HUVR.

Tabla 15. Aislamientos de *Aspergillus* usados para construir la base de datos Hongos Filamentosos-HUVR.

Biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR			
Subgénero	Sección	Especies	Nº total de aislamientos incluidos (Nº de cepas de referencia) ^a
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	5 (2)
		<i>A. lentulus</i>	1
		<i>Neosartorya fischeri</i>	1
<i>Circumdati</i>	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	5 (2)
		<i>A. minisclerotigenes</i>	3
		<i>A. nomius</i>	1
		<i>A. oryzae</i>	1 (1)
		<i>A. parasiticus</i>	1 (1)
		<i>A. tamarii</i>	4 (1)
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	4 (1)
		<i>A. tubingensis</i>	6 (1)
	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	1
		<i>A. persii</i>	1
		<i>A. pseudoelegans</i>	1
	<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Versicolores</i>	<i>A. creber</i>	1
		<i>A. sydowii</i>	1
		<i>A. tabacinus</i>	1
		<i>A. versicolor</i>	1 (1)
	<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	2
		<i>A. quadrilineatus</i>	5
		<i>A. rugulosus</i>	1
	<i>Usti</i>	<i>A. calidouustus</i>	1

Las especies sombreadas son exclusivas de esta biblioteca, no encontrándose en Filamentous Fungi Library 1.0 (Bruker Daltonik).

^a Cepas de referencia: *Aspergillus flavus* ATCC 76668 (CECT 2686), *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Aspergillus fumigatus* var. *fumigatus* ATCC 16907 (CECT 20228), *Aspergillus niger* ATCC 9029 (CECT 2088), *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* ATCC 1011 (CECT 2094), *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517 (CECT 2680), *Aspergillus tamarii* CECT 20399, *Aspergillus terreus* var. *terreus* ATCC 10690 (CECT 2808), *Aspergillus tubingensis* ATCC 11394 (CECT 2089) y *Aspergillus versicolor* ATCC 42039 (CECT 1544).

Dendograma de la biblioteca propia.

En el siguiente Dendograma (figura 26), podemos observar la agrupación de las distintas especies que se utilizaron para la elaboración de nuestra biblioteca.

Se compone de 53 entradas, agrupadas en 8 secciones diferentes, donde se distinguen 20 especies distintas.

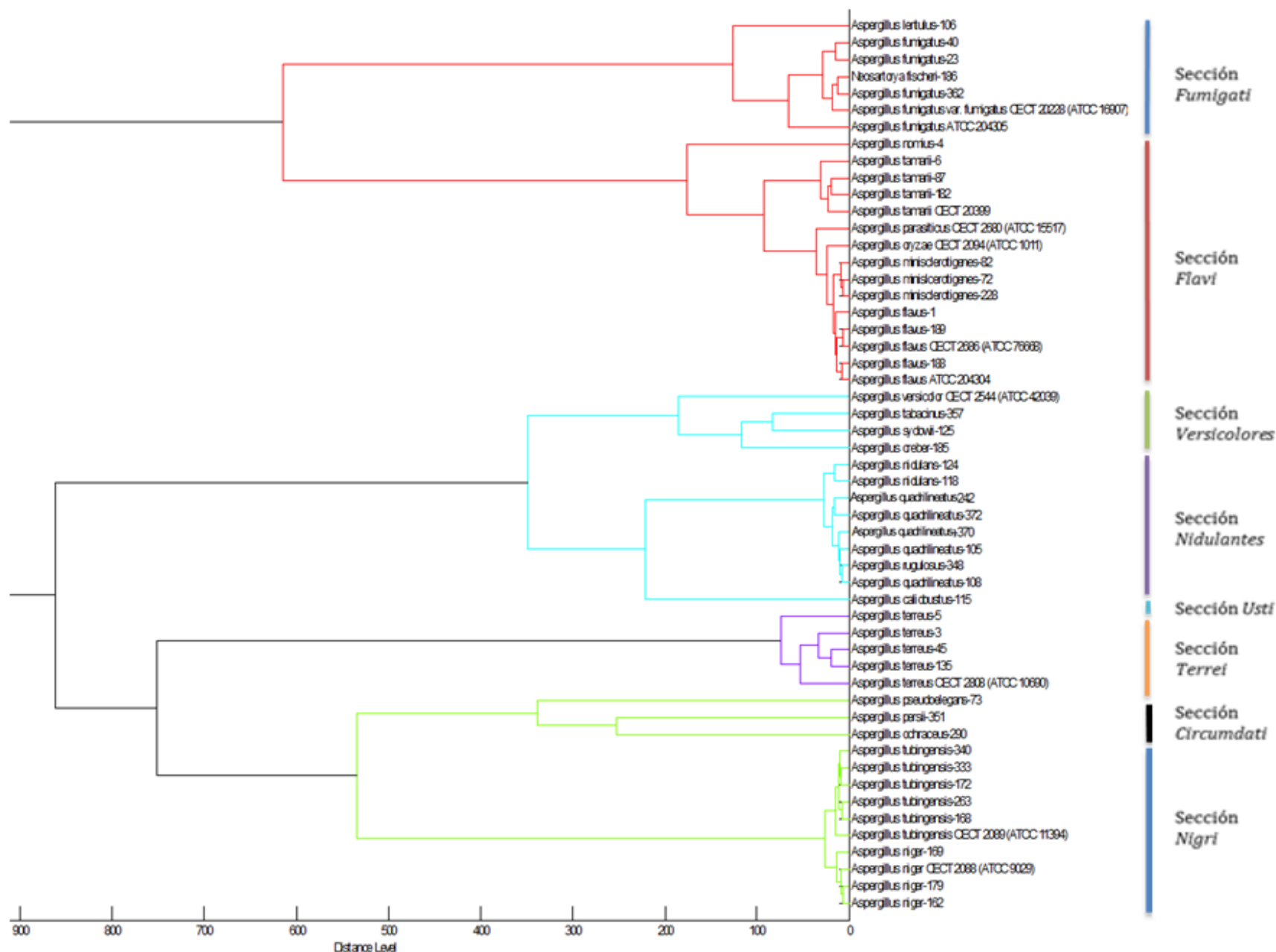


Figura 26. Dendrograma de las especies incluidas en la biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR.

Comparación de ambas bibliotecas

La biblioteca original incluye 89 entradas de *Aspergillus* spp., a diferencia de la propia que sólo incluye 53. A pesar de esta diferencia en el número de entradas, la biblioteca original aporta 7 especies de manera exclusiva: 4 no crípticas y 3 crípticas. La biblioteca propia aporta 12 especies exclusivas, todas ellas especies crípticas. Éstas suponen el 69.6% de la biblioteca propia en comparación con el 38.9% de la biblioteca original. Respecto a las especies no crípticas, la biblioteca original incluye 11, mientras que la propia sólo incluye 7 que a su vez ya están incluidas en la original. Finalmente, son 11 las secciones representadas en la original y 8 en la propia.

La suma de ambas bibliotecas queda formada por 142 entradas que representan 30 especies distintas de 11 secciones diferentes: 11 especies no crípticas y 19 especies crípticas; representando estas últimas el 63.3% del total (tabla 16).

Tabla 16. Características de las entradas que componen la biblioteca original (Filamentous Fungi Library 1.0) y la biblioteca propia (Hongos Filamentosos-HUVR).

	Filamentous Fungi Library 1.0 (Bruker Daltonik)	Hongos Filamentosos-HUVR	Total
Nº entradas	89	53	142
Nº especies diferentes	18	23	30
Nº secciones	11	8	11
Nº especies no-crípticas diferentes	11	7	11
Nº especies crípticas diferentes	7	16	19
% especies crípticas	38.9%	69.6%	63.3%

En la siguiente tabla (tabla 17) se representan las distintas bibliotecas, mostrando las especies incluidas en cada una de ellas.

Tabla 17. Comparativa de biblioteca original y biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR

		Filamentous Fungi Library 1.0 (Bruker Daltonik)		Hongos Filamentosos-HUVR	
Subgénero	Sección	Especie	Nº entradas	Especie	Nº entradas
Aspergillus	<i>Aspergillus</i>	<i>A. glaucus</i>	3	*	*
		<i>A. amstelodami</i>	1	*	*
Fumigati	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	12	<i>A. fumigatus</i>	5 (2)
		*	*	<i>A. lentulus</i>	1
		*	*	<i>N. fischeri</i>	1
	<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	1	*	*
Circumdati	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	4	<i>A. ochraceus</i>	1
		<i>A. sclerotiorum</i>	1	*	*
		*	*	<i>A. persii</i>	1
		*	*	<i>A. pseudoelegans</i>	1
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	12	<i>A. niger</i>	4 (1)
		*	*	<i>A. tubingensis</i>	6 (1)
	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	7	<i>A. flavus</i>	5 (2)
		<i>A. nomius</i>	1	<i>A. nomius</i>	1
		<i>A. tamarii</i>	1	<i>A. tamarii</i>	4 (1)
		<i>A. parasiticus</i>	3	<i>A. parasiticus</i>	1 (1)
		<i>A. oryzae</i>	4	<i>A. oryzae</i>	1 (1)
		*	*	<i>A. minisclerotigenes</i>	3
	Candidi	<i>Candidi</i>	<i>A. candidus</i>	6	*
Terrei	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	10	<i>A. terreus</i>	5 (1)
Nidulantes	<i>Versicolores</i>	<i>A. versicolor</i>	10	<i>A. versicolor</i>	1 (1)
		*	*	<i>A. sydowii</i>	1
		*	*	<i>A. creber</i>	1
		*	*	<i>A. tabacinus</i>	1

		Filamentous Fungi Library 1.0 (Bruker Daltonik)		Hongos Filamentosos-HUVR	
Subgénero	Sección	Especie	Nº entradas	Especie	Nº entradas
	Nidulantes	<i>A. nidulans</i>	9	<i>A. nidulans</i>	2
		<i>A. unguis</i>	2	*	*
		*	*	<i>A. rugulosus</i>	1
		*	*	<i>A. quadrilineatus</i>	5
	Usti	<i>A. ustus</i>	2	*	*
		*	*	<i>A. calidoustus</i>	1

Se muestran sombreadas las especies que aportan de forma exclusiva cada una de las bibliotecas.

Validación de la biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR

La validación de la base de datos creada fue realizada sobre el total de 190 cepas (179 cepas secuenciadas + 11 cepas de referencia) incluidas en el estudio, que fueron analizadas de forma prospectiva y ciega.

Los resultados obtenidos con nuestra biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR (tabla 18) en la identificación de las 190 cepas crecidas en medio sólido, proporcionaron una identificación a nivel de especie ($score \geq 2.0$) en 165 aislamientos (86.84%). Se identificaron 25 aislamientos (13.16%) a nivel de género ($1.7 \leq score < 2.0$) y no se obtuvieron $scores < 1.7$.

De las 23 especies diferentes incluidas en nuestra base de datos, 18 obtuvieron $score \geq 2.0$, mientras que en las 5 especies restantes (*A. calidoustus*, *A. nomius*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* y *A. persii*) los $scores$ obtenidos fueron ≥ 1.7 y < 2.0 .

En estas 5 especies, se repitió la identificación partiendo esta vez de medio líquido, utilizando el mismo procedimiento que el seguido en la creación de entradas en la biblioteca. Se obtuvieron $scores$ muy superiores, que garantizaban la identificación a nivel de especie, siendo > 2.4 en todos los casos (tabla 19).

Finalmente, se obtuvo una identificación a nivel de especie ($score \geq 2.0$) en 136/149 (91.3%) de las especies no crípticas y en 29/41 (70.7%) de las especies crípticas. En ambos grupos se encontró una identificación a nivel de género ($1.7 \leq score < 2.0$) en 13 (8.7%) cepas y en 12 (29.3%) cepas, respectivamente. Incluso para aquellas identificaciones con $score \geq 1.7$ y < 2.0 , los resultados de EM MALDI-TOF siempre coincidieron con la identificación obtenida en la secuenciación.

Resultados

Tabla 18. Identificación de aislamientos de *Aspergillus* utilizando la biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR.

Subgénero	Sección	Especie (identificación por secuenciación + EM MALDI-TOF) ^a	Nº aislamientos	Score				Nº aislamientos con:		
				Media	Máximo	Mínimo	Desviación estándar	Score <1.7	1.7 ≤ Score <2.0	Score ≥2.0
Fumigati	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	49	2.212	2.563	1.730	0.207	0	3	46
		<i>A. lentulus</i>	1	2.067	2.120	1.980	0.076	0	0	1
		<i>N. fischeri</i>	1	2.242	2.331	2.180	0.079	0	0	1
Circumdati	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	48	2.224	2.674	1.717	0.181	0	1	47
		<i>A. minisclerotigenes</i>	3	1.904	2.110	1.711	0.155	0	1	2
		<i>A. nomius</i>	1	1.659	1.715	1.550	0.094	0	1	0
		<i>A. oryzae</i>	1	2.020	2.040	2.010	0.017	0	0	1
		<i>A. parasiticus</i>	1	1.703	1.750	1.670	0.042	0	1	0
		<i>A. tamaraii</i>	4	2.005	2.325	1.848	0.150	0	1	3
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	16	2.407	2.695	1.445	0.202	0	0	16
		<i>A. tubingensis</i>	17	2.219	2.632	1.815	0.227	0	3	14
	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	1	1.884	1.912	1.860	0.026	0	1	0
		<i>A. persii</i>	1	1.933	1.950	1.910	0.021	0	1	0
		<i>A. pseudoelegans</i>	1	1.973	2.010	1.950	0.032	0	0	1
Terrei	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	32	2.056	2.364	1.804	0.171	0	7	25
Nidulantes	<i>Versicolores</i>	<i>A. creber</i>	1	2.618	2.621	2.615	0.003	0	0	1
		<i>A. sydowii</i>	1	2.119	2.150	2.094	0.028	0	0	1
		<i>A. versicolor</i>	1	2.023	2.110	1.970	0.076	0	0	1
		<i>A. tabacinus</i>	1	2.010	2.050	1.970	0.057	0	0	1
	<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	2	2.148	2.316	1.818	0.225	0	1	1
		<i>A. quadrilineatus</i>	5	1.990	2.180	1.830	0.126	0	3	2
		<i>A. rugulosus</i>	1	2.043	2.060	2.030	0.015	0	0	1
<i>Usti</i>	<i>A. calidoustus</i>	1	1.940	1.990	1.890	0.071	0	1	0	

^a Este grupo incluye 190 aislamientos (179 cepas clínicas + 11 cepas de referencia) identificadas por secuenciación y EM MALDI-TOF. En todos los casos hubo concordancia entre ambos métodos.

Tabla 19. Comparación de *scores* obtenidos tras identificación a partir de medio sólido y líquido.

Especies identificadas por secuenciación	Identificación por EM MALDI-TOF (Hongos Filamentosos-HUVR)			
	Especie/ <i>score</i> (a partir de medio sólido)		Especie/ <i>score</i> (a partir de medio líquido)	
<i>A. calidoustus</i>	<i>A. calidoustus</i>	1.990	<i>A. calidoustus</i>	2.43
<i>A. nomius</i>	<i>A. nomius</i>	1.715	<i>A. nomius</i>	2.63
<i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i>	1.912	<i>A. ochraceus</i>	2.45
<i>A. parasiticus</i>	<i>A. parasiticus</i>	1.750	<i>A. parasiticus</i>	2.43
<i>A. persii</i>	<i>A. persii</i>	1.950	<i>A. persii</i>	2.57

Evaluación prospectiva de la base de datos.

La evaluación prospectiva de nuestra base de datos se realizó con 200 aislamientos clínicos de *Aspergillus* cultivados en medio sólido. Estos aislamientos son distintos de los utilizados en la validación de la base de datos y de las cepas incluidas en la misma (tabla 20).

Se obtuvo una identificación a nivel de especie ($score \geq 2.0$) en 191 cepas (95.5%) y sólo 9 cepas (4.5%) se identificaron a nivel de género ($1.7 \leq score < 2.0$).

Se identificaron especies pertenecientes a 5 secciones (*Flavi*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Nigri* y *Terrei*). Las cepas identificadas a nivel de especie, con *scores* comprendidos entre 2.273 y 2.706 fueron: *A. fumigatus* (n=119), *A. flavus* (n=24), *A. niger* (n=7), *A. tubingensis* (n=19), *A. terreus* (n=21) y *A. nidulans* (n=1); mientras que 2 *A. fumigatus*, 2 *A. tubingensis* y 5 *A. terreus* proporcionaron un *score* ≥ 1.7 y < 2.0 .

Entre los 200 aislamientos clínicos, *A. tubingensis* fue la única especie críptica identificada. Esto fue debido a que todas las especies fenotípicamente desconocidas fueron secuenciadas y, por lo tanto, incluidas en la fase de creación/validación de la biblioteca. La similitud fenotípica entre *A. niger* y *A. tubingensis* nos llevó a considerar todas las cepas como *A. niger*, no siendo secuenciadas en su totalidad. La biblioteca creada en el espectrómetro de masas MALDI-TOF identificó 28 aspergilli de la sección *Nigri*; con *scores* ≥ 2.0 : 19 (67,86%) *A. tubingensis* y 7 (25%) *A. niger*, y con *score* ≥ 1.7 y < 2.0 a 2 cepas como *A. tubingensis*.

Resultados

Tabla 20. Evaluación prospectiva de la biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR.

Subgénero	Sección	Especie (identificación por EM MALDI- TOF) ^b	Nº aislamientos	Score				Nº aislamientos con:		
				Media	Máximo	Mínimo	Desviación estándar	Score <1.7	1.7 ≤ score <2.0	Score ≥2.0
Fumigati	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	121	2.303	2.706	1.714	0.207	0	2	119
Circumdati	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	24	2.275	2.573	1.803	0.201	0	0	24
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	7	2.260	2.512	1.838	0.206	0	0	7
		<i>A. tubingensis</i>	21	2.213	2.683	1.687	0.222	0	2	19
Terrei	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	26	2.150	2.560	1.742	0.230	0	5	21
Nidulantes	<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	1	2.161	2.273	2.056	0.108	0	0	1

^b Este grupo incluye 200 cepas identificadas por EM MALDI-TOF.

Identificación por métodos moleculares de las 379 cepas.

Partimos de una colección de 379 cepas de *Aspergillus*, todas ellas identificadas por el método convencional que se basa en las características fenotípicas (figura 25). Ciento setenta y nueve cepas se identificaron por secuenciación (tabla 11). Una vez creada y validada nuestra biblioteca (Hongos Filamentosos-HUVR), ésta fue usada para la re-identificación de las restantes 200 cepas de la colección.

Los resultados de identificación de nuestra colección de cepas por métodos moleculares (secuenciación y por EM MALDI-TOF) están recogidos en la tabla 21. La distribución de las especies por frecuencia se representa en la figura 27.

Tabla 21. Identificación por métodos moleculares de las 379 cepas de *Aspergillus*.

Especies	Nº aislamientos identificados por secuenciación	Nº aislamientos identificados por MALDI-TOF (Hongos Filamentosos-HUVR)	Nº total de aislamientos
<i>A. fumigatus</i>	47	120	167
<i>A. lentulus</i>	1	0	1
<i>Neosartorya fischeri</i>	1	0	1
<i>A. flavus</i>	46	24	70
<i>A. minisclerotigenes</i>	3	0	3
<i>A. nomius</i>	1	0	1
<i>A. tamaritii</i>	3	0	3
<i>A. niger</i>	15	7	22
<i>A. tubingensis</i>	16	21	37
<i>A. ochraceus</i>	1	0	1
<i>A. persii</i>	1	0	1
<i>A. pseudoelegans</i>	1	0	1
<i>A. terreus</i>	31	27	58
<i>A. creber</i>	1	0	1
<i>A. sydowii</i>	1	0	1
<i>A. tabacinus</i>	1	0	1
<i>A. nidulans</i>	2	1	3
<i>A. quadrilineatus</i>	5	0	5
<i>A. rugulosus</i>	1	0	1
<i>A. calidoustus</i>	1	0	1
Total	179	200	379

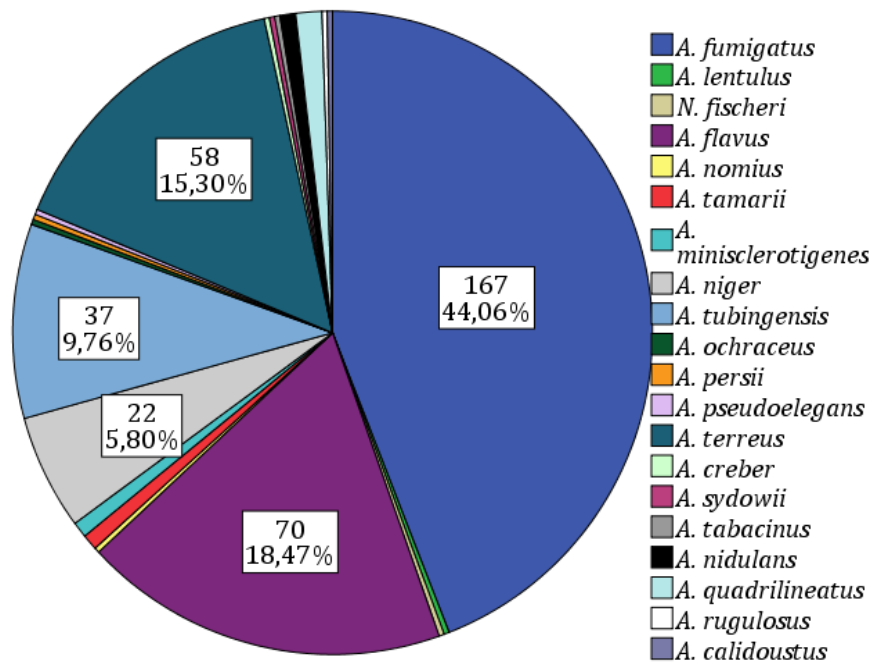


Figura 27. Distribución por frecuencias de las especies de *Aspergillus*.

Comparación entre identificación fenotípica e identificación molecular (secuenciación + EM MALDI-TOF).

Las especies cuya identificación fenotípica y por métodos moleculares coincidieron se exponen en la tabla 22. Destaca *A. terreus* con un 100% de coincidencia, seguido de *A. fumigatus* con un 99.38% y *A. flavus* con 94.03%. En contraposición destaca *A. niger*, coincidiendo tan sólo en el 37.29%, siendo *A. tubingenensis* la especie identificada por métodos moleculares en los casos que no hubo concordancia.

Tabla 22. Identificación por métodos fenotípicos y moleculares de las 379 cepas.

Especies	Nº de cepas identificadas fenotípicamente	Nº de cepas que coinciden con identificación molecular ^a	Nº de cepas que no coinciden con identificación molecular ^a	Identificación de las especies que no coinciden
<i>A. flavus</i>	67	63	4	1 <i>A. minisclerotigenes</i> 3 <i>A. tamarii</i>
<i>A. fumigatus</i>	161	160	1	1 <i>A. lentulus</i>
<i>A. nidulans</i>	4	2	2	2 <i>A. quadrilineatus</i>
<i>A. niger</i>	59	22	37	37 <i>A. tubingensis</i>
<i>A. terreus</i>	53	53	0	-
<i>A. versicolor</i>	1	0	1	1 <i>A. tabacinus</i>
<i>Aspergillus spp.</i>	34	-	-	*

^aIncluimos la identificación por secuenciación y por EM MALDI-TOF.

*1 *A. calidoustus*, 1 *A. creber*, 7 *A. flavus*, 7 *A. fumigatus*, 2 *A. minisclerotigenes*, 1 *A. nidulans*, 1 *A. nomius*, 1 *A. ochraceus*, 1 *A. persii*, 1 *A. pseudoelegans*, 3 *A. quadrilineatus*, 1 *A. rugulosus*, 1 *A. sydowii*, 5 *A. terreus* y 1 *Neosartorya fischeri*.

Descripción de los datos epidemiológicos de las cepas de *Aspergillus* aisladas en el H.U. Virgen del Rocío durante el período 2014-2015.

Durante un período de 2 años se procesaron en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla) un total de 184,558 muestras para cultivo.

Se obtuvieron cultivos positivos para *Aspergillus spp.* en 351 (0.2%) muestras de las procesadas, que pertenecían a 280 pacientes diferentes, aislándose un total de 379 cepas de *Aspergillus*. En 325 muestras se aisló una única especie, mientras que en 26 muestras hubo aislamientos múltiples de *Aspergillus spp.*: 24 muestras con un aislamiento doble y 2 con un aislamiento triple.

La edad media de los pacientes fue de 53.86 años (rango: 1-94). La distribución por sexos según la edad se representa en la siguiente figura (figura 28):

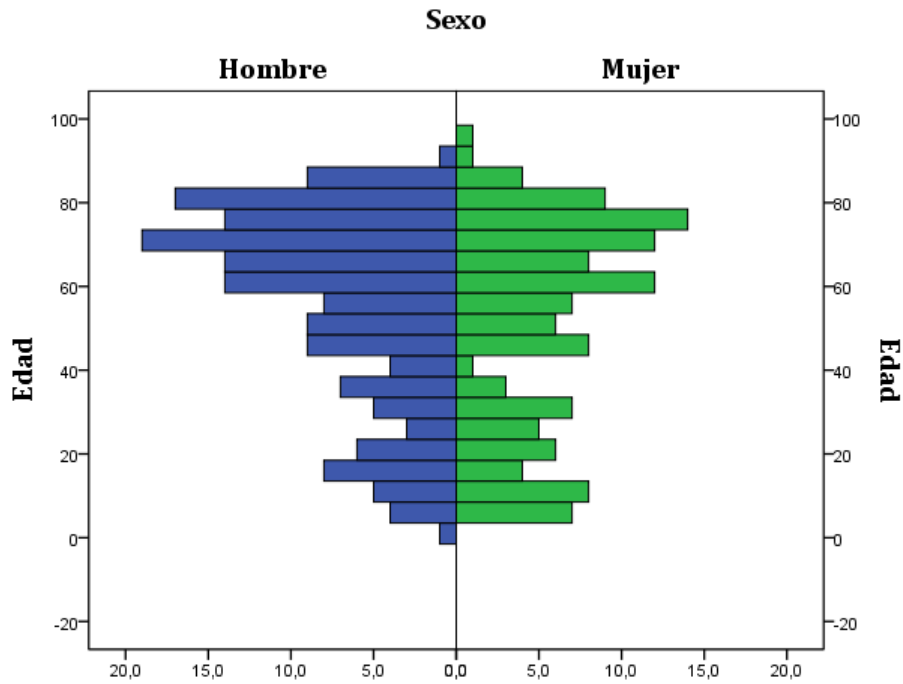


Figura 28. Distribución de los pacientes con aislamientos de *Aspergillus* spp. según sexo y edad.

La enfermedad de base de los pacientes en el momento de la toma de muestra se refleja en la figura 29, predominando los pacientes con enfermedad pulmonar (n=107) y con fibrosis quística (n=49). En el 7.86% de los casos no fue posible obtener esta información.

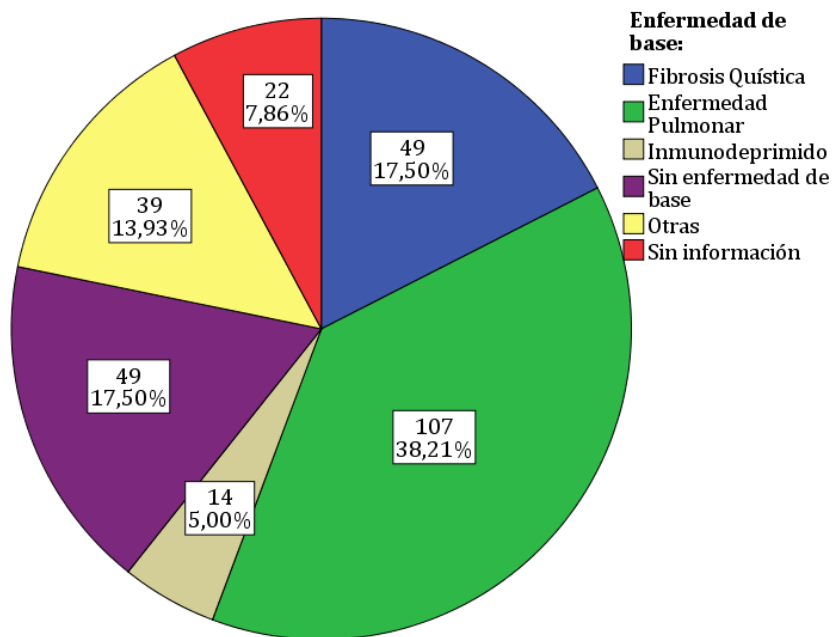


Figura 29. Enfermedad de base de los pacientes con aislamientos de *Aspergillus* spp.

Desglosando las distintas enfermedades pulmonares, que fueron las principales enfermedades de base de los pacientes de este estudio, destacan la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (n=51), el asma bronquial (n=20) y las bronquiectasias (n=15) (figura 30).

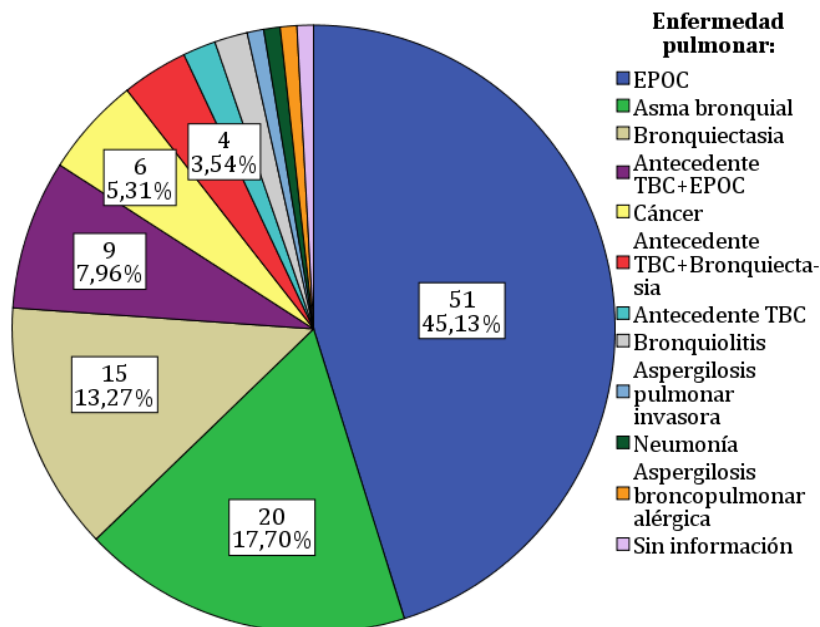


Figura 30. Enfermedades pulmonares de los pacientes con aislamientos de *Aspergillus* spp.

Las 379 cepas fueron aisladas a partir de diferentes tipos de muestras: muestras del tracto respiratorio (n=273), exudados óticos (n=62), escamas de piel/uñas (n=6), exudados faríngeos (n=3), exudado de herida (n=1), biopsia ósea (n=1), exudado conjuntival (n=1), humor vítreo (n=1), drenaje peritoneal (n=1), líquido pleural (n=1) y quemadura (n=1) (figura 31).

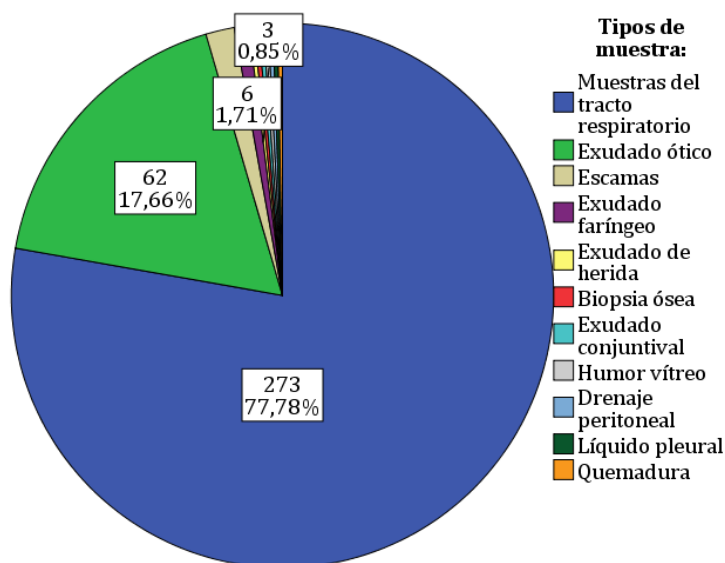


Figura 31. Distribución de las muestras en las que se aislaron *Aspergillus* spp.

Resultados

Un 77.78% de los aislamientos se obtuvo a partir de muestras respiratorias (figura 32): 246 (90.11%) esputos, 13 (4.76%) aspirados transbronquiales, 13 (4.76%) lavados broncoalveolares y 1 (0.37%) cepillado bronquial.

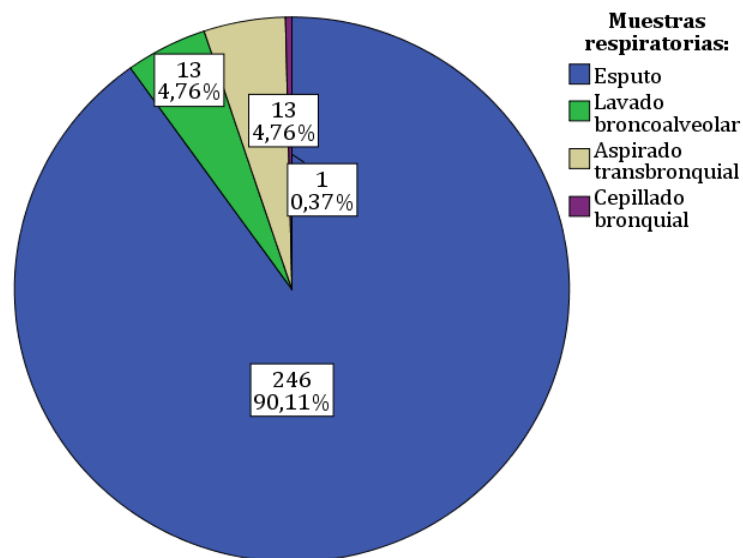


Figura 32. Distribución de las muestras respiratorias en las que se aislaron *Aspergillus* spp.

La distribución de las especies aisladas en función del tipo de muestra se recoge en la siguiente tabla (tabla 23). Se debe tener en cuenta que no siempre coincide el número de muestras con el número de aislamientos, como comentamos anteriormente, debido a la existencia de aislamientos múltiples en algunos casos.

Resultados

Tabla 23. Distribución de los aislamientos clínicos de *Aspergillus* spp. por tipo de muestra.

Tipo de muestra	Nº muestras	Nº aislamientos <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> spp.																				
			<i>A. fumigatus</i>	<i>A. lentulus</i>	<i>N. fischeri</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. minisclerotigenes</i>	<i>A. tamaritii</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. persii</i>	<i>A. pseudoalegans</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. creber</i>	<i>A. sydowii</i>	<i>A. tabacinus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. quadrilineatus</i>	<i>A. rugulosus</i>	<i>A. calidoustus</i>	
Tracto respiratorio	273	300	161	1	1	44			1	11	17	1	1	1	50		1	1	3	4	1	1	
Quemadura	1	1				1																	
Líquido pleural	1	1	1																				
Humor vítreo	1	1	1																				
Exudado ótico	62	63				24		3	1	11	20			3						1			
Exudado faríngeo	3	3	1			1			1														
Exudado de herida	1	1	1																				

Resultados

Tipo de muestra	Nº muestras	Nº aislamientos Aspergillus	<i>Aspergillus</i> spp.																			
			<i>A. fumigatus</i>	<i>A. lentulus</i>	<i>N. fischeri</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. minisclerotigenes</i>	<i>A. tamaritii</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. persii</i>	<i>A. pseudoalegans</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. creber</i>	<i>A. sydowii</i>	<i>A. tabacinus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. quadrilineatus</i>	<i>A. rgulosus</i>	<i>A. calidoustus</i>
Exudado conjuntival	1	1	1																			
Escamas piel/uñas	6	6	1											4	1							
Drenaje peritoneal	1	1												1								
Biopsia ósea	1	1					1															

Para la interpretación de estos aislamientos decidimos seguir los criterios de Alastruey-Izquierdo *et al.* (24) y clasificar a los aislamientos de *Aspergillus* en dos grupos: los clínicamente relevantes, incluyendo los obtenidos en pacientes que recibieron tratamiento antifúngico dirigido; y los colonizantes, que no lo recibieron. Para ello, se revisaron las historias clínicas de los 280 pacientes, examinando los episodios clínicos correspondientes a las 351 muestras. Únicamente en 277 (78.9%) casos se registraron la valoración del aislamiento de *Aspergillus* spp. en las historias clínicas. En 208 (75.1%) muestras los aislamientos fueron considerados como colonizantes y se consideraron como clínicamente relevantes los 69 (24.9%) casos restantes (tabla 24 y figura 33).

Tabla 24. Valoración clínica de los aislamientos de *Aspergillus* spp.

Tipo de muestra	Colonización	Clínicamente relevante	Sin información registrada	Nº total de muestras
Tracto respiratorio	202	31	40	273
Quemadura	0	1	0	1
Líquido pleural	0	0	1	1
Humor vítreo	1	0	0	1
Exudado ótico	0	33	29	62
Exudado faríngeo	3	0	0	3
Exudado de herida	0	0	1	1
Exudado conjuntival	0	1	0	1
Escamas de piel/uñas	2	1	3	6
Drenaje peritoneal	0	1	0	1
Biopsia ósea	0	1	0	1

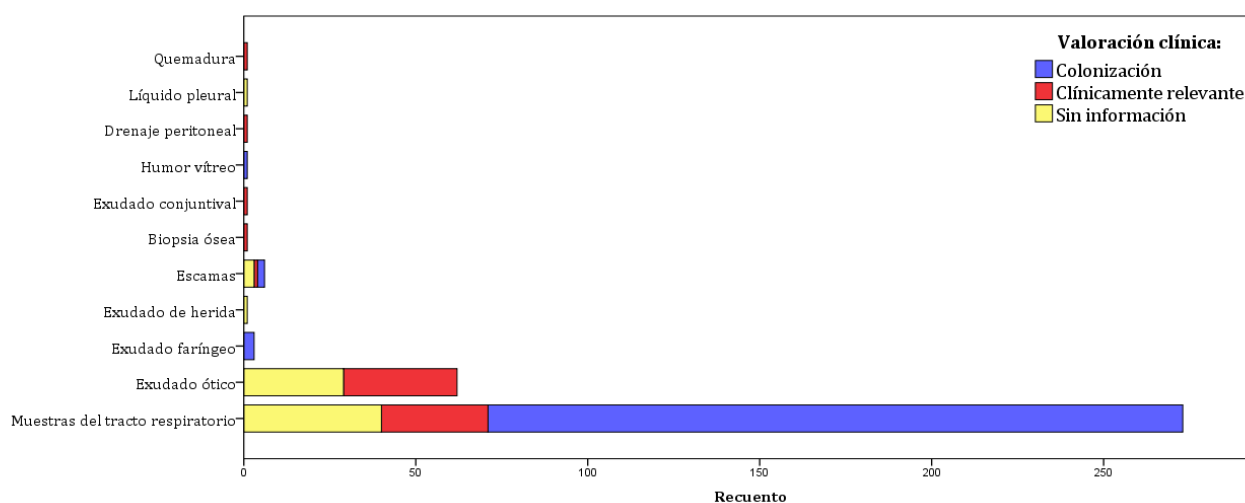


Figura 33. Representación gráfica de la valoración clínica de los aislamientos de *Aspergillus* spp.

Resultados

En los casos en los que la valoración clínica del aislamiento de *Aspergillus* spp. quedó registrada en la historia clínica, se aislaron tanto especies no crípticas como crípticas (tabla 25). El 42.5% (17/40) de las especies crípticas fueron valoradas como clínicamente relevantes frente al 21.7% (54/249) de las no crípticas, diferencia estadísticamente significativa ($p=0.008$) que nos permite afirmar la mayor relevancia clínica del aislamiento de una especie críptica.

Tabla 25. Especies de *Aspergillus* aisladas en los casos con valoración clínica registrada.

Especie de <i>Aspergillus</i>	Valoración clínica		Total
	Clínicamente relevante	Colonizante	
Especie no críptica	54	195	249
Especie críptica	17 ^a	23 ^b	40
Total	71	218	

^a 1 *A. nomius*, 1 *A. minisclerotigenes*, 14 *A. tubingensis* y 1 *A. persii*.

^b 1 *A. lentulus*, 1 *N. fischeri*, 1 *A. tamarii*, 12 *A. tubingensis*, 1 *A. calidoustus*, 1 *A. pseudoelegans*, 1 *A. ochraceus*, 1 *A. tabacinus*, 4 *A. quadrilineatus* y 1 *A. rugulosus*.

Centrándonos de nuevo en el grupo más numeroso de la serie, las muestras respiratorias, los resultados desglosados se muestran en la siguiente tabla (tabla 26) y figura (figura 34):

Tabla 26. Valoración clínica de los aislamientos de *Aspergillus* spp. en los diferentes tipos de muestras respiratorias.

Tipo de muestra respiratoria	Colonización	Clínicamente relevante	Sin información registrada	Nº total de muestras
Esputo	194	18	34	246
Lavado broncoalveolar	2	9	2	13
Aspirado transbronquial	6	4	3	13
Cepillado bronquial	0	0	1	1

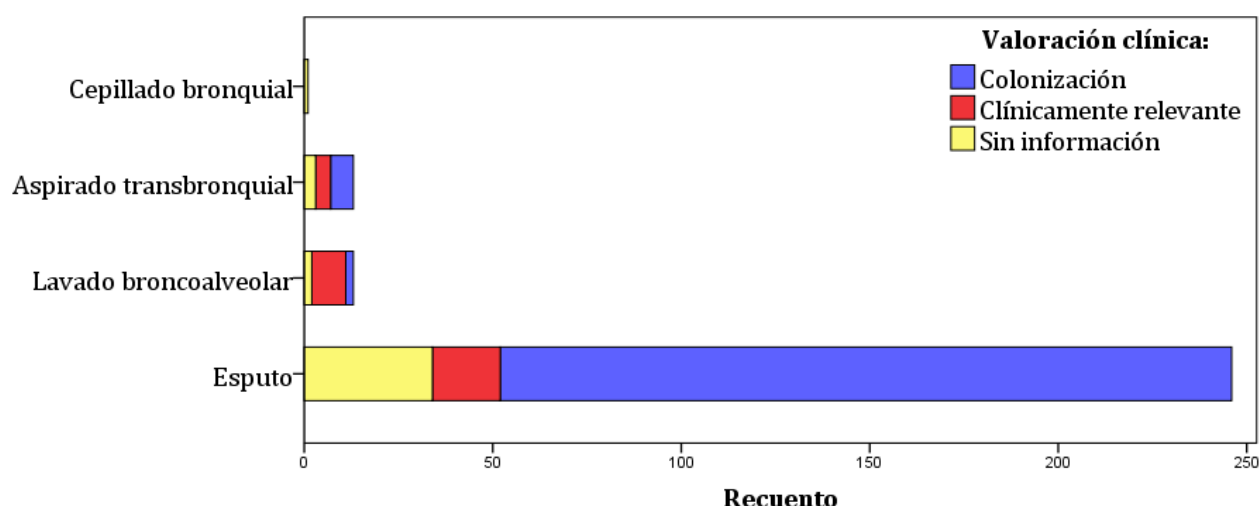


Figura 34. Representación gráfica de la valoración clínica de los aislamientos de *Aspergillus* spp. en los diferentes tipos de muestras respiratorias.

De los servicios clínicos peticionarios de las distintas muestras estudiadas, destacan sobre el resto los de Neumología (n=106, 30.2%), la consulta de Fibrosis Quística (n=101, 28.8%) y Atención Primaria (n=74, 21.1%). En la tabla 27 y figura 35 se reflejan las frecuencias y los porcentajes de cada uno de los servicios médicos.

Tabla 27. Servicios peticionarios de los cultivos en los que se aislaron *Aspergillus* spp.

Servicio	Nº peticiones	%
Atención Primaria	74	21,1
Cardiología	1	0,3
Cirugía General	2	0,6
Consulta de Fibrosis Quística	101	28,8
Dermatología	4	1,1
Endocrinología	1	0,3
Enfermedades Infecciosas	11	3,1
Hematología	10	2,8
Neumología	106	30,2
Oftalmología	2	0,6
Oncología	1	0,3
ORL	9	2,6
Traumatología	2	0,6
UCI	17	4,8
Urgencias	8	2,3
Sin información	2	0.6

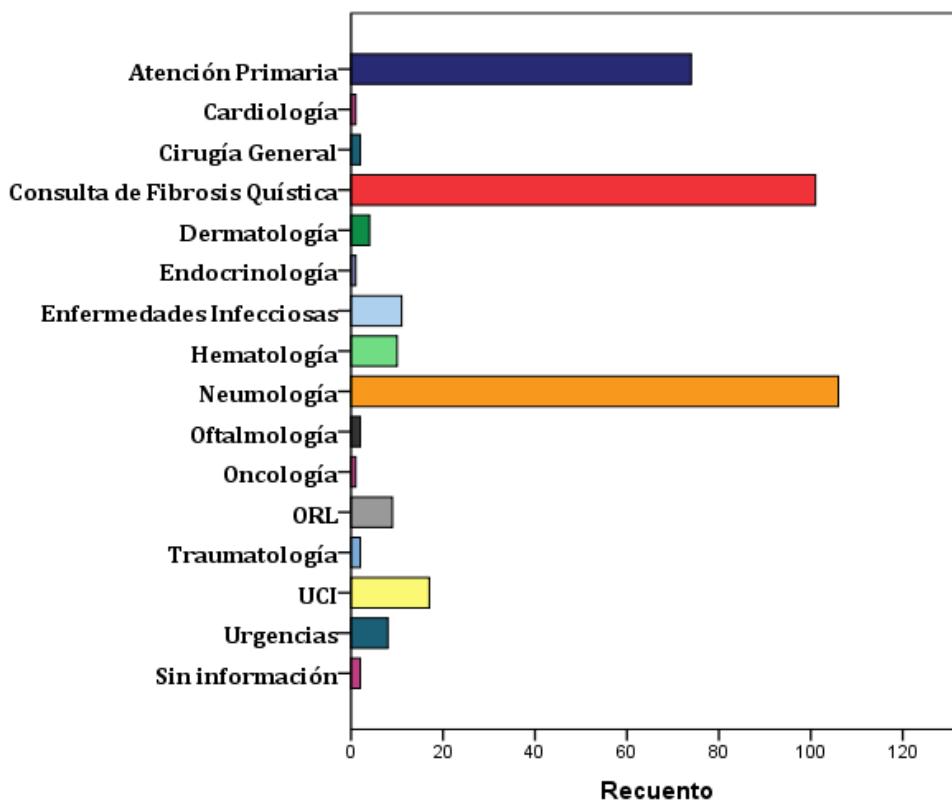


Figura 35. Gráfico de frecuencias de los servicios peticionarios.

Determinación de sensibilidad a los antifúngicos

Se determinó la sensibilidad a los antifúngicos en 82 cepas de *Aspergillus*, que incluían la totalidad de especies crípticas (58) y un máximo de 5 cepas por especie no críptica. De la sección *Versicolores*, las especies *A. sydowii* y *A. creber* no pudieron ser ensayadas debido a la inviabilidad de las cepas.

Los resultados de sensibilidad antifúngica a anfotericina B, voriconazol, posaconazol, caspofungina y anidulafungina se presentan en la tabla 28, incluyendo valores de media geométrica y de rangos de CMI/CME. Los valores de CMI₅₀/CMI₉₀ y de CME₅₀/CME₉₀ sólo se han calculado para la serie de *A. tubingensis*, por ser la única con un número significativo de aislamientos.

Tabla 28. Actividad *in vitro* de los antifúngicos ensayados en las cepas seleccionadas.

Sección	Especie (nº de aislamientos)	Antifúngico ^a	CMI ^b o CME ^c (mg/L)												
			Rango	MG ^d	50%/90%	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> (5)	AMB	1-2	1.6							2	3			
		VCZ	0.25-1	0.5				2	2	1					
		PCZ	0.25-0.5	0.4				2	3						
		ANF	0.03	0.03		5									
		CPF	0.03	0.03		5									
	<i>A. lentulus</i> (1)	AMB	8	8										1	
		VCZ	2	2								1			
		PCZ	0.25	0.25				1							
		ANF	0.03	0.03		1									
		CPF	0.25	0.25				1							
	<i>N. fischeri</i> (1)	AMB	0.12	0.12				1							
		VCZ	2	2								1			
		PCZ	0.5	0.5						1					
		ANF	0.03	0.03		1									
		CPF	0.25	0.25				1							
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i> (5)	AMB	2	2								5			
		VCZ	1	1							5				
		PCZ	0.5	0.5						5					
		ANF	0.03	0.03		5									
		CPF	0.03	0.03		5									
	<i>A. nomius</i> (1)	AMB	2	2								1			
		VCZ	1	1							1				
		PCZ	0.25	0.25				1							
		ANF	0.03	0.03		1									
		CPF	0.03	0.03		1									
	<i>A. tamarii</i> (3)	AMB	2	2								3			
		VCZ	1-2	1.33							2	1			

Resultados

Sección	Especie (nº de aislamientos)	Antifúngico ^a	CMI ^b o CME ^c (mg/L)												
			Rango	MG ^d	50%/90%	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16
		PCZ	0.25	0.25					3						
		ANF	0.03	0.03		3									
		CPF	0.03	0.03		3									
	<i>A. minisclerotigenes</i> (3)	AMB	2	2								3			
		VCZ	1-2	1.33							2	1			
		PCZ	0.25	0.25					3						
		ANF	0.03	0.03		3									
		CPF	0.03	0.03		3									
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i> (5)	AMB	1	1							5				
		VCZ	0.5	0.5					5						
		PCZ	0.5	0.5					5						
		ANF	0.03	0.03		5									
		CPF	0.03	0.03		5									
	<i>A. tubingensis</i> (37)	AMB	0.5-2	1.01	1-1					1	35	1			
		VCZ	0.5-2	0.93	1-1					4	32	1			
		PCZ	0.25-1	0.51	0.5-1				14	15	8				
		ANF	0.03	0.03	0.03-0.03	37									
		CPF	0.03	0.03	0.03-0.03	37									
<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i> (5)	AMB	2-4	2.40								4	1		
		VCZ	1-2	1.40							3	2			
		PCZ	0.5	0.5						5					
		ANF	0.03	0.03		5									
		CPF	0.03	0.03		5									
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i> (1)	AMB	4	4									1		
		VCZ	1	1							1				
		PCZ	1	1							1				
		ANF	0.03	0.03		1									
		CPF	0.03	0.03		1									

Sección	Especie (nº de aislamientos)	Antifúngico ^a	CMI ^b o CME ^c (mg/L)												
			Rango	MG ^d	50%/90%	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16
	<i>A. pseudoalegans</i> (1)	AMB	4	4									1		
		VCZ	0.5	0.5					1						
		PCZ	0.5	0.5					1						
		ANF	0.06	0.06			1								
		CPF	0.06	0.06			1								
	<i>A. persii</i> (1)	AMB	2	2								1			
		VCZ	2	2								1			
		PCZ	1	1						1					
		ANF	0.03	0.03		1									
		CPF	0.03	0.03		1									
<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i> (3)	AMB	1-8	3.67							1	1		1	
		VCZ	0.12-0.25	0.21				1	2						
		PCZ	0.25-0.5	0.33					2	1					
		ANF	0.03-0.06	0.04		2	1								
		CPF	0.03	0.03		3									
	<i>A. quadrilineatus</i> (5)	AMB	0.5-8	2.10						3	1				1
		VCZ	0.25-0.5	0.30					4	1					
		PCZ	0.25-0.5	0.35					3	2					
		ANF	0.03	0.03		5									
		CPF	0.03-0.25	0.12		3			2						
	<i>A. rugulosus</i> (1)	AMB	1	1								1			
		VCZ	0.25	0.25					1						
		PCZ	0.25	0.25					1						
		ANF	0.03	0.03		1									
		CPF	0.06	0.06				1							
<i>Ve</i>	<i>A. tabacinus</i> (1)	AMB	1	1							1				

Resultados

Sección	Especie (nº de aislamientos)	Antifúngico ^a	CMI ^b o CME ^c (mg/L)												
			Rango	MG ^d	50%/90%	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16
		VCZ	1	1							1				
		PCZ	0.5	0.5					1						
		ANF	0.03	0.03		1									
		CPF	0.03	0.03		1									
Ustil	<i>A. calidoustus</i> (1)	AMB	0.5	0.5					1						
		VCZ	8	8										1	
		PCZ	4	4									1		
		ANF	0.03	0.03		1									
		CPF	0.03	0.03		1									

^a AMB, anfotericina B; VCZ, voriconazol; PCZ, posaconazol; ANF, anidulafungina; CPF, caspofungina.

^b CMI₅₀, concentración a la que se inhibe el 50% de los aislamientos; CMI₉₀, concentración a la que se inhibe el 90% de los aislamientos.

^c CME₅₀, concentración a la cual el 50% de los aislamientos muestran cambios morfológicos en las hifas en crecimiento; CME₉₀, concentración a la cual el 90% de los aislamientos muestran cambios morfológicos en las hifas en crecimiento.

^d MG, media geométrica.

^e Datos no disponibles para *A. creber* y *A. sydowii* (cepas inviables).

El rango de CMI a **anfotericina B** fue de 0.125-8.0 mg/L, con valores máximos de 8.0 mg/L en *A. lentulus*, *A. nidulans* y *A. quadrilineatus*. Concentraciones mínimas inhibitorias de 4.0 mg/L se obtuvieron en la serie de *A. terreus* y en dos representantes de la sección *Circumdati* (*A. ochraceus* y *A. pseudoelegans*), mostrando el resto de las especies CMIs entre 1.0-2.0 mg/L.

Según los puntos de corte de EUCAST para la anfotericina B (70), un 40% de las cepas de *A. fumigatus* fueron sensibles y el 60% restante presentó sensibilidad intermedia. En *A. niger* el 100% de las cepas fueron sensibles.

Extrapolando los puntos de corte de EUCAST al resto de las especies, mostramos en la figura 36 el porcentaje de las cepas estudiadas con CMI≤1.0, 1.0<CMI≤2.0 y CMI>2.0.

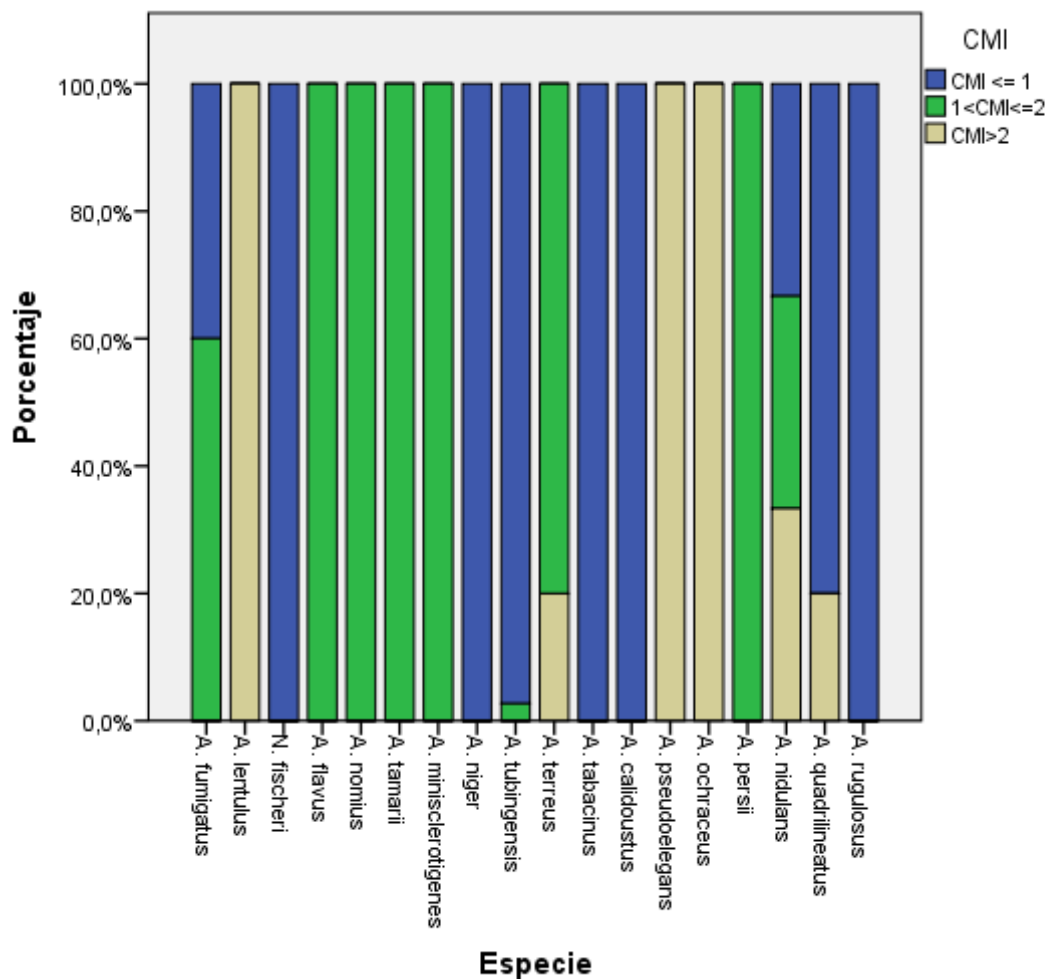


Figura 36. Aplicación de los puntos de corte de EUCAST de la anfotericina B, en todas las especies estudiadas.

El rango de CMI para **voriconazol** osciló entre 0.125 y 8.0 mg/L. El valor máximo de CMI se obtuvo en *A. calidoustus* (8.0 mg/L); seguido de *A. lentulus*, *N. fischeri*, *A. tamaritii*, *A. minisclerotigenes*, *A. tubingensis*, *A. terreus* y *A. persii* con una CMI de 2.0 mg/L. El resto de las especies ensayadas alcanzaron como máximo una CMI de 1.0 mg/L.

Al aplicar los puntos de corte de EUCAST para voriconazol en *A. fumigatus* (70), el 100% de las cepas fueron sensibles.

De igual manera que con la anfotericina B, se muestran en la figura 37 los puntos de corte de EUCAST aplicados al resto de las especies, mostrando el porcentaje de las cepas estudiadas con $CMI \leq 1.0$, $1.0 < CMI \leq 2.0$ y $CMI > 2.0$.

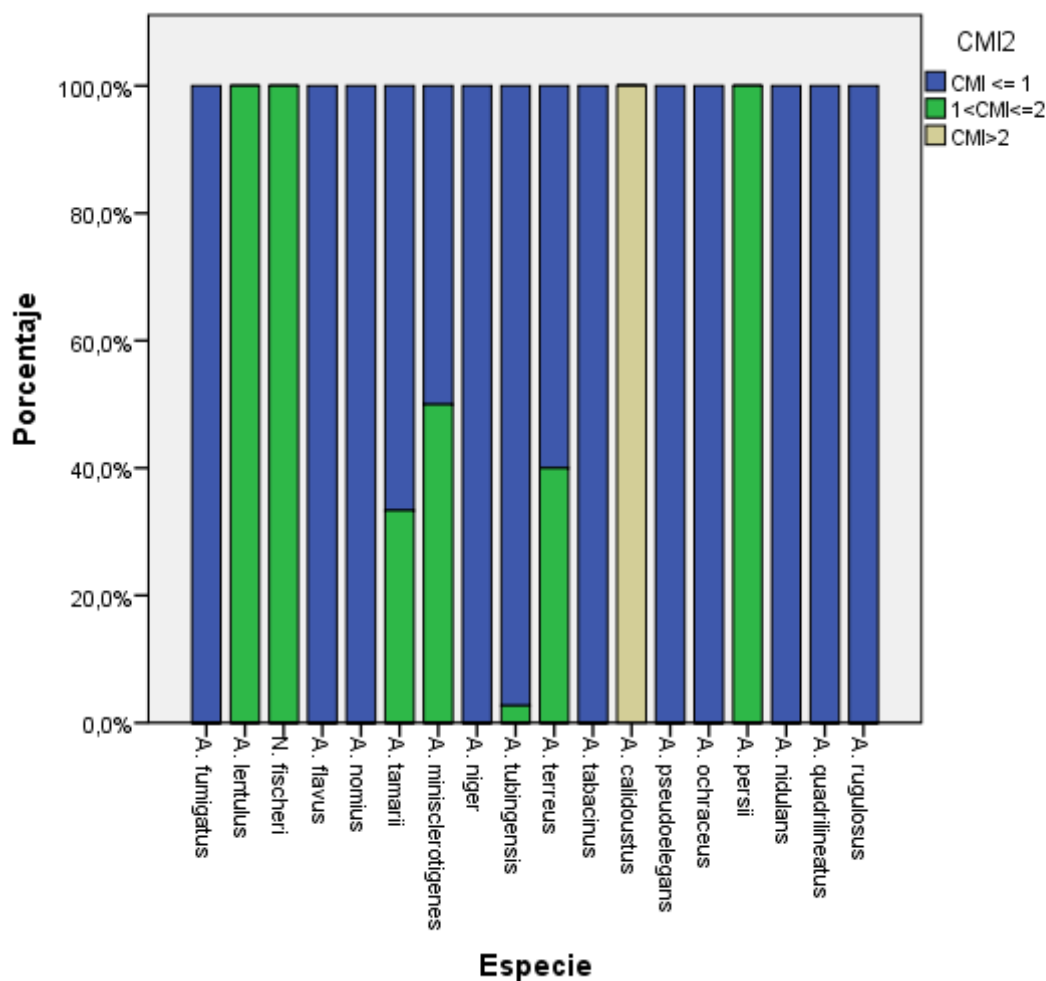


Figura 37. Aplicación de los puntos de corte de EUCAST de voriconazol, en todas las especies estudiadas.

EL rango de CMI para **posaconazol** osciló entre 0.25 y 4.0 mg/L. *Aspergillus calidoustus* fue la especie con mayor CMI (4.0 mg/L), seguida por *A. ochraceus* y *A. persii* con valores de 1.0 mg/L.

Para *A. fumigatus*, el 60% de las cepas ensayadas mostraron resistencia *in vitro* al antifúngico al aplicar los puntos de corte de EUCAST (70), siendo del 100% para *A. terreus*. El 40% restante de *A. fumigatus* presentó una sensibilidad intermedia frente a este fármaco.

En la figura 38 se aplican de nuevo los puntos de corte de EUCAST al resto de las especies.

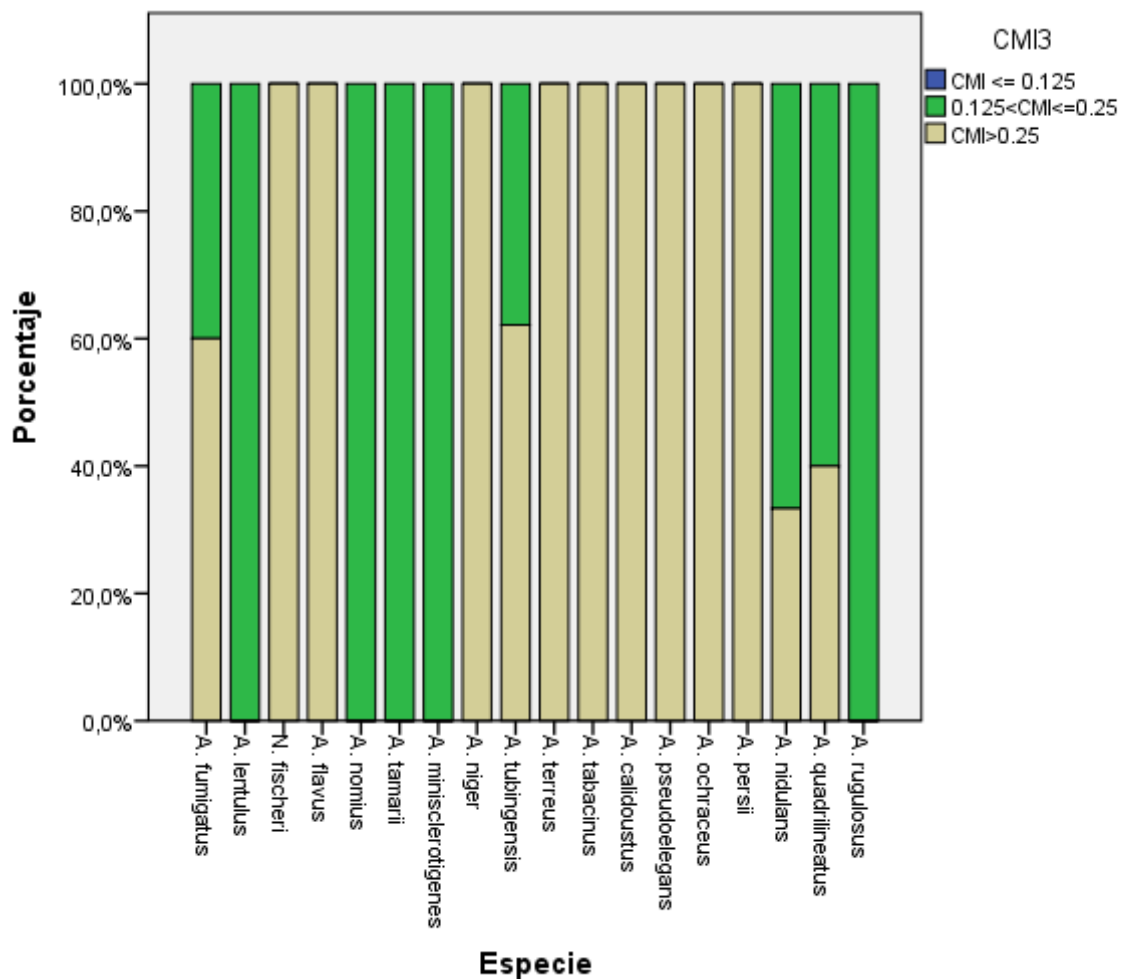


Figura 38. Aplicación de los puntos de corte de EUCAST de posaconazol, en todas las especies estudiadas.

Las **equinocandinas** mostraron los valores más bajos de CME en las series ensayadas, siendo 0.25 mg/L la mayor concentración detectada en la serie de *A. nidulans* para anidulafungina y en *A. lentulus*, *N. fischeri* y *A. cuadrilineatus* para caspofungina.

Discusión

Ampliación y validación de una nueva base de datos
para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF

Aspergillus es un hongo filamentoso saprófito que desempeña un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo, donde sobrevive y se desarrolla sobre la materia en descomposición, siendo uno de los hongos más abundantes en la naturaleza. Se puede encontrar en cualquier ambiente, incluido en el hospitalario: suelo, vegetación en descomposición, polvo doméstico, etc. Las obras, tanto en el hospital como en su entorno, aumentan enormemente la concentración de esporas de *Aspergillus* en el aire, estando frecuentemente relacionado con la aparición de brotes o epidemias de aspergilosis.

La clasificación y denominación de los microorganismos han evolucionado en las últimas décadas debido a los avances en las técnicas de identificación. Dentro de éstos, la taxonomía de los hongos filamentosos también han experimentado dichos cambios (6). En el caso del género *Aspergillus*, han sido descritas numerosas especies nuevas, llamando la atención desde el momento en que han sido causantes de infecciones invasoras. Dentro de estas especies destacan las denominadas especies crípticas, que necesitan de técnicas moleculares para su correcta identificación y que se caracterizan por presentar, algunas de ellas, menor sensibilidad antifúngica (6,84). Todo esto conlleva la necesidad de conseguir una correcta identificación a nivel de especie dentro del género, acompañado de pruebas de sensibilidad antifúngica (68,85,86).

Las técnicas microbiológicas convencionales para la identificación del género *Aspergillus*, se basan en la observación directa de las características macroscópicas y microscópicas (identificación fenotípica). A pesar de ser técnicas ampliamente difundidas en la práctica diaria, se caracterizan por requerir de personal especializado con experiencia. Además, numerosas especies tienen un crecimiento lento y algunas de ellas, no crecen en los medios de cultivo habituales. En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas, que complementan a los métodos basados en el cultivo, en un intento de mejorar y facilitar la identificación de estas especies. Entre estas técnicas, destacan la secuenciación génica (87) y más recientemente, el uso de la espectrometría de masas (EM) (56). La primera a pesar de ser la técnica de referencia para la identificación de hongos filamentosos requiere tiempo, personal cualificado y un coste que no todos los laboratorios pueden asumir; mientras que la EM ha surgido como una potente herramienta en el laboratorio que permite una rápida identificación de microorganismos, lo que conlleva instaurar un tratamiento efectivo o reducir el espectro del tratamiento administrado empíricamente, disminuyendo así la aparición de resistencias. Aunque existen varios equipos de EM disponibles comercialmente (88), todos adolecen de presentar a día de hoy de una escasa base de datos para especies del género *Aspergillus*, por lo que su capacidad para identificar a estos microorganismos es menor que para otros, como pueden ser bacterias o levaduras.

El relevante papel que han adquirido las especies crípticas de *Aspergillus* en el ámbito clínico y el disponer en nuestro laboratorio de un equipo de EM MALDI-TOF introducido en la práctica clínica diaria, nos ha llevado a realizar este estudio en el que hemos construido y validado una base de datos propia en dicho equipo instrumental, que expande significativamente la base de datos original y que permite una correcta identificación de un gran número de especies de *Aspergillus*, incluyendo tanto especies crípticas como no crípticas.

El uso de la EM MALDI-TOF está ampliamente instaurado en un gran número de laboratorios de Microbiología Clínica para la identificación de bacterias, no estando tan extendida para el caso de hongos filamentosos. La razón principal se debe a las dificultades que presenta su procesamiento en comparación con otros microorganismos, incluyendo las levaduras. El principal inconveniente es la existencia de diferentes perfiles proteicos de una misma especie, obtenidos en función de la antigüedad de los cultivos, e incluso entre diferentes subcultivos de una misma cepa (89).

Seng *et al.* (90) demostraron que la utilidad práctica de esta tecnología se basa en la disponibilidad de bases de datos de microorganismos suficientemente amplias, tanto desde el punto de vista cualitativo (número de géneros y de especies incluidos) como cuantitativo (número de perfiles proteicos o entradas por especie). Normand *et al.* tras hacer un análisis multivariante observaron que para hacer frente a la heterogeneidad de los espectros de hongos filamentosos en la EM MALDI-TOF era necesario aumentar el número de espectros por cepa, así como el número de cepas de la misma especie, lo que mejoraría la eficacia de identificación de esta tecnología (91). Años más tarde, los mismos autores comprobaron que al aumentar a 3 el número de entradas por especie se pasaba de una correcta identificación a nivel de especie del 87.41% al 92.1% para la base de datos creada por ellos, y del 35.15% al 46.6% para la base original de Bruker (92). A la misma conclusión llegaron Tam *et al.* tras comprobar los errores de identificación de especies crípticas dentro de la sección *Flavi*, recalando la necesidad de aumentar el número de entradas por especie para cubrir la variabilidad intraespecie (93).

Por lo tanto, mejorar la identificación de hongos filamentosos hasta niveles similares a las obtenidos con bacterias y levaduras pasa, tal y como han señalado los estudios previos y publicaciones más recientes (27,88,94,95), por la elaboración de bases de datos más amplias y complejas, que incorporen perfiles proteicos de un mayor número de cepas y de cultivos de diferente antigüedad.

A la hora de crear una base de datos en el espectrómetro de masas MALDI-TOF es imprescindible estar seguros de la correcta identificación de las especies que se van a introducir en la nueva biblioteca, siendo la secuenciación la técnica de

identificación de referencia. En el trabajo de Alanio *et al.* tanto la creación de la biblioteca, a partir de 28 cepas de *Aspergillus*; como la comprobación de la misma, con 124 aislamientos clínicos y 6 aislamientos ambientales, fueron realizadas con cepas independientes y previamente secuenciadas (96). Por otra parte, Lau *et al.* crearon una biblioteca con 294 cepas secuenciadas que representaban a 76 géneros de hongos filamentosos y a 152 especies, validada en una fase posterior mediante la identificación de 421 cepas clínicas previamente identificadas por el método fenotípico, aplicando la secuenciación para los casos discordantes entre ambos métodos (97).

En el presente estudio, la biblioteca fue creada a partir de una selección de las cepas clínicas identificadas por secuenciación y de 11 cepas de referencia. No secuenciamos la totalidad del cepario, sino como ya previamente se ha comentado, sólo aquellas cepas que ofrecieron algún tipo de duda en la identificación fenotípica.

Las técnicas de secuenciación génica tienen por objetivo conocer la secuencia de nucleótidos que componen un determinado fragmento de ADN y que constituye la información genética heredable y única de cada ser vivo. La región ITS cumple los requisitos para ser considerada como el “código de barras” de los hongos (21) y es útil para la identificación precisa de levaduras. En el caso de *Aspergillus spp.* su uso puede no conseguir siempre una correcta identificación a nivel de especie, siendo necesario utilizar los denominados marcadores secundarios. Diversos estudios optan por secuenciar la región ITS y completarlo con la secuenciación parcial de los genes β -tubulina y Calmodulina (6,98); otros se decantan por las regiones ITS y β -tubulina, dejando la Calmodulina para confirmar las especies crípticas obtenidas (27) y otros obvian la región ITS, eligiendo una combinación de marcadores secundarios (95). Debido a la variedad de dianas disponibles y de utilidad demostrada, y habiendo empezado nuestro trabajo con la secuenciación de la región ITS sin encontrar ninguna especie críptica, optamos por fijar como marcador principal la región β -tubulina, haciendo uso de la Calmodulina para corroborar las especies crípticas encontradas.

La validación de la nueva biblioteca se realizó con la totalidad de cepas secuenciadas, cometiendo un sesgo al incluir en esta fase las utilizadas en la creación de la misma; aun así lo consideramos necesario, ya que todas las especies crípticas encontradas en nuestra colección debían ser identificadas por la nueva biblioteca, pues se iba a realizar (y así se hizo) a partir de diferentes medios de cultivo y, por tanto, con distinto procesamiento. La evaluación prospectiva incluyó 200 cepas identificadas sólo por el método fenotípico, no por secuenciación, sin tener que optar por un método alternativo para resultados discordantes porque no se encontraron.

El primer trabajo que aplica la EM MALDI-TOF a la identificación de hongos filamentosos fue publicado en el año 2000 por Welham *et al.*, en el que identificaron mediante la citada tecnología esporas de hongos partiendo de una suspensión de las mismas en metanol, capaz de producir espectros con sólo unos pocos picos, pero fácil de comparar y diferenciar para *Penicillium spp.*, *Scytalidium dimidiatum* y *Trichophyton rubrum* (99). Se utilizó un enfoque similar para identificar con éxito especies de *Aspergillus* (100) y de otros géneros, directamente de suspensiones de esporas mezcladas con la matriz. En estos trabajos fue sorprendente observar cómo la composición de las paredes de las células fúngicas y de las esporas exhibían diferencias cualitativas y cuantitativas, no sólo dentro de diferentes especies de hongos, sino también entre diferentes cepas de la misma especie fúngica.

Se han investigado diferentes métodos de preparación de muestras para el análisis mediante EM MALDI-TOF de hongos filamentosos. Cassagne *et al.* evaluaron cinco métodos distintos de procesamiento de muestras de hongos filamentosos, utilizando diversas combinaciones de condiciones de cultivo (agar *versus* caldo), tratamientos con etanol y sin él, tratamientos térmicos y procedimientos de lisis mecánicos; para determinar cuál era el método que ofrecía los mejores resultados de identificación. Tras un riguroso análisis estadístico de los espectros y la evaluación del trabajo necesario para completar cada uno de los procedimientos, se llegó a la conclusión de que el protocolo que se realizaba más fácilmente y que proporcionaba los resultados más robustos, se basaba en el cultivo del hongo en una placa de agar Sabouraud gentamicina-cloranfenicol durante 72 horas a 27°C. A continuación, se incubaba en etanol para una posterior extracción con ácido fórmico y acetonitrilo y finalmente, se sometía a centrifugación para que el sobrenadante de dicha mezcla fuera analizado por EM MALDI-TOF (101).

Lau *et al.* propusieron un método de lisis mecánica para la preparación de las muestras con el fin de facilitar la liberación de las proteínas. En su estudio, partiendo de medio sólido, se resuspendió una pequeña porción del hongo en un tubo que contenía etanol y bolas de zirconia-sílice, se emulsionaron completamente y se sometieron a vórtex. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento restante en ácido fórmico al 70%, sometiénolo a un segundo proceso de vórtex y de centrifugación. El sobrenadante resultante fue entonces analizado inmediatamente o bien, almacenado durante 1 semana a -20°C para su posterior análisis por EM MALDI-TOF (97).

Por el contrario, Alanio *et al.* desarrollaron un protocolo experimental muy simple y rápido a partir de medio sólido, que consistía en depositar el material superficial de la cepa de *Aspergillus* (una mezcla de esporas, conidióforos y micelios recogidos de la superficie de las colonias del hongo) directamente sobre la

tarjeta de trabajo del espectrómetro de masas MALDI-TOF, sin realizar subcultivo previo ni pretratamiento de la muestra (96). Sin embargo, la peculiaridad de la base de datos creada por estos autores radica en la inclusión de perfiles proteicos de cepas de referencia en diferentes estados de madurez, lo que les permitió obtener una precisa identificación con independencia de la edad de los cultivos. De forma similar a Alanio, pero en un estudio independiente, De Carolis *et al.* establecieron a partir de medio sólido, una gran base de datos en el espectrómetro de masas MALDI-TOF a base de espectros de colonias jóvenes y maduras de 109 cepas, que representaron 55 especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y Mucorales (89).

Se ha cuestionado si los espectros que derivan de hongos filamentosos crecidos en medios sólidos podrían ser más heterogéneos que los cultivados en medio líquido. Esta es la razón por la cual Bruker utilizó cultivos en caldo Sabouraud de hongos filamentosos durante la construcción de una biblioteca adicional (*Fungi library*) (102), en un esfuerzo por minimizar el efecto de las condiciones de cultivo y ayudar en la producción de un micelio más uniforme (97).

Masih *et al.* eligieron el cultivo en caldo Sabouraud para introducir 14 especies crípticas de *Aspergillus*, aisladas en muestras clínicas, en una base de datos creada por ellos en el espectrómetro de masas MALDI-TOF (95). Autores como Schulthess (103), usan precisamente el medio líquido como punto de partida para evaluar la base de datos *Filamentous Fungi Library 1.0* (Bruker Daltonik); sin llegar a crear nuevas entradas en la biblioteca, se decantan por este medio para minimizar los efectos del cultivo, obteniendo un micelio más homogéneo y, por tanto, mejores resultados en la identificación.

Los diferentes métodos funcionaron bien para los investigadores en sus respectivos estudios, y los protocolos descritos añadirán valor a una futura estandarización de los métodos de preparación de muestras de hongos filamentosos. En cualquier caso, sea cual sea el protocolo que se siga, son condición *sine qua non* trabajar en una cabina de bioseguridad durante el procesamiento de las muestras, para minimizar la formación de aerosoles y garantizar de este modo la seguridad del personal del laboratorio.

Teniendo en cuenta que nuestro objetivo era optimizar la capacidad de identificación de la EM MALDI-TOF, incluyéndola en el esquema de trabajo diario de la Sección de Hongos; nos decantamos por el medio sólido para la creación de la biblioteca, así como para la identificación posterior de las cepas, ya que es el medio de cultivo habitual de la Sección. Además, el fabricante recomienda crear la biblioteca en las mismas condiciones en las que va a ser posteriormente utilizada. Elegimos el procesamiento de las muestras descrito por Cassagne *et al.* (101), que incluye un pretratamiento con etanol, seguido de una extracción con ácido fórmico

y acetonitrilo. Es un método más laborioso que requiere más tiempo que el descrito por Alanio *et al.* (96), pero la mayor calidad de los espectros que proporciona nos hizo elegirlo. Los resultados obtenidos a partir de medio sólido no fueron satisfactorios, obteniendo espectros de mala calidad, lo que determinó que optáramos por el medio líquido para la creación de la nueva base de datos, siguiendo la misma línea que las recomendaciones dadas por el fabricante. Logramos una gran mejoría en la calidad de los espectros, permitiéndonos integrarlos en la nueva biblioteca. Sin embargo, la validación de la misma, así como su evaluación prospectiva, la realizamos a partir de medio sólido, tal y como lo habíamos diseñado previamente, obteniendo muy buenos resultados en la identificación.

Se hicieron diversos ensayos, tales como identificar directamente el hongo tras su pase a la tarjeta y sin pretratamiento, así como identificaciones a partir de subcultivos en medio líquido. En el primer caso, los resultados no fueron tan satisfactorios como los obtenidos con el protocolo de pretratamiento/ extracción a partir de medio sólido, aunque proporcionaban identificaciones correctas (comparado con la obtenida por secuenciación), pero con *scores* bajos. En el segundo y último caso, los resultados fueron incluso mejor que los obtenidos a partir de medio sólido, pero suponían un nuevo subcultivo y, por tanto, demora en el resultado con el consiguiente aumento del coste.

El procedimiento elegido nos permitió obtener espectros de muy buena calidad e identificaciones correctas a partir del medio de cultivo de trabajo habitual, demostrando la utilidad de la biblioteca con independencia del medio de cultivo de partida. Aunque inicialmente ensayamos con cultivos de diferentes días de incubación para determinar cuál era el menor tiempo necesario para obtener espectros de calidad, no consideramos preciso incluir espectros de cultivos jóvenes y maduros de cada especie, ya que atendiendo a las necesidades clínicas los resultados deben de proporcionarse en el menor tiempo posible y cultivos de 48 horas cumplían con estos requisitos.

La biblioteca original *Filamentous Fungi Library 1.0* para el espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Alemania) con 89 entradas del género *Aspergillus* que representan a 18 especies diferentes, fue completada con 53 entradas adicionales de 23 especies, lo que nos permitió incluir 12 nuevas especies crípticas y aumentar el número de entradas de 11 especies ya incluidas. Por separado, la base de datos de Hongos Filamentosos-HUVR proporciona 16 especies crípticas, mientras que la biblioteca original sólo 7, representando respectivamente el 69.6% y 38.9% del total de especies incluidas en cada una de las bibliotecas. Finalmente, la biblioteca suplementada contiene 142 entradas que permiten la identificación de 30 especies diferentes de *Aspergillus* de 11 secciones:

11 especies no crípticas y 19 especies crípticas. De este modo, conseguimos aumentar tanto el número de especies de *Aspergillus* representadas, como el número de entradas por especie.

Numerosos autores (27,88,94,95) han señalado la necesidad de ampliar la biblioteca *Filamentous Fungi Library 1.0* (Bruker Daltonik) para mejorar su capacidad de identificación. Por este motivo, nosotros hemos creado y validado nuestra biblioteca mediante la identificación de 390 cepas, pero sin comparar los resultados con los que hubiéramos obtenido usando sólo la biblioteca original, ya que se ha demostrado que ésta resulta ser insuficiente.

La fase de validación de nuestra biblioteca la realizamos con 190 cepas de *Aspergillus* identificadas por secuenciación. La concordancia entre ambos métodos fue del 100% en todas las cepas ensayadas, obteniendo un *score* ≥ 2.0 en el 86.84% de los casos y un *score* ≥ 1.7 y < 2.0 en el 13.16% restante. Las cepas identificadas a nivel de género comprendían 13 especies diferentes; 8 de las cuales, al tener más de un aislamiento, consiguieron alguna vez ser identificadas a nivel de especie. Las 5 especies restantes, con un único aislamiento cada una, no consiguieron obtener *scores* ≥ 2.0 . Decidimos entonces realizar una segunda identificación partiendo de subcultivos en medio líquido. Las 5 especies, correspondientes a 5 cepas, obtuvieron *scores* ≥ 2.4 en todos los casos; alcanzando en las especies crípticas de la colección un 100% de identificaciones a nivel de especie. Los resultados obtenidos se atribuyeron a que hicimos uso de la biblioteca a partir del mismo medio de cultivo en el que fue creada. Esta mejoría en los resultados también fue descrita por Panda *et al.*, que pasaron del 56.7% al 86.4% de identificaciones a nivel de especie para hongos filamentosos, tras modificar el procesamiento de las muestras al pasar de medio sólido a medio líquido (104); concluyendo que esta mejoría se debía a que el nuevo protocolo reducía los efectos de las condiciones de cultivo y ayudaba a la producción de un micelio uniforme. Por lo tanto, en caso de obtener identificaciones con *scores* bajos se debería repetir el proceso de identificación a partir de medio líquido.

Tras comprobar que la biblioteca creada ofrecía resultados compatibles con los obtenidos por el método de referencia, realizamos la evaluación prospectiva de la biblioteca Hongos Filamentosos-HUVR. En esta fase, identificamos las 200 cepas restantes de la colección, que habían sido identificadas sólo por el método convencional fenotípico y que no habían ofrecido dudas durante la misma, descartándolas para ser secuenciadas. Se consiguió un 95.5% de identificaciones a nivel de especie y un 4.5% a nivel de género, sin ningún caso de identificación errónea.

Cassagne *et al.* crearon una base de datos con los espectros de 143 cepas de referencia de hongos filamentosos (101) y al aplicarla a 177 aislamientos clínicos, lograron una correcta identificación a nivel de especie en el 87% de los casos, mientras que la identificación falló en el 12% de los mismos, debido a que dichas especies no estaban incluidas en la biblioteca de referencia.

Alanio *et al.* estudiaron 124 cepas clínicas y 16 cepas ambientales de *Aspergillus*, con una base de datos construida a partir de espectros procedentes de colonias jóvenes y maduras de cepas de referencia. Obtuvieron una correcta identificación en el 98.6%, con un 100% de especificidad (0% de identificación errónea) (96).

Tras crear una biblioteca con 109 cepas que representaban a 55 especies diferentes (31 *Aspergillus*, 12 *Fusarium* y 10 Mucorales), De Carolis *et al.* la evaluaron con 103 aislamientos de hongos filamentosos aislados en la rutina clínica, utilizando la secuenciación como método de referencia (89). Exceptuando 9 aislamientos que pertenecían a especies fúngicas no incluidas en la base de datos creada, el 96.8% de los mismos fue correctamente identificado por EM MALDI-TOF a nivel de especie. Tres aislamientos (3.2%) fueron identificados sólo a nivel de género (con *scores* de 1.817, 1.874 y 1.796, respectivamente), aunque la especie asignada concordaba con la obtenida por el método de secuenciación. La especificidad de la biblioteca creada quedó demostrada al obtener *scores* <1.7 en todos los aislamientos clínicos de las especies no incluidas en la base de datos.

Posiblemente, una de las bases de datos más completa hasta la fecha sea la realizada en 2012 por Lau *et al.* (97), en la que incluyeron 294 entradas de 58 cepas de referencia de varias colecciones y 236 cepas clínicas. Esta base de datos incluía 76 géneros y un total de 152 especies, siendo las del género *Aspergillus* las mayoritarias con 63 cepas. Su aplicación a 421 aislamientos clínicos permitió obtener identificaciones a nivel de especie y de género en el 88.9% y en el 4.3% de los aislamientos, respectivamente. En 33 aislamientos (7.8%) para los que no hubo identificación (*score* <1.7), 25 fueron basidiomicetos no asociados con enfermedad clínica y 8 fueron especies de *Penicillium* que no estaban presentes en la base de datos. La biblioteca creada superó claramente a la base de datos del fabricante, que identificó sólo 3 (0.7%) y 26 (6.2%) aislamientos a nivel de especie y género, respectivamente.

Por tanto, los resultados obtenidos al aplicar nuestra nueva biblioteca son muy similares a los encontrados en la literatura, con valores que oscilan del 87% al 98.6% de identificaciones a nivel de especie, a pesar de desarrollar cada grupo de investigadores un método de trabajo diferente.

Estos resultados son consecuencia de aplicar los puntos de corte recomendados por el fabricante para la interpretación de los *scores* obtenidos. Inicialmente, esos valores se establecieron para la identificación rutinaria de bacterias, pudiendo variar para la identificación de hongos. Debido a la dificultad que entraña trabajar con hongos filamentosos, algunos autores proponen bajar dichos puntos de corte al comprobar, que aunque esos valores bajen, no lo hace la exactitud de la identificación.

La mayoría de autores realizan una identificación múltiple de la cepa problema, por triplicado o cuatriplicado, exigiendo en todos los casos que la especie proporcionada coincida en la mayoría de las repeticiones. Gautier *et al.* establecen que 3 de las 4 identificaciones deben coincidir, exigiendo un *score* ≥ 1.9 como punto de corte (105). Menos exigentes en cuanto al *score* son Normand *et al.* que establecen como su mejor algoritmo de identificación el que sólo considera la identificación con el *score* más alto de 4 repeticiones, teniendo que ser ≥ 1.7 (92); consiguiendo disminuir el número de especies no identificadas, sin alterar la veracidad de los resultados. En nuestro estudio (106) consideramos suficiente realizar la identificación por triplicado, siendo más exigentes en cuanto al *score*: establecimos los mismos puntos de corte que para el resto de microorganismos identificados por la EM MALDI-TOF, es decir, exigimos un *score* ≥ 2.0 para alcanzar una identificación a nivel de especie.

Schulthess *et al.* mejoraron significativamente la identificación del 54.2% al 71.1% a nivel de especie, usando un *score* ≥ 1.7 en lugar de ≥ 2.0 (103). Aplicando este criterio, Riat *et al.* consiguieron optimizar los suyos, aumentando el porcentaje global de identificación correcta del 68.7% al 76.4% y del 63.6% al 75.15% para los protocolos de trabajo A (a partir de medio sólido) y B (a partir de medio líquido), respectivamente (26). Un estudio más reciente, publicado en 2017, concluyó que el hecho de depositar cuatro puntos de identificación por extracto y reducir el umbral a 1.7, disminuye el número de ejemplares no identificados sin alterar la fiabilidad de los resultados obtenidos (92).

Si aplicamos el valor umbral anterior (*score* ≥ 1.7) a nuestros resultados, obtendríamos un 100% de identificaciones a nivel de especie. Debido a los buenos resultados obtenidos, preferimos aplicar los mismos puntos de corte que los recomendados para bacterias y, aconsejar en el caso de obtener *scores* ≥ 1.7 y < 2.0 una segunda identificación a partir de un subcultivo en medio líquido.

Cuando comparamos la identificación genotípica con la fenotípica, obtuvimos un elevado porcentaje de concordancia en tres de las cuatro especies mayoritarias: 100% para *A. terreus*, 99.38% para *A. fumigatus* y 94.03% para *A. flavus*. En el caso de *A. niger*, sólo se obtuvo un 37.29% de coincidencia, de tal

modo que un 62.71% de las cepas identificadas fenotípicamente como *A. niger* fueron identificadas molecularmente como *A. tubingensis*. Esta falta de acierto en la identificación de especies de la sección *Nigri* se debe a que éstas son difíciles y a veces imposibles de diferenciar entre sí mediante métodos fenotípicos (107). Por tanto, en la práctica clínica, las especies que componen esta sección, sean crípticas o no, se deben informar como *Aspergillus* sección *Nigri* cuando la identificación se basa sólo en métodos fenotípicos (108). Finalmente, hubo 34 cepas informadas fenotípicamente como *Aspergillus* spp., que tras ser secuenciadas correspondieron con 10 especies crípticas y 5 no crípticas.

En el estudio multicéntrico FILPOP (24), con un total de 278 cepas de *Aspergillus*, la especie aislada con mayor frecuencia fue *A. fumigatus*, presentando una prevalencia similar a la de nuestra colección. Resultados similares se obtuvieron para *A. niger*, mientras que para *A. flavus*, *A. terreus* y *A. tubingensis* la prevalencia fue más elevada en nuestro estudio.

Aspergillus fumigatus es la especie más común relacionada con cuadros de aspergilosis, aunque otras especies del género como *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. ustus*, también se han identificado como patógenos humanos. *Aspergillus flavus* ha sido descrita como la segunda especie de *Aspergillus* más frecuente en medios hospitalarios de Europa y EE.UU. (24,109), mientras que *A. terreus* es particularmente frecuente en Austria (61). En países donde se dan condiciones climáticas semiáridas, áridas y tropicales, como Arabia Saudita, Sudán y Taiwan, *A. flavus* parece ser el agente etiológico principal de aspergilosis (110).

En nuestro estudio *A. fumigatus* fue la especie más frecuentemente aislada, seguida de *A. flavus* que fue responsable del 18.5% de todos los aislamientos. La prevalencia de *A. flavus* en nuestra colección fue sustancialmente más alta que las tasas descritas en estudios multicéntricos de EE.UU. y España (24,109). De hecho, esta prevalencia observada es también considerablemente más alta que la tasa del 10% de *A. flavus* encontrada en una colección mundial de 771 aislamientos clínicos de *Aspergillus* obtenidos en 62 centros médicos (111).

Destaca la proporción de las especies de la sección *Nigri*, con un claro predominio de *A. tubingensis* (9.8%) frente a *A. niger* (5.8%). Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los publicados por autores como Howard *et al.* (98), Hendrickx *et al.* (85) y Li *et al.* (112), que obtienen proporciones similares de ambas especies en sus respectivas colecciones.

En este estudio hemos caracterizado un gran número de especies crípticas pertenecientes a las secciones *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Nidulantes* y *Usti*. Estas especies crípticas representan una prevalencia del 15.3%, valor muy similar

a los ya publicados y que oscilan del 10-15%. Los primeros trabajos que divulgaron cifras sobre la prevalencia de especies crípticas del género *Aspergillus* fueron los publicados por Balajee *et al.* en 2009 y por el grupo de Alastruey-Izquierdo en 2013. El primero analizó durante un período de 6 años y de forma prospectiva, las cepas de *Aspergillus* aisladas en pacientes trasplantados y diagnosticados de AI probada o probable, con una prevalencia de especies crípticas del 10% en una serie de 218 aislamientos. El segundo estudio investigó la distribución de especies en España, así como la prevalencia de resistencia a los antifúngicos, mediante un estudio prospectivo multicéntrico de 29 hospitales de diferentes regiones del país, describiendo una prevalencia del 12% de especies crípticas en un conjunto de 325 aislamientos. En la misma línea, publicaciones más recientes corroboran estos resultados: 19% en una serie de 133 pacientes con sospecha de aspergilosis admitidos en 12 centros médicos brasileños (86), 12.3% en una colección de 246 aislamientos clínicos y ambientales en Portugal (25) y 12.2% en una serie de 345 cepas clínicas procedentes de 11 hospitales coreanos (27).

Aspergillus tubingensis fue la especie críptica aislada con mayor frecuencia, seguida de *A. quadrilineatus*, *A. minisclerotigenes* y *A. tamaritii*. Además de la sección *Nigri*, las secciones con mayor número de especies crípticas fueron *Flavi* (7 cepas) y *Nidulantes* (6 cepas). En total, se identificaron especies crípticas pertenecientes a 7 secciones, que coinciden con las que con mayor frecuencia se describen en estudios europeos y estadounidenses y que comprenden a especies como: *A. alliaceus* (sección *Flavi*), *A. tubingensis* (sección *Nigri*), *A. calidoustus* (sección *Usti*) y *A. lentulus* (sección *Fumigati*) (24,28,109). De igual modo, esta distribución de especies no es uniforme y difiere de otras regiones del planeta; por ejemplo, un estudio llevado a cabo en Brasil reveló que las especies *A. tamaritii* y *A. awamori* fueron las dos especies crípticas encontradas con mayor frecuencia en las secciones *Flavi* y *Nigri*, respectivamente (86).

En resumen, los resultados obtenidos en nuestra investigación presentan valores similares y/o ligeramente superiores a los obtenidos por otros autores en estudios de la misma naturaleza (25,86).

Actualmente, las infecciones fúngicas están aumentando y a esto han contribuido una serie de factores que tienen en común la disminución de la respuesta inmune del paciente. Estos factores incluyen: envejecimiento de la población, pacientes sometidos a trasplantes de órganos sólidos/precursores hematopoyéticos, pacientes con enfermedades degenerativas y pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor (113,114).

La prevalencia de cultivos positivos para *Aspergillus* spp. en el período de estudio llevado a cabo en nuestro centro fue del 0.2%; con una media de 1.25 muestras por paciente, algo mayor a lo descrito en un estudio similar con una media de 1.06 (115). Al revisar la literatura observamos que hay muy pocos estudios de prevalencia de *Aspergillus* spp. en muestras clínicas, destacando dos trabajos: el de Xess *et al.* que registran una prevalencia del 2.43% en un período de 4 años (115) y el de Amatya *et al.* con un 15.06% durante un período de 7 años (116). Estas diferencias se deben al número total de cultivos considerados, así los dos trabajos previamente mencionados se refieren únicamente a los aislamientos de *Aspergillus* en las muestras recibidas para cultivo exclusivamente fúngico; mientras que en nuestro caso el porcentaje obtenido es inferior ya que se tienen en cuenta todos los cultivos procesados en el laboratorio, en los cuales podría haber crecido el hongo filamentoso. En general, las diferencias observadas en los diversos ensayos pueden ser debidas a: los distintos tipos de poblaciones estudiadas, a la naturaleza de las muestras clínicas y a la prevalencia local.

Desde un punto de vista clínico, el término aspergilosis incluye enfermedades de diferente patogenia causadas por *Aspergillus* (117); siendo la AI la más grave de todas ellas. La AI es una enfermedad que afecta a individuos altamente inmunodeprimidos y constituye una causa importante de mortalidad en estos pacientes, particularmente en los sometidos a trasplante de precursores hematopoyéticos (118). Históricamente, la tasa de mortalidad un año después del inicio de la AI en esta población era del 80% (118). Sin embargo, estudios como el realizado por Upton *et al.* demuestran un descenso en la mortalidad en este tipo de pacientes (119). En un estudio multicéntrico de vigilancia realizado en EE.UU. que incluyó a pacientes durante los años 2001-2005, la mortalidad a las 12 semanas en los receptores de precursores hematopoyéticos con AI fue del 58% (120). La incidencia de AI en diferentes estudios varía de <1% hasta el 30%, dependiendo de la forma clínica y del tipo de paciente (43). Nosotros sólo registramos un caso API, a pesar de tener en nuestra serie aislamientos de *Aspergillus* en muestras de pacientes inmunodeprimidos.

En nuestro estudio, el 77.8% de los aislamientos clínicos de *Aspergillus* crecieron en muestras del tracto respiratorio; que incluían esputos, lavados broncoalveolares, aspirados transbronquiales y un cepillado bronquial. *Aspergillus fumigatus* fue la especie aislada con mayor frecuencia, seguida de *A. terreus* y *A. flavus*; coincidiendo con la mayoría de los trabajos publicados (115,121).

Las enfermedades pulmonares crónicas se reconocen como un factor de riesgo importante para desarrollar aspergilosis pulmonar. El desarrollo de síndromes específicos asociados a *Aspergillus* depende de la inmunidad del huésped y la enfermedad pulmonar subyacente. En el contexto del asma, la

hipersensibilidad a *Aspergillus* puede provocar ABPA o asma grave con sensibilización a hongo. El uso crónico de corticosteroides sistémicos o inhalados, junto con el uso recurrente de antibióticos para las exacerbaciones prevalentes en la EPOC, predisponen a la aspergilosis pulmonar crónica (APC). La tuberculosis pulmonar previa es un factor de riesgo para la APC, un síndrome con una amplia gama de presentaciones que incluye aspergiloma simple, caries crónicas, necrosis o fibrosis. La evidencia acumulada sugiere que la presencia o colonización por *Aspergillus* en el contexto de la enfermedad pulmonar crónica puede empeorar el curso clínico, incluso en ausencia de aspergilosis pulmonar manifiesta (122).

Por todo lo anterior, el aislamiento de *Aspergillus* en muestras respiratorias es frecuente, destacando en casos de EPOC avanzada (123), fibrosis quística (124), asma bronquial (125) y bronquiectasias (126). En concordancia con lo publicado, la EPOC y la fibrosis quística fueron las enfermedades de base más frecuentes en términos absolutos en nuestra serie, seguidas de asma bronquial y bronquiectasias.

El elevado número de muestras procedentes de pacientes con fibrosis quística se debe a la presencia de la “Unidad de Fibrosis Quística de Andalucía Occidental” en nuestro hospital, siendo el Centro de Referencia para las provincias de Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla. La Fibrosis Quística es una enfermedad genética hereditaria que produce una alteración en la secreción de mucosidades, afectando a muchos sistemas del organismo, especialmente al sistema respiratorio y al digestivo. Se trata de una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen localizado en el brazo largo del cromosoma 7, que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (RTFQ). Como consecuencia de la mutación se produce un espesamiento y aumento de la viscosidad del moco, que se acumula y como consecuencia, se dificulta la respiración, y se producen infecciones e irritaciones pulmonares. También puede impedir el paso al intestino de las enzimas digestivas producidas en el páncreas que son necesarias para una correcta digestión de los alimentos, produciendo diarrea, malnutrición y pérdida de peso.

Se ha descrito que *Aspergillus* es el género fúngico que coloniza con más frecuencia a estos pacientes, principalmente en estadios avanzados de la enfermedad (127), demostrándose que los pacientes colonizados sufren un deterioro más rápido de la función pulmonar que los no colonizados (128).

Sin embargo, y a pesar de la frecuencia de aislamientos de *Aspergillus* en muestras respiratorias, su significado clínico es incierto, ya que el aislamiento puede representar un estado temporal, un portador crónico o un signo que precede a la infección. Además, la valoración de los aislamientos se complica si

éstos se obtienen en pacientes no inmunodeprimidos, debido a la dificultad para distinguir entre enfermedad y colonización (121). Por tanto, la especificidad del aislamiento aumenta al disminuir la inmunocompetencia del paciente.

Si tomamos nuevamente el estudio FILPOP (24) como referencia, podemos comparar las series de muestras respiratorias, que fueron las más abundantes en ambos casos. En dicho estudio partían de 309 muestras y nosotros de 273, siendo la valoración clínica de los aislamientos como colonizante o sin relevancia clínica en el 60% (186/309) y en el 74% (202/273), respectivamente. Los aislamientos considerados como clínicamente relevantes representaron el 40% (123/309) y el 11.4% (31/273), respectivamente. La proporción de colonizaciones sigue siendo elevada incluso al compararnos con estudios más recientes, que se centran exclusivamente en muestras respiratorias, como el de Ohara *et al.* que describen un 68.2% de colonizaciones en un estudio retrospectivo de 110 pacientes, frente a un 27.4% de APC y un 4.5% de ABPA (121).

Los 31 aislamientos respiratorios clínicamente relevantes se obtuvieron en el 81.8% de los lavados broncoalveolares, en el 40% de los aspirados transbronquiales y en el 8.5% de los esputos. Estos porcentajes concuerdan con los de Barnes *et al.*, que describen la colonización habitual que se produce en el tracto respiratorio superior (129), siendo los aislamientos que se obtienen de muestras del tracto respiratorio inferior los de mayor valor clínico.

Tanto en el estudio FILPOP como en el nuestro, los esputos fueron las muestras respiratorias más frecuentes, destacando un 29.03% de LBA con relevancia clínica en nuestra serie, frente a un 26.02% en el trabajo de Alastruey-Izquierdo.

El segundo tipo de muestra donde se aisló el mayor número de *Aspergillus* con un 17.7% (62/351) fueron los exudados óticos. La infección fúngica del conducto auditivo externo (otitis externa y otomicosis) es una infección micótica superficial que rara vez afecta al oído medio. Las especies fúngicas como levaduras, mohos, dermatofitos y especies de *Malassezia* son agentes de la otitis fúngica externa. Entre los hongos filamentosos, *A. niger* se ha descrito como el agente más común en la literatura y *Candida albicans* como la levadura más frecuente (130). La otomicosis tiene una distribución mundial, pero la prevalencia de la infección está relacionada con la ubicación geográfica, mostrando las áreas con clima tropical y subtropical las tasas de prevalencia más altas. De acuerdo con otros estudios (131), nuestros resultados mostraron que *A. flavus* fue la especie predominante (24/63), seguida muy de cerca por los *Aspergillus* de la sección *Nigri*: *A. tubingensis* (20/63) y *A. niger* (11/63).

Abdelazeem *et al.* describen una mayor prevalencia de *A. niger* (91%) con respecto a *A. flavus* (9%) en este tipo de muestras (132), pero la identificación de las especies se realizó únicamente por métodos fenotípicos, con el posible sesgo de identificar a todos los aspergilli de la sección *Nigri* como *A. niger*. En nuestro caso, si unificáramos a todas las especies de la sección *Nigri*, obtendríamos que éstas son más frecuente que *A. flavus* como agentes de otomicosis.

Finalmente, señalar que en el 46.8% de los exudados óticos de nuestra serie no se registró la valoración del aislamiento en la historia clínica de los pacientes, sí lo fue en el 53.2% restante como clínicamente relevante, recibiendo los pacientes tratamiento antifúngico dirigido.

Por frecuencia, el tercer tipo de muestra fueron las escamas de piel/uñas con un 1.7% (6/351) de los aislamientos de *Aspergillus*. La onicomicosis es una infección de las uñas que puede ser causada por dermatofitos (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. y *Epidermophyton floccosum*), mohos no dermatofitos (*Scopulariopsis brevicaulis*, *Hendersonula toruloidea*, *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp. y *Fusarium* spp.) y levaduras (*Candida* spp.) (133). Estudios como el llevado a cabo por Narain *et al.* (134) demuestran el papel creciente que han adquirido los hongos no dermatofitos en la patogénesis de las onicomicosis: concretamente, en una serie de 2906 casos de onicomicosis registrados durante un período de 14 años, los no dermatofitos fueron responsables del 41.60% de los casos, siendo *Aspergillus* spp. con un 29.6% la principal causa dentro de este grupo. Al igual que ellos, encontramos a *A. terreus* como la principal especie aislada en este tipo de muestras.

Respecto al resto de muestras, destacan una biopsia ósea, un exudado conjuntival, un drenaje peritoneal y una quemadura; donde los aislamientos obtenidos de ellas sí fueron valorados clínicamente como causantes de infección.

Considerando todos los aislamientos obtenidos, independientemente del tipo de muestra, estos fueron valorados como colonizantes en el 59.3% de los casos, clínicamente relevantes en el 19.6% y no tuvimos información en el 21.1% restante. A pesar del llamativo porcentaje de colonizaciones, nuestros resultados concuerdan con lo publicado por otros autores, con tasas que van del 42% (19/45) para Masih *et al.* (95) hasta el 53.7% (86/160) para Vermeulen *et al.* (135).

Finalmente, para completar nuestro estudio determinamos la sensibilidad antifúngica *in vitro* siguiendo las directrices de EUCAST, por ser el organismo que se sigue en nuestro Laboratorio.

Tres especies diferentes dentro de la sección *Fumigati* (*A. fumigatus*, *A. lentulus* y *N. fisheri*) se identificaron en este estudio. El perfil de sensibilidad antifúngica común de *A. fumigatus* se caracteriza por CMI/CMEs bajas para anfotericina B, fármacos triazoles y equinocandinas. En la serie de 5 cepas que probamos obtuvimos resultados similares a los ya publicados para esta especie (68,136).

Aspergillus lentulus se identificó por primera vez en 2004, mientras se realizaba un estudio retrospectivo sobre la resistencia al itraconazol en una colección de 128 aislamientos de *A. fumigatus* obtenidos a partir de pacientes receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas, entre los años 1991 y 2000 en Seattle (137). Los autores observaron una variante de *A. fumigatus* que exhibía una escasa esporulación y una sensibilidad disminuida a los azoles, anfotericina B y equinocandinas; siendo responsable de infecciones fúngicas invasoras en 4 (5%) de los pacientes. Basándose en estudios filogenéticos, estos aislamientos se asignaron a una nueva especie dentro de la sección *Fumigati* bajo el nombre de *A. lentulus* (17). Desde un punto de vista fenotípico, *A. lentulus* presenta en comparación con *A. fumigatus* una esporulación deficiente, conidias más pequeñas y es incapaz de crecer a una temperatura >48°C. Según lo descrito por otros autores (24,108), *A. lentulus* representa sólo una pequeña proporción (0.6% en nuestro estudio) de todas las especies de la sección *Fumigati* aisladas en muestras clínicas, pero puede representar una proporción sustancial (10-30%) de aislamientos resistentes a azoles que se clasifican morfológicamente como *A. fumigatus*. Las infecciones por *A. lentulus* consisten principalmente en API en pacientes con neoplasias hematológicas o receptores de trasplantes de órganos sólidos (109,137,138). A menudo *A. lentulus* se encuentra asociado con *A. fumigatus* en infecciones mixtas que no evolucionan favorablemente (138,139). *Aspergillus lentulus* se caracteriza por una sensibilidad disminuida a los azoles, anfotericina B y equinocandinas (67, 144). El nivel de resistencia de *A. lentulus* a los fármacos triazoles es variable, con una CMI observada mayor para voriconazol que para posaconazol. Esto concuerda con los resultados obtenidos: CIM de 2.0 mg/L frente a voriconazol y de 0.25 mg/L frente a posaconazol. Con respecto a la anfotericina B se obtuvo una CMI de 8.0 mg/L, que correspondió con el valor más alto de la serie. Entre las equinocandinas, hubo una disminución en la sensibilidad de *A. lentulus* principalmente para caspofungina, coincidiendo con lo descrito en la literatura (67,68).

Aunque las especies de *Neosartorya* pertenecen a la misma sección que *A. fumigatus*, rara vez son patógenos significativos en humanos. Existen pocos casos publicados en la literatura. Estos incluyen un caso pediátrico de endocarditis relacionada con injertos después de la corrección de una tetralogía de Fallot congénita, un caso de micosis pulmonar cavitaria en un varón de 57 años y un caso

de queratitis micótica en un varón de 67 años (140–142). En ninguno de estos casos hubo inmunosupresión iatrogénica ni factor de riesgo para el desarrollo de infecciones fúngicas. Respecto a la sensibilidad antifúngica, encontramos en el aislamiento de *N. fischeri* unas CMI más altas para los triazoles en comparación con *A. fumigatus*, pero valores similares para la anfotericina B y las equinocandinas, en consonancia con lo publicado por otros autores (17,68).

La sección *Flavi* está formada por un gran número de especies que son potencialmente patógenas para los humanos y cuya similitud morfológica dificulta determinar las peculiaridades clínicas y epidemiológicas de las infecciones que causan. Las especies crípticas encontradas en nuestra serie fueron *A. nomius*, *A. tamarai* y *A. minisclerotigenes*. *Aspergillus nomius* ha sido descrito como agente causal de onicomiosis y queratitis (143,144); *A. tamarai* se ha descrito principalmente como causante de sinusitis, queratitis y onicomiosis (145–147) y recientemente se han publicado los primeros casos de infección por *A. minisclerotigenes*: 2 casos de infección sinusal y 1 caso de infección paranasal (148). Uno de los hallazgos más interesantes del estudio de Dehghan *et al.* fue la demostración de que las equinocandinas generalmente muestran una mayor actividad *in vitro* que los triazoles y la anfotericina B frente a todas las especies. *Aspergillus tamarai* y *A. minisclerotigenes* fueron las dos especies menos sensibles a voriconazol, mientras que las CMI más altas a posaconazol las encontramos en *A. flavus*. En el caso de los azoles, las CMI de voriconazol para todos los aislamientos fueron más altas que las de posaconazol, lo que está de acuerdo con otros estudios (65,149), mientras que la anfotericina B parece tener una actividad limitada contra la mayoría de las especies de la sección *Flavi*.

Gonçalves *et al.* estudiaron la sensibilidad antifúngica *in vitro* de 77 aislamientos clínicos de *Aspergillus* sección *Flavi* (150), obteniendo que la terbinafina y las equinocandinas mostraron las CMI/CMEs más bajas para todas las especies, seguidas de posaconazol. La anfotericina B mostró CMI ≥ 2.0 mg/L en 38 (49.4%) de los 77 aislamientos testados. En nuestro trabajo obtuvimos los mismos resultados para los antifúngicos ensayados, con la única diferencia de que el 100% de las cepas mostraron CMI ≥ 2.0 mg/L para anfotericina B.

En la sección *Nigri*, *A. tubingensis* es la especie críptica que se aísla con mayor frecuencia (24,98,108,109). En la literatura ya se encuentran casos descritos de queratitis y osteomielitis maxilar producidos por esta especie (151,152), sin olvidar su presencia en las vías respiratorias de pacientes con enfermedad pulmonar (153). En nuestro estudio fue la especie críptica más frecuente, mostrando una actividad frente a los azoles menor que *A. niger*, de modo que al igual que Hendrickx *et al.* (85) encontramos que la especie críptica mostraba una sensibilidad dos veces menor al tratamiento con voriconazol que *A.*

niger. Respecto al antimicótico itraconazol ya se han descrito cepas de *A. tubingensis* resistentes (108), aunque en este estudio no se ha testado. Las CMI frente anfotericina B fueron igual de bajas para las dos especies, a diferencia del estudio FILPOP que describe valores más bajos en *A. tubingensis* que en *A. niger* (24). Estos hallazgos resaltan una vez más la importancia de una correcta identificación a nivel de especie en los aislamientos clínicos y dado que estas especies son morfológicamente indistinguibles, es esencial utilizar métodos moleculares para su correcta identificación (154).

Por su parte, la sección *Circumdati* está formada por 27 especies (23), siendo *A. ochraceus* la más conocida de todas ellas. Dichas especies pueden ser diferenciadas entre sí por características morfológicas, secuenciación génica y perfiles extrolíticos. Numerosas especies de esta sección se han relacionado con diferentes tipos de infecciones, como: onicomiosis por *A. persii* (155), otomicosis por *A. sclerotiorum* (156), y aspergilosis pulmonar y osteomielitis por *A. ochraceus* (157,158). Respecto a la sensibilidad antifúngica *in vitro* de las especies de esta sección hay poco publicado. En general, los azoles parecen tener buena actividad frente *A. ochraceus* y *A. sclerotiorum*; a diferencia de anfotericina B que muestra actividad limitada frente a las especies de esta sección (159), particularmente contra *A. werterdijkiae* (84). Nuestros resultados confirman lo ya publicado, con las CMI más elevadas para el fármaco polieno; siendo la de los azoles más bajas, concretamente para posaconazol. En el estudio llevado a cabo por Siqueira *et al.* sobre 34 aislamientos clínicos de la sección *Circumdati* destacó la actividad de las equinocandinas, concretamente de caspofungina, sobre el resto de antifúngicos (160).

En *A. terreus* obtuvimos CMI más altas para anfotericina B, que para el resto de antifúngicos. La resistencia observada concuerda con lo ya publicado (161), siendo especialmente importante porque durante mucho tiempo fue responsable de que las infecciones causadas por *A. terreus* se asociaran con una baja tasa de respuesta y un peor pronóstico (162).

La sección *Versicolores* consta de 14 especies, algunas con relevancia clínica demostrada y otras menos conocidas (163). Tradicionalmente se ha considerado a *A. versicolor* como la especie de mayor prevalencia, aunque estudios más recientes como el realizado por Siqueira *et al.* describen tan sólo un 1.3% de esta especie frente a un 26% de *A. sydowii* (164). Independientemente de la prevalencia de las especies, lo que sí es evidente es el creciente interés clínico que han despertado debido a los numerosos casos de infección, tanto en hombres como en animales, que han sido publicados (86,165–167).

Uno de los estudios más recientes y completos es el publicado por Siqueira *et al.* en el que estudian la diversidad de especies de esta sección en 77 aislamientos clínicos, así como su sensibilidad *in vitro* a diversos fármacos antifúngicos (164). De nuestra escasa serie de 3 cepas, sólo pudimos testar *A. tabacinus*, que al igual que el trabajo que describimos presenta bajas CMI/CMEs para azoles y equinocandinas, aunque presenta una menor CMI a anfotericina B que la descrita por los autores.

La sección *Nidulantes* consta de 65 especies (168) de las cuales *A. nidulans*, *A. quadrilineatus* y *A. rugulosus* están presentes en nuestra colección. Respecto a la sensibilidad antifúngica destaca la anfotericina B con CMI de hasta 8.0 mg/L para *A. nidulans* y *A. quadrilineatus*, en comparación con los valores máximos de 1 mg/L para *A. rugulosus*. A diferencia de los resultados obtenidos por Verweij *et al.* (169), las cepas de *A. quadrilineatus* no obtuvieron CMI menores que *A. nidulans* frente a los triazoles probados. Desde que se describiera en 1992 la primera infección causada por *A. quadrilineatus* (170), pocos casos de infecciones han sido notificadas por esta especie (169,171,172), siendo necesaria la identificación por métodos moleculares para su adecuada diferenciación de *A. nidulans* y, por tanto, para el correcto manejo terapéutico de los pacientes. Con respecto a las equinocandinas, todas las cepas mostraron CMEs bajas.

La última revisión de la sección *Usti* se realizó en 2011 por Samson *et al.* (173). *Aspergillus calidoustus* fue asignada como nueva especie dentro de esta sección en 2008 (72), siendo numerosos aislamientos denominados como *A. ustus* antes de su descripción. La descripción de la nueva especie provocó nuevos estudios, entre ellos el llevado a cabo por Alastruey-Izquierdo *et al.* en el que reidentificaron por secuenciación (ITS y β -tubulina) 9 cepas identificadas previamente como *A. ustus* mediante técnicas morfológicas (174). Obtuvieron 8 *A. calidoustus* y 1 *A. pseudodeflectus*, que mostraron resistencia a los múltiples azoles ensayados. Estos resultados, al igual que los obtenidos por nosotros, concuerdan con otros trabajos (72,174), tendiendo la sensibilidad a anidulafungina, micafungina, anfotericina B y terbinafina a ser más bajas (24,72,109,175). Los valores más altos de CMI observados en *A. calidoustus* para voriconazol frente a *A. ustus* (175) destacan la importancia que tiene una identificación rápida de la cepa a la hora de elegir la terapia antifúngica dirigida, particularmente porque el voriconazol es el tratamiento de primera línea para muchas formas de aspergilosis. Además, debemos tener en cuenta que *A. calidoustus* se ha convertido en una causa emergente de AI en pacientes inmunodeprimidos, asociándose con una alta tasa de mortalidad (176).

En términos globales y considerando las especies crípticas testadas para la sensibilidad antifúngica *in vitro*, destaca que en torno al 98% de todas ellas mostraron sensibilidad a los 2 triazoles ensayados, siendo la principal excepción *A. calidoustus*. Respecto a la anfotericina B, el 96% de los aislamientos crípticos manifestaron sensibilidad con CMI <4.0 mg/L, salvo las especies *A. lentulus* y *A. pseudoelegans*.

En resumen, los resultados de este estudio hacen hincapié en la necesidad de utilizar métodos moleculares para lograr una correcta identificación a nivel de especie dentro del género *Aspergillus*. Además, hemos demostrado diferentes perfiles de sensibilidad antifúngica en especies de diferentes secciones e incluso en diferentes especies de la misma sección. Por tanto, las pruebas de sensibilidad antifúngica son igualmente importantes y necesarias, siendo esencial llevarlas a cabo de acuerdo con una metodología estandarizada. Más investigaciones de este tipo son necesarias para conocer la prevalencia local de los especies fúngicas más comunes, que ayudarán y guiarán el tratamiento empírico de los diferentes tipos de infecciones fúngicas.

Hemos creado y demostrado la validez y utilidad de la nueva base de datos Hongos Filamentosos-HUVR en el EM MALDI-TOF, mediante el uso de un procedimiento estandarizado para la identificación de aislamientos clínicos de *Aspergillus*, incluyendo especies crípticas de diferentes secciones, crecidos en medios sólidos o líquidos. La elaboración de nuestra base de datos, nos permitió identificar especies crípticas que fenotípicamente habíamos pasado por alto. La biblioteca original de Bruker no poseía entradas de algunas especies que sí se incluyeron en nuestra biblioteca, de modo que la única forma de identificarlas hubiese sido mediante secuenciación, encareciendo y ralentizando el diagnóstico.

Esta tecnología optimizada, podría incorporarse como parte del procedimiento rutinario de identificación del hongo filamentoso en el Laboratorio de Micología, para mejorar la precisión en la identificación de especies clínicamente relevantes de *Aspergillus* y acortar significativamente el tiempo de respuesta.

Sin embargo, son necesarios realizar futuros estudios con nuestra base de datos para confirmar los resultados, evitando el sesgo cometido al incluir las cepas utilizadas en la construcción de la base de datos para su validación.

La creación de bases de datos en el EM MALDI-TOF es un proceso lento y costoso, pero necesario si queremos beneficiarnos de una mejor capacidad de identificación. Como hemos demostrado, esta investigación ha mejorado la identificación de especies de *Aspergillus* en nuestro laboratorio. Por esta razón, la hemos puesto a disposición del fabricante en beneficio de la comunidad científica, en caso de que se considere oportuna su inclusión en futuras actualizaciones del *software*.

Conclusiones

Ampliación y validación de una nueva base de datos
para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF

1. Se ha construido y validado una biblioteca de *Aspergillus* spp. en el espectrómetro de masas MALDI-TOF, a partir de 179 aislamientos clínicos identificados por secuenciación y 11 cepas de referencia, que amplia y complementa a la original y que permite la identificación de un elevado número de especies aisladas a partir de muestras clínicas, incluyendo tanto especies crípticas como no crípticas.
2. La nueva biblioteca consta de 53 entradas que representan a 23 especies. De éstas, 12 son especies crípticas nuevas que no estaban presentes en la biblioteca original, mientras que las 11 especies restantes sí estaban ya incluidas. La biblioteca original incluye de manera exclusiva 7 especies (4 no crípticas y 3 crípticas), mientras que la nueva biblioteca incluye 12, todas ellas crípticas. La suma de ambas bibliotecas suponen 142 entradas que permiten la identificación de 30 especies diferentes de *Aspergillus*: 11 especies no crípticas y 19 especies crípticas.
3. En el 32.4% de las cepas no coincidió la identificación fenotípica con la genotípica, incluyendo este porcentaje como era de esperar a las especies crípticas. La secuenciación parcial del gen de la β -tubulina fue el método que permitió la identificación de la mayoría de las especies crípticas presentes en nuestra colección, corroborando la secuenciación del gen de la calmodulina los resultados obtenidos. Hubo 7 cepas crípticas que fueron únicamente identificadas por secuenciación del gen de la calmodulina.
4. Se ha desarrollado un protocolo para el análisis en el espectrómetro de masas MALDI-TOF, tanto para la creación de la biblioteca como para el proceso de identificación, donde el paso clave es la disgregación del micelio, que resulta decisivo para que en las sucesivas etapas se consiga la liberación óptima de las proteínas y consecuentemente, los espectros que se obtengan sean de mayor calidad.
5. La validación de nuestra base de datos con cepas crecidas en medio sólido y con un punto de corte de ≥ 2.0 , nos permitió obtener correctas identificaciones a nivel de especie en la mayoría de los casos. En casos de cepas identificadas con *scores* de 1.7 a 2.0, la identificación presuntiva, que coincide con la de la secuenciación, se puede confirmar realizando el procedimiento a partir de un subcultivo en medio líquido.
6. La evaluación de la nueva base de datos, sobre 200 aislamientos clínicos de *Aspergillus*, confirmó los resultados anteriores con una identificación a nivel de especie en el 95.5% y a nivel de género en el 4.5% restante.

7. En el Hospital Universitario Virgen del Rocío durante los años 2014-2015, la mayoría de las cepas de *Aspergillus* se aislaron a partir de muestras del tracto respiratorio, considerándose clínicamente relevantes sólo el 11.3% de ellas.
8. La especie aislada con mayor frecuencia fue *A. fumigatus*, seguida de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. tubingensis* y *A. niger*. La prevalencia de especies crípticas en nuestra serie fue del 15.3%, incluyendo especies de las secciones *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Nidulantes* y *Usti*, siendo *A. tubingensis* la más frecuente.
9. Los estudios de sensibilidad antifúngica muestran que las especies crípticas tienden a tener una menor sensibilidad a la anfotericina B y a los fármacos triazoles. Aunque las equinocandinas no son el tratamiento de elección, fueron los fármacos más activos *in vitro*. *Aspergillus calidoustus* fue la única especie resistente a los triazoles, mientras que la resistencia a anfotericina B se observó en numerosas especies, como son: *A. terreus*, *A. lentulus*, *A. ochraceus*, *A. pseudoelegans*, *A. nidulans* y *A. quadrilineatus*.
10. Es imprescindible la identificación correcta de los aislamientos del género *Aspergillus* a nivel de especie, especialmente de los crípticos, ya que éstos poseen diferentes patrones de sensibilidad antifúngica y, su aislamiento se asocia de forma estadísticamente significativa con una mayor relevancia clínica. Todo esto ayudará a conocer mejor la prevalencia real de las infecciones que produzcan y permitirá establecer la terapia empírica más adecuada.
11. Proponemos para la identificación de los aislados clínicos de *Aspergillus* spp, la utilización de la EM a partir de medio sólido siguiendo nuestro método de procesamiento y la base de datos ampliada. Así, la identificación de la cepa a partir de la placa de aislamiento, acortará la demora diagnóstica al tiempo de crecimiento del mismo. En casos donde la identificación de especie no se alcance, proponemos como algoritmo diagnóstico repetir la identificación a partir de medio líquido, seguido si fuera necesario de la secuenciación del gen de la beta tubulina seguido del de la calmodulina.

Bibliografía

Ampliación y validación de una nueva base de datos
para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF

1. Thom, C., Church, M. The Aspergilli. Baltimore: Williams & Wilkins; 1926.
2. Thom, C., Raper, K.B. A Manual of the Aspergilli. Baltimore: Williams & Wilkins; 1945.
3. Benjamin CR. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. Mycologia. 1955;47(5):669–87.
4. Raper, K.B., Fennell, D.I. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1965.
5. Samson, R. A. A compilation of the Aspergilli described since 1965. Stud Mycol. 1979;18.
6. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol. 2014 Jun;78:141–73.
7. Peterson SW, Varga J, Frisvad JV, Samson RA. Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. In: Varga J, Samson RA, editors. *Aspergillus* in the genomic era. Wageningen: Wageningen Academic Publishers; 2008. p. 33–53.
8. Gams, W., Christensen, M., Onions, AH. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson, R. A., Pitt, JI., editors. Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. Plenum Press, New York; 1985. p. 55–62.
9. Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia. 2008 Apr;100(2):205–26.
10. Houbraken J, de Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Adv Appl Microbiol. 2014;86:199–249.
11. McNeill J. International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants (Melbourne Code): Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. Koeltz Scientific Books; 2012. 208 p.
12. Norvell LL. Melbourne approves a new Code. Mycotaxon. 2011 Sep 9;116(1):481–90.
13. Gautier M, Normand A-C, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Aug;22(8):662–9.
14. de Hoog GS, Guarro J, Tan CS, Wintermans RGF, Gené J. Hyphomycetes. In: de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ, editors. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands; 2000. p. 380–1007.
15. Balajee SA, Gribskov J, Brandt M, Ito J, Fothergill A, Marr KA. Mistaken Identity: *Neosartorya pseudofischeri* and Its Anamorph Masquerading as *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2005 Dec 1;43(12):5996–9.

Conclusiones

16. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular Studies Reveal Frequent Misidentification of *Aspergillus fumigatus* by Morphotyping. *Eukaryot Cell*. 2006 Oct 1;5(10):1705–12.
17. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *EukaryotCell*. 2005 Mar;4:625–32.
18. Nedel WL, Pasqualotto AC. Treatment of Infections by Cryptic *Aspergillus* Species. *Mycopathologia*. 2014 Dec 1;178(5–6):441–5.
19. Abarca, M. L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*. 2000;17(3):S79–84.
20. Minter DW, Hawksworth DL, Onions AHS, Kozakiewicz Z. Descriptive Terminology of the Conidiogenous Structures in *Aspergillus* and *Penicillium*. In: Samson RA, Pitt JI, editors. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* [Internet]. Springer US; 1986 [cited 2017 May 29]. p. 71–87. (NATO ASI Series). Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-1856-0_7
21. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 17;109(16):6241–6.
22. Hubka V, Kolarik M. β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia*. 2012 Dec;29:1–10.
23. Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Kocsube S, Yilmaz N, et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *StudMycol*. 2014 Jun;78:1–61.
24. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Pelaez T, Peman J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *AntimicrobAgents Chemother*. 2013 Jul;57:3380–7.
25. Sabino R, Verissimo C, Parada H, Brandao J, Viegas C, Carolino E, et al. Molecular screening of 246 Portuguese *Aspergillus* isolates among different clinical and environmental sources. *MedMycol*. 2014 Jul;52:519–29.
26. Riat A, Hinrikson H, Barras V, Fernandez J, Schrenzel J. Confident identification of filamentous fungi by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry without subculture-based sample preparation. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2015 Jun;35:43–5.
27. Park JH, Shin JH, Choi MJ, Choi JU, Park Y-J, Jang SJ, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of 345 clinical isolates of *Aspergillus* species from 11 Korean

- hospitals: comparison with molecular identification. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Jan;87(1):28–31.
28. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J, et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud Mycol*. 2007;59:39–46.
 29. Kanaani H, Hargreaves M, Ristovski Z, Morawska L. Deposition rates of fungal spores in indoor environments, factors effecting them and comparison with non-biological aerosols. *Atmos Environ*. 2008 Sep 1;42(30):7141–54.
 30. Pariza MW, Johnson EA. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regul Toxicol Pharmacol RTP*. 2001 Apr;33(2):173–86.
 31. Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol Adv*. 2007 Jun;25(3):244–63.
 32. Brooke AG. Industrial Fermentation and *Aspergillus* Citric Acid. In: Powell KA, Renwick A, Peberdy JF, editors. *The Genus Aspergillus* [Internet]. Springer US; 1994 [cited 2017 Jul 4]. p. 129–34. (Federation of European Microbiological Societies Symposium Series). Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-0981-7_8
 33. Dodds DR, Gross RA. Chemicals from Biomass. *Science*. 2007 Nov 23;318(5854):1250–1.
 34. Dijksterhuis J, Samson RA. *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. CRC Press; 2007. 427 p.
 35. Goldman GH, Osmani SA. *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*. CRC Press; 2007. 574 p.
 36. Baker SE, Thykaer J, Adney WS, Brettin TS, Brockman FJ, D'haeseleer P, et al. Fungal genome sequencing and bioenergy. *Fungal Biol Rev*. 2008 Feb 1;22(1):1–5.
 37. Endo, A., Kuroda, M., Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976;29(12):1346–8.
 38. Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol*. 1988 Nov 11;62(15):J10–5.
 39. Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med*. 2009 Apr 30;360(18):1870–84.
 40. R-P. Vonberg, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect*. 2006 Jul 1;63(3):246–54.

Conclusiones

41. Curbelo J, Galván JM, Aspa J. Updates on *Aspergillus*, *Pneumocystis* and other opportunistic pulmonary mycoses. Arch Bronconeumol. 2015 Dec;51(12):647–53.
42. Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. Infect Dis Clin North Am. 2002 Dec;16(4):875–894, vi.
43. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. Infect Dis Clin North Am. 2016 Mar;30(1):125–42.
44. Magan N, Lacey J. Ecological determinants of mould growth in stored grain. Int J Food Microbiol. 1988 Dec 1;7(3):245–56.
45. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Am J Clin Nutr. 2004 Nov 1;80(5):1106–22.
46. Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N., Panneerselvam, A. Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. In: Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology. In Tech; 2011.
47. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):497–516.
48. Bush RK, Portnoy JM, Saxon A, Terr AI, Wood RA. The medical effects of mold exposure. J Allergy Clin Immunol. 2006 Feb 1;117(2):326–33.
49. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJG. Multiple-Triazole-Resistant Aspergillosis. N Engl J Med. 2007 Apr 5;356(14):1481–3.
50. Howard SJ. Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. Mycopathologia. 2014 Dec;178:435–9.
51. Gavaldá Santapau J, Ausina V. Infección por *Aspergillus*. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. 2002 Jan 1;8(68):3625–30.
52. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem. 1975 Feb 1;47(2):219–25.
53. Tanaka K. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). Angew Chem Int Ed. 2003 Aug 25;42(33):3860–70.
54. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct 15;60(20):2299–301.
55. DA Skoog, JJ Leary. Análisis Instrumental. 4ª edición. McGrawHill; 1994.
56. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. ClinChem. 2015 Jan;61:100–11.

57. Kerridge, D., Vanden-Bossche, H. Drug discovery: a biochemist's approach. In: Ryley, J.F., editor. *Chemotherapy of Fungal Diseases*. Springer-Verlag; 1990.
58. Gubbins, P.O., Anaissie, E.J. Antifungal therapy. In: Anaissie, E.J., McGinnis, M.R., Pfaller, M.A., editors. *Clinical Mycology*. First Edition. Elsevier; 2003.
59. Gregori Valdés, S G. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cuba Farm*. 2005 Aug;39(2):1-1.
60. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol*. 2006 Mar 1;23(1):39-49.
61. Lass-Flörl C. Susceptibility testing in *Aspergillus* species complex. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Jun;20 Suppl 6:49-53.
62. Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyiannis DP, et al. Patterns of Susceptibility of *Aspergillus* Isolates Recovered from Patients Enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol*. 2009 Oct 1;47(10):3271-5.
63. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016 Aug 15;63(4):e1-60.
64. Barrett JP, Vardulaki KA, Conlon C, Cooke J, Daza-Ramirez P, Evans EGV, et al. A systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin Ther*. 2003 May 1;25(5):1295-320.
65. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Mar;50(3):917-21.
66. Linden VD, M JW, Warris A, Verweij PE. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol*. 2011 Apr 1;49(Supplement_1):S82-9.
67. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia*. 2014 Dec;178(5-6):427-33.
68. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52:1244-51.
69. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Subcommittee on Antifungal

Conclusiones

- Susceptibility Testing (EUCAST-AFST). EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Jul;18(7):E248-250.
70. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs Version 8.1, 2017. <http://www.eucast.org>.
 71. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann J-W, et al. Voriconazole versus Amphotericin B for Primary Therapy of Invasive Aspergillosis. N Engl J Med. 2002 Aug 8;347(6):408–15.
 72. Varga J, Houbraeken J, Van Der Lee HA, Verweij PE, Samson RA. *Aspergillus calidoustus* sp. nov., causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus*. EukaryotCell. 2008 Apr;7:630–8.
 73. Snelders E, Veld RAGH in 't, Rijs AJMM, Kema GHJ, Melchers WJG, Verweij PE. Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles. Appl Environ Microbiol. 2009 Jun 15;75(12):4053–7.
 74. Arendrup MC, Mavridou E, Mortensen KL, Snelders E, Frimodt-Møller N, Khan H, et al. Development of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* during Azole Therapy Associated with Change in Virulence. PLOS ONE. 2010 abr;5(4):e10080.
 75. Pacetti SA, Gelone SP. Caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. Ann Pharmacother. 2003 Jan;37(1):90–8.
 76. Aguilar-Zapata D, Petraitiene R, Petraitis V. Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. Clin Infect Dis. 2015 Dec 1;61(suppl_6):S604–11.
 77. Antachopoulos C, Meletiadis J, Sein T, Roilides E, Walsh TJ. Comparative In Vitro Pharmacodynamics of Caspofungin, Micafungin, and Anidulafungin against Germinated and Nongerminated *Aspergillus* Conidia. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Jan 1;52(1):321–8.
 78. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, et al. 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. J Clin Microbiol. 2009 Oct 1;47(10):3323–5.
 79. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Version 9.3, 2015. <http://www.eucast.org>.
 80. Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia. 2005 Nov;97:1316–29.

81. Cantón, E., Cuenca, M.E., Espinel-Ingroff, A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Rev Iberoam Micol [Internet]. 2007 [cited 2017 Jun 5];15. Available from: https://www.researchgate.net/publication/269399354_Metodos_estandarizados_por_el_CLSI_para_el_estudio_de_la_sensibilidad_a_los_antifungicos_documentos_M27-A3_M38-A_y_M44-A
82. Hope WW, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Arendrup MC, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-AFST). EUCAST technical note on voriconazole and *Aspergillus* spp. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Jun;19(6):E278-280.
83. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for antifungal susceptibility testing as recommended by EUCAST. Version 1.0, 2015. <http://www.eucast.org>.
84. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. AnnNYAcadSci. 2012 Dec;1273:18–24.
85. Hendrickx M, Beguin H, Detandt M. Genetic re-identification and antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* section *Nigri* strains of the BCCM/IHEM collection. Mycoses. 2012 Mar;55:148–55.
86. Negri CE, Goncalves SS, Xafranski H, Bergamasco MD, Aquino VR, Castro PT, et al. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. J Clin Microbiol. 2014 Oct;52:3633–40.
87. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? J Clin Microbiol. 2009 Apr;47:877–84.
88. Cassagne C, Normand A-C, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. Mycoses. 2016 Nov 1;59(11):678–90.
89. De CE, 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 May;18:475–84.
90. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Aug 15;49(4):543–51.

Conclusiones

91. Normand A-C, Cassagne C, Ranque S, L'ollivier C, Fourquet P, Roesems S, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol.* 2013 Apr 8;13:76.
92. Normand A-C, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, et al. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol.* 2017;(1).
93. Tam EW, Chen JH, Lau EC, Ngan AH, Fung KS, Lee KC, et al. Misidentification of *Aspergillus nomius* and *Aspergillus tamaritii* as *Aspergillus flavus*: characterization by internal transcribed spacer, beta-Tubulin, and calmodulin gene sequencing, metabolic fingerprinting, and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2014 Apr;52:1153–60.
94. Sanguinetti M, Posteraro B. MALDI-TOF mass spectrometry: any use for *Aspergilli*? *Mycopathologia.* 2014 Dec;178:417–26.
95. Masih A, Singh PK, Kathuria S, Agarwal K, Meis JF, Chowdhary A. Identification by Molecular Methods and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Antifungal Susceptibility Profiles of Clinically Significant Rare *Aspergillus* Species in a Referral Chest Hospital in Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 2016 Sep;54(9):2354–64.
96. Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect.* 2011 May;17:750–5.
97. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a Clinically Comprehensive Database and Simple Procedure for the Identification of Molds from Solid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012 Dec 26;JCM.02852-12.
98. Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Varga J, Denning DW. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Oct;55(10):4802–9.
99. Welham KJ, Domin MA, Johnson K, Jones L, Ashton DS. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2000;14(5):307–10.
100. Li TY, Liu BH, Chen YC. Characterization of *Aspergillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2000;14(24):2393–400.
101. Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser

- desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. PLoSOne. 2011;6:e28425-.
102. Bruker Daltonics. Fungi Library - MALDI Biotyper. Bruker Daltonics, MA, USA. 2012.
 103. Schulthess B, Ledermann R, Mouttet F, Zbinden A, Bloemberg GV, Bottger EC, et al. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. J Clin Microbiol. 2014 Aug;52:2797–803.
 104. Panda A, Ghosh AK, Mirdha BR, Xess I, Paul S, Samantaray JC, et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. J Microbiol Methods. 2015 Feb;109:93–105.
 105. Gautier M, Ranque S, Normand AC, Becker P, Packeu A, Cassagne C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. Clin Microbiol Infect. 2014 Dec;20:1366–71.
 106. Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar J. Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Med Mycol [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 10]; Available from: <https://academic.oup.com/mmy/advance-article/doi/10.1093/mmy/myx115/4714789>
 107. Abarca ML, Accensi F, Cano J, Cabañes FJ. Taxonomy and significance of black aspergilli. Antonie Van Leeuwenhoek. 2004 Jul;86(1):33–49.
 108. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Oct;53(10):4514–7.
 109. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. J Clin Microbiol. 2009 Oct;47:3138–41.
 110. Hsueh P-R, Lau Y-J, Chuang Y-C, Wan J-H, Huang W-K, Shyr J-M, et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Feb;49(2):512–7.
 111. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. In vitro survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. J Clin Microbiol. 2008 Aug;46(8):2568–72.

Conclusiones

112. Li Y, Wan Z, Liu W, Li R. Identification and susceptibility of *Aspergillus* section *Nigri* in China: prevalence of species and paradoxical growth in response to echinocandins. *J Clin Microbiol*. 2015 Feb;53:702–5.
113. Mayr A, Lass-Flörl C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature. *Eur J Med Res*. 2011 Apr 28;16(4):153–7.
114. Lamoth F, Calandra T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Mar 1;72(suppl_1):i19–28.
115. Xess I, Mohanty S, Jain N, Banerjee U. Prevalence of *Aspergillus* species in clinical samples isolated in an Indian tertiary care hospital. *Indian J Med Sci*. 2004 Dec;58(12):513–9.
116. Amatya R, Khanal B, Mahato PK, Shrestha S. *Aspergillus* species in clinical specimen: a seven year prevalence study from eastern Nepal. *Nepal Med Coll J NMCJ*. 2011 Sep;13(3):175–7.
117. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2012;30:201–8.
118. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2002 Apr 1;34(7):909–17.
119. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007 Feb 15;44(4):531–40.
120. Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyiannis DP, Alexander BD, Kauffman CA, et al. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2010 Jun 15;50(12):1559–67.
121. Ohara S, Tazawa Y, Tanai C, Tanaka Y, Noda H, Horiuchi H, et al. Clinical characteristics of patients with *Aspergillus* species isolation from respiratory samples: Comparison of chronic pulmonary aspergillosis and colonization. *Respir Investig*. 2016 Mar;54(2):92–7.
122. Yii AC, Koh MS, Lapperre TS, Tan GL, Chotirmall SH. The emergence of *Aspergillus* species in chronic respiratory disease. *Front Biosci Sch Ed*. 2017 Jan 1;9:127–38.
123. Barberan J, Candel FJ, Arribi A. How should we approach *Aspergillus* in lung secretions of patients with COPD? *RevEspQuimioter*. 2016 May 13;
124. Lobo LJ, Noone PG. Respiratory infections in patients with cystic fibrosis undergoing lung transplantation. *Lancet Respir Med*. 2014 Jan;2:73–82.

125. Rick EM, Woolnough K, Pashley CH, Wardlaw AJ. Allergic Fungal Airway Disease. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26(6):344–54.
126. Máiz L, Vendrell M, Oliveira C, Girón R, Nieto R, Martínez-García MÁ. Prevalence and factors associated with isolation of *Aspergillus* and *Candida* from sputum in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Respir Int Rev Thorac Dis*. 2015;89(5):396–403.
127. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med Mycol*. 2009 Jun;47(4):387–97.
128. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2010 Jan;137(1):171–6.
129. Barnes A, Denning D. Aspergilli-significance as pathogens. *Rev Med Microbiol*. 1993;4(3):176–180.
130. Gharaghani M, Seifi Z, Zarei Mahmoudabadi A. Otomycosis in iran: a review. *Mycopathologia*. 2015 Jun;179(5–6):415–24.
131. Barati B, Okhovvat S a. R, Goljanian A, Omrani MR. Otomycosis in central iran: a clinical and mycological study. *Iran Red Crescent Med J*. 2011 Dec;13(12):873–6.
132. Abdelazeem M, Gamea A, Mubarak H, Elzawawy N. Epidemiology, causative agents, and risk factors affecting human otomycosis infections. *Turk J Med Sci*. 2015;45(4):820–6.
133. Gupta AK, Versteeg SG, Shear NH. Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. *J Cutan Med Surg*. 2017 Jun 1;1203475417716362.
134. Narain U, Bajaj AK. Onychomycosis: role of non dermatophytes. *Int J Adv Med*. 2016 Dec 29;3(3):643–7.
135. Vermeulen E, Maertens J, Meersseman P, Saegeman V, Dupont L, Lagrou K. Invasive *Aspergillus niger* complex infections in a Belgian tertiary care hospital. *ClinMicrobiolInfect*. 2014 May;20:0333–5.
136. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol*. 2016;7:683.
137. Balajee SA, Weaver M, Imhof A, Gribskov J, Marr KA. *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Apr;48(4):1197–203.

Conclusiones

138. Escribano P, Peláez T, Muñoz P, Bouza E, Guinea J. Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun;57(6):2815–20.
139. Montenegro G, Sánchez Puch S, Jewtuchowicz VM, Pinoni MV, Relloso S, Temporitti E, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis. *J Med Microbiol.* 2009 Mar;58(Pt 3):391–5.
140. Summerbell RC, de Repentigny L, Chartrand C, St Germain G. Graft-related endocarditis caused by *Neosartorya fischeri* var. *spinosa*. *J Clin Microbiol.* 1992 Jun;30(6):1580–2.
141. Gerber J, Chomicki J, Brandsberg JW, Jones R, Hammerman KJ. Pulmonary Aspergillosis Caused by *Aspergillus fischeri* var. *spinusus*: Report of a Case and Value of Serologic Studies. *Am J Clin Pathol.* 1973 Dec 1;60(6):861–6.
142. Coriglione G, Stella G, Gafa L, Spata G, Oliveri S, Padhye AA, et al. *Neosartorya fischeri* var. *fischeri* (Wehmer) Malloch and Cain 1972 (anamorph: *Aspergillus fischerianus* Samson and Gams 1985) as a cause of mycotic keratitis. *Eur J Epidemiol.* 1990 Dec;6(4):382–5.
143. Zotti M, Machetti M, Persi A, Barabino G, Parodi A. Onychomycosis: first case due to *Aspergillus nomius*. *Acta Derm Venereol.* 2011 Sep;91(5):591–2.
144. Manikandan P, Varga J, Kocsubé S, Samson RA, Anita R, Revathi R, et al. Mycotic keratitis due to *Aspergillus nomius*. *J Clin Microbiol.* 2009 Oct;47(10):3382–5.
145. Paludetti G, Rosignoli M, Ferri E, Cesari MR, Morace G, Fantoni M, et al. [Invasive nasosinus aspergillosis in an immunocompetent patient]. *Acta Otorhinolaryngol Ital Organo Uff Della Soc Ital Otorinolaringol E Chir Cerv-facc.* 1992 Dec;12(6):581–91.
146. Kredics L, Varga J, Kocsubé S, Dóczy I, Samson RA, Rajaraman R, et al. Case of keratitis caused by *Aspergillus tamaris*. *J Clin Microbiol.* 2007 Oct;45(10):3464–7.
147. Kristensen L, Stenderup J, Otkjaer A. Onychomycosis due to *Aspergillus tamaris* in a 3-year-old boy. *Acta Derm Venereol.* 2005;85(3):261–2.
148. Dehghan P, Bui T, Campbell LT, Lai Y-W, Tran-Dinh N, Zaini F, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of clinical isolates of *Aspergillus flavus* from Iran reveals the first cases of *Aspergillus minisclerotigenes* associated with human infection. *BMC Infect Dis.* 2014 Jul 1;14:358.
149. Gomez-Lopez A, Garcia-Effron G, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. In vitro activities of three licensed antifungal agents against

- spanish clinical isolates of *Aspergillus* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Oct;47(10):3085–8.
150. Gonçalves SS, Stchigel AM, Cano J, Guarro J, Colombo AL. In vitro antifungal susceptibility of clinically relevant species belonging to *Aspergillus* section *Flavi*. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Apr;57(4):1944–7.
 151. Kredics L, Varga J, Kocsubé S, Rajaraman R, Raghavan A, Dóczy I, et al. Infectious keratitis caused by *Aspergillus tubingensis*. Cornea. 2009 Sep;28(8):951–4.
 152. Bathoorn E, Escobar Salazar N, Sephehrkhoy S, Meijer M, de Cock H, Haas P-J. Involvement of the opportunistic pathogen *Aspergillus tubingensis* in osteomyelitis of the maxillary bone: a case report. BMC Infect Dis. 2013 Feb 1;13:59.
 153. Gautier M, Normand A-C, L'Ollivier C, Cassagne C, Reynaud-Gaubert M, Dubus J-C, et al. *Aspergillus tubingensis*: a major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. Med Mycol. 2016 Jul 1;54(5):459–70.
 154. Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. Stud Mycol. 2007;59:129–45.
 155. Zotti M, Machetti M, Perotti M, Barabino G, Persi A. A new species, *Aspergillus persii*, as an agent of onychomycosis. Med Mycol. 2010 Jun;48(4):656–60.
 156. Harima N, Inoue T, Kubota T, Okada O, Ansai S, Manabe M, et al. A case of otomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum*. J Dermatol. 2004 Nov;31(11):949–50.
 157. Moazam S, Denning DW. *Aspergillus* nodules in chronic granulomatous disease attributable to *Aspergillus ochraceus*. Med Mycol Case Rep. 2017 Sep;17:31–3.
 158. Babamahmoodi F, Shokohi T, Ahangarkani F, Nabili M, Afzalian Ashkezari E, Alinezhad S. Rare Case of *Aspergillus ochraceus* Osteomyelitis of Calcaneus Bone in a Patient with Diabetic Foot Ulcers. Case Rep Med. 2015;2015:509827.
 159. Arabatzis M, Kambouris M, Kyprianou M, Chrysaki A, Foustoukou M, Kanellopoulou M, et al. Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2011 Mar 28 [cited 2017 Oct 30]; Available from: <http://aac.asm.org/content/early/2011/03/28/AAC.01491-10>
 160. Siqueira JPZ, Sutton DA, Gené J, García D, Wiederhold N, Peterson SW, et al. Multilocus Phylogeny and Antifungal Susceptibility of *Aspergillus* Section *Circumdati* from Clinical Samples and Description of *A. pseudosclerotiorum* sp. nov. J Clin Microbiol. 2017 Mar;55(3):947–58.

161. Lass-Flörl C, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Perkhofer S, Rodriguez-Tudela JL. In vitro activities of various antifungal drugs against *Aspergillus terreus*: Global assessment using the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Feb;53(2):794–5.
162. Lass-Flörl C, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, et al. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br J Haematol.* 2005 Oct;131(2):201–7.
163. Jurjevic Z, Peterson SW, Horn BW. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus.* 2012 Jun;3(1):59–79.
164. Siqueira JPZ, Sutton DA, García D, Gené J, Thomson P, Wiederhold N, et al. Species diversity of *Aspergillus* section *Versicolores* in clinical samples and antifungal susceptibility. *Fungal Biol.* 2016 Nov;120(11):1458–67.
165. Zhang S, Corapi W, Quist E, Griffin S, Zhang M. *Aspergillus versicolor*, a new causative agent of canine disseminated aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2012 Jan;50(1):187–91.
166. Kane S, Pinto JM, Dadzie CK, Dawis MAC. Aspergilloma caused by *Aspergillus versicolor*. *Pediatr Infect Dis J.* 2014 Aug;33(8):891.
167. Borsa BA, Özgün G, Houbraken J, Ökmen F. The first case of persistent vaginitis due to *Aspergillus protuberus* in an immunocompetent patient. *Mikrobiyol Bul.* 2015 Jan;49(1):130–4.
168. Chen AJ, Frisvad JC, Sun BD, Varga J, Kocsubé S, Dijksterhuis J, et al. *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Stud Mycol.* 2016 Jun;84:1–118.
169. Verweij PE, Varga J, Houbraken J, Rijs AJMM, Verduynlunel FM, Blijlevens NMA, et al. *Emericella quadrilineata* as cause of invasive aspergillosis. *Emerg Infect Dis.* 2008 Apr;14(4):566–72.
170. Polacheck I, Nagler A, Okon E, Drakos P, Plaskowitz J, Kwon-Chung KJ. *Aspergillus quadrilineatus*, a new causative agent of fungal sinusitis. *J Clin Microbiol.* 1992 Dec;30(12):3290–3.
171. Sharma D, Capoor MR, Ramesh V, Gupta S, Shivaprakash MR, Chakrabarti A. A rare case of onychomycosis caused by *Emericella quadrilineata* (*Aspergillus tetrazonus*). *Indian J Med Microbiol.* 2015 Jun;33(2):314–6.
172. Gugnani HC, Vijayan VK, Tyagi P, Sharma S, Stchigel AM, Guarro J. Onychomycosis due to *Emericella quadrilineata*. *J Clin Microbiol.* 2004 Feb;42(2):914–6.

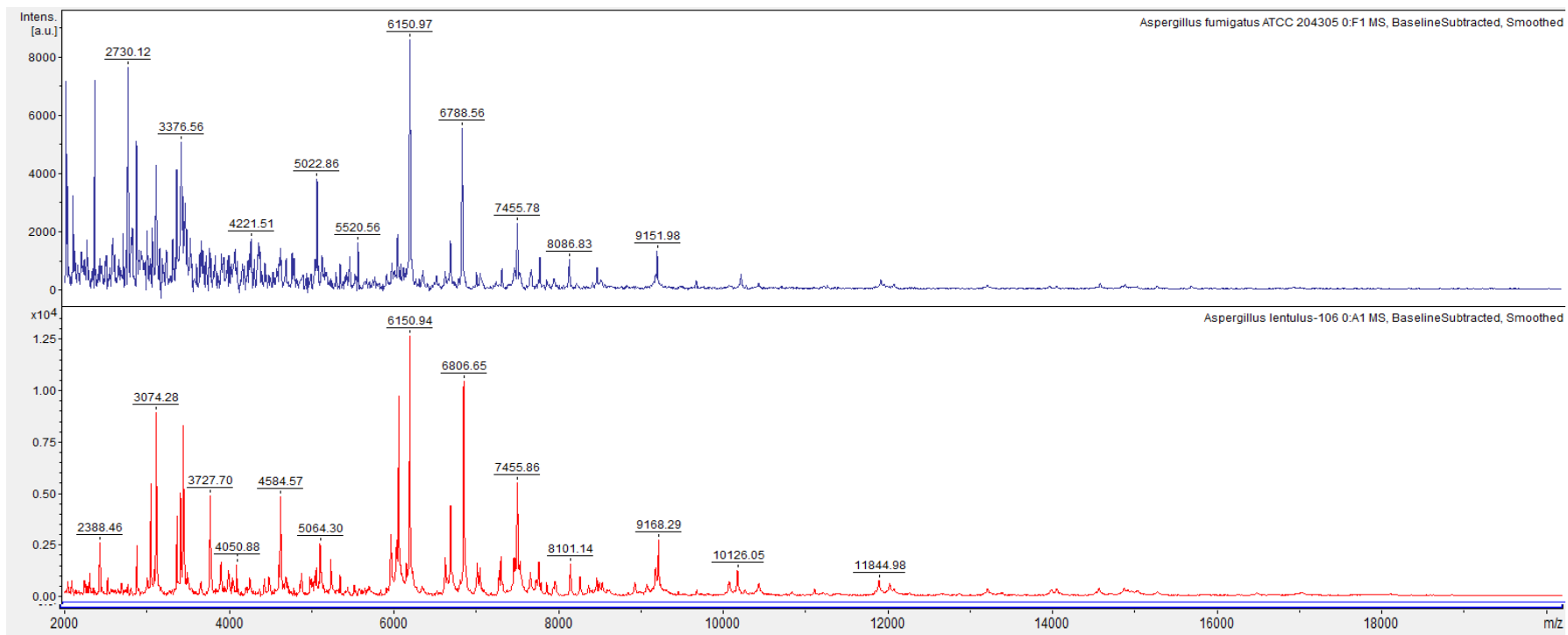
173. Samson RA, Varga J, Meijer M, Frisvad JC. New taxa in *Aspergillus* section *Usti*. *StudMycol*. 2011 Jun 30;69:81–97.
174. Alastruey-Izquierdo A, Cuesta I, Houbraken J, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. In vitro activity of nine antifungal agents against clinical isolates of *Aspergillus calidoustus*. *MedMycol*. 2010 Feb;48:97–102.
175. Egli A, Fuller J, Humar A, Lien D, Weinkauff J, Nador R, et al. Emergence of *Aspergillus calidoustus* infection in the era of posttransplantation azole prophylaxis. *Transplantation*. 2012 Aug 27;94(4):403–10.
176. Seroy J, Antiporta P, Grim SA, Proia LA, Singh K, Clark NM. *Aspergillus calidoustus* case series and review of the literature. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. 2017 Jul 25;

Anexos

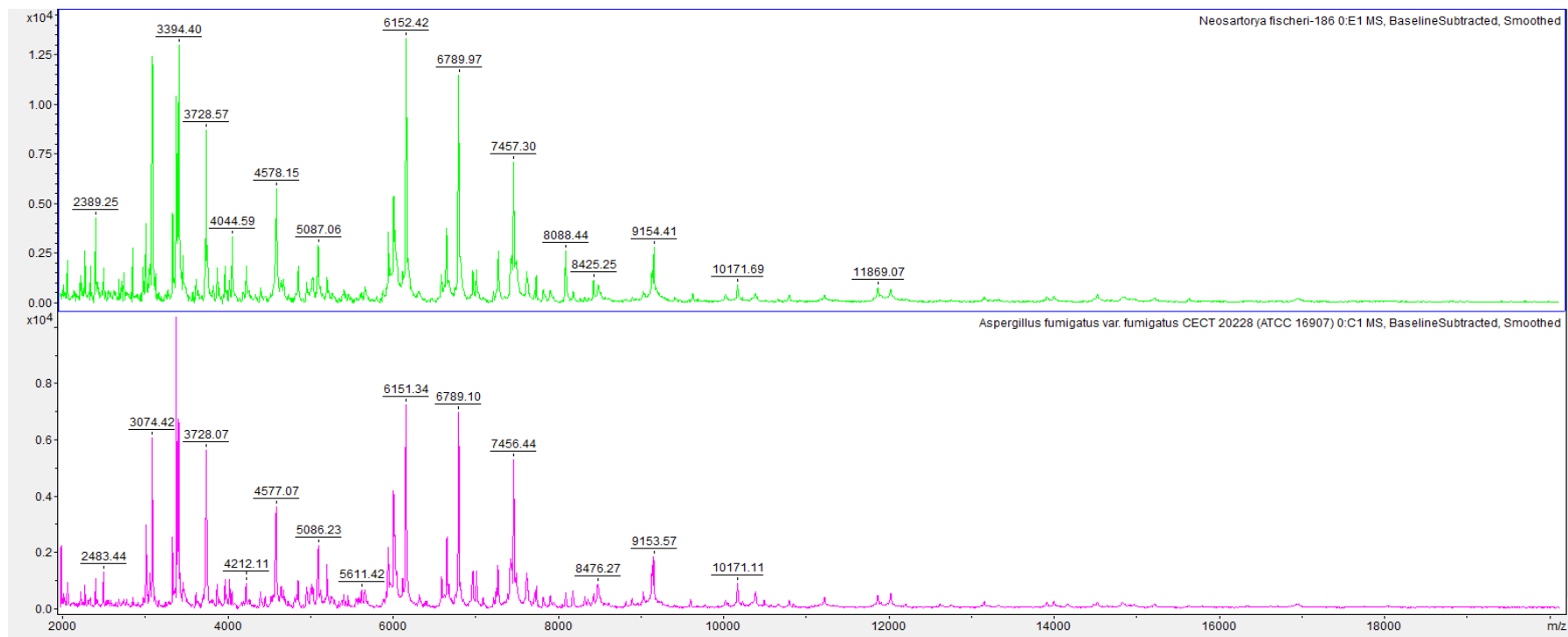
Ampliación y validación de una nueva base de datos
para la identificación de *Aspergillus* spp.
mediante EM MALDI-TOF

Anexo 1. Espectros de *Aspergillus* spp.

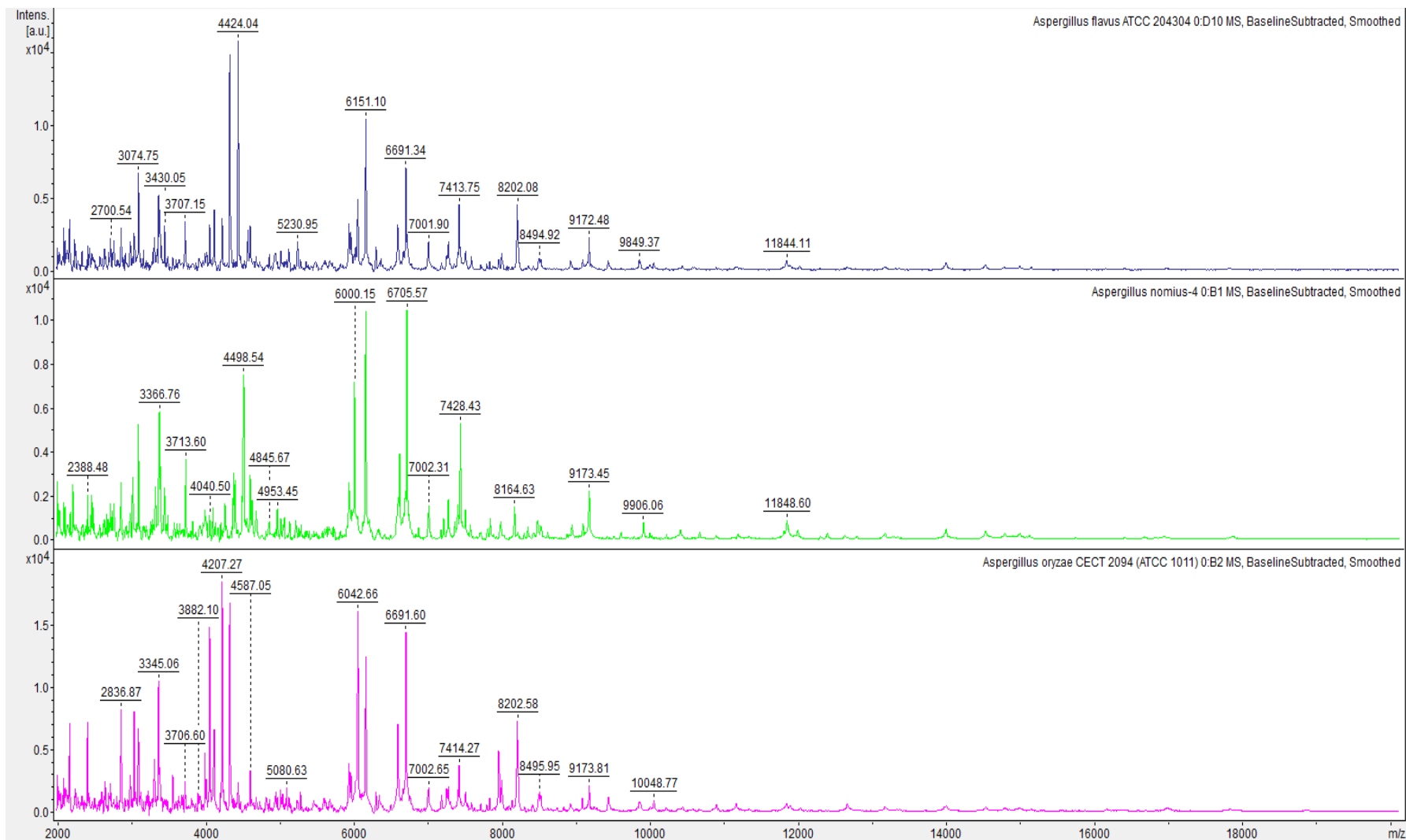
Sección *Fumigati*



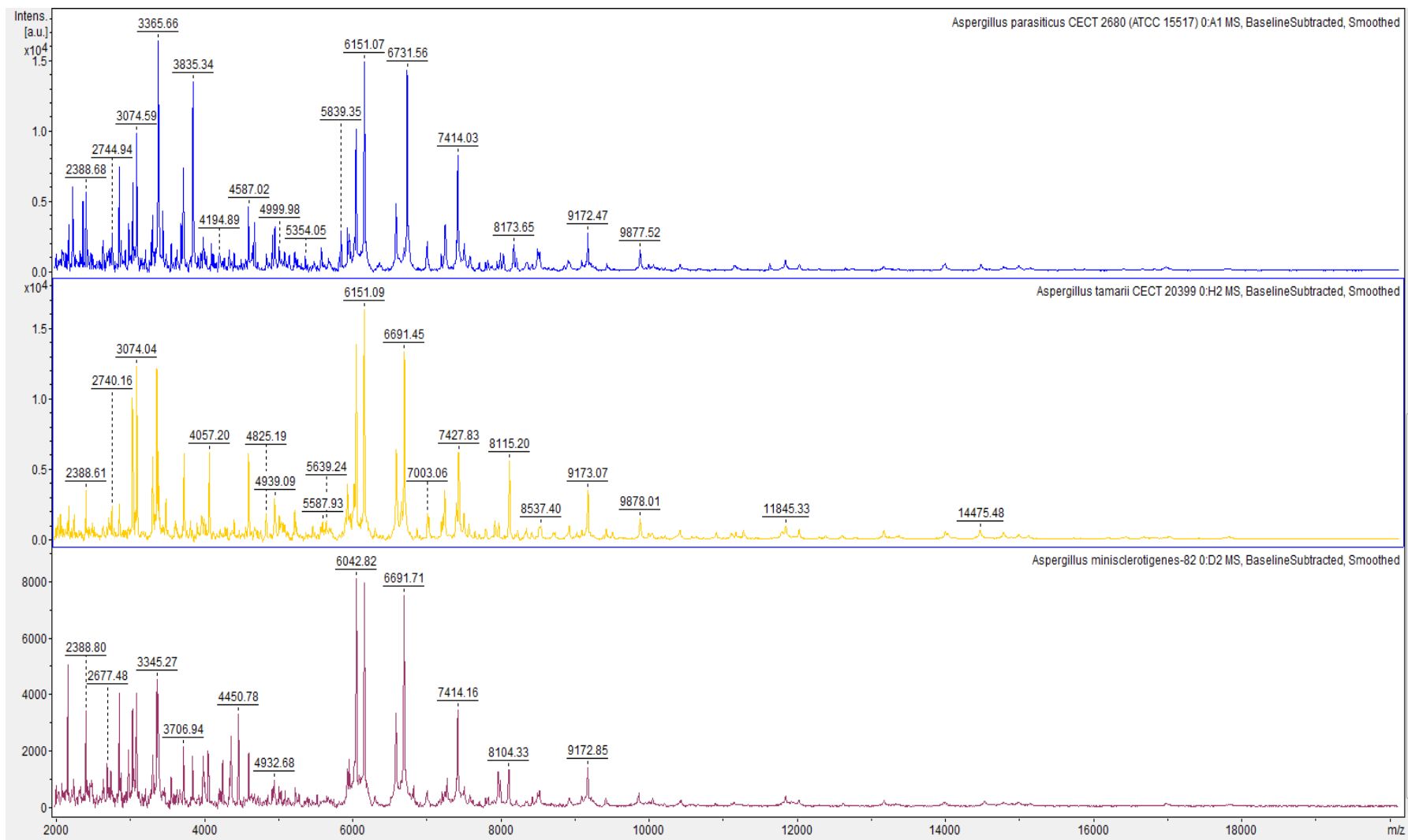
Anexo 1



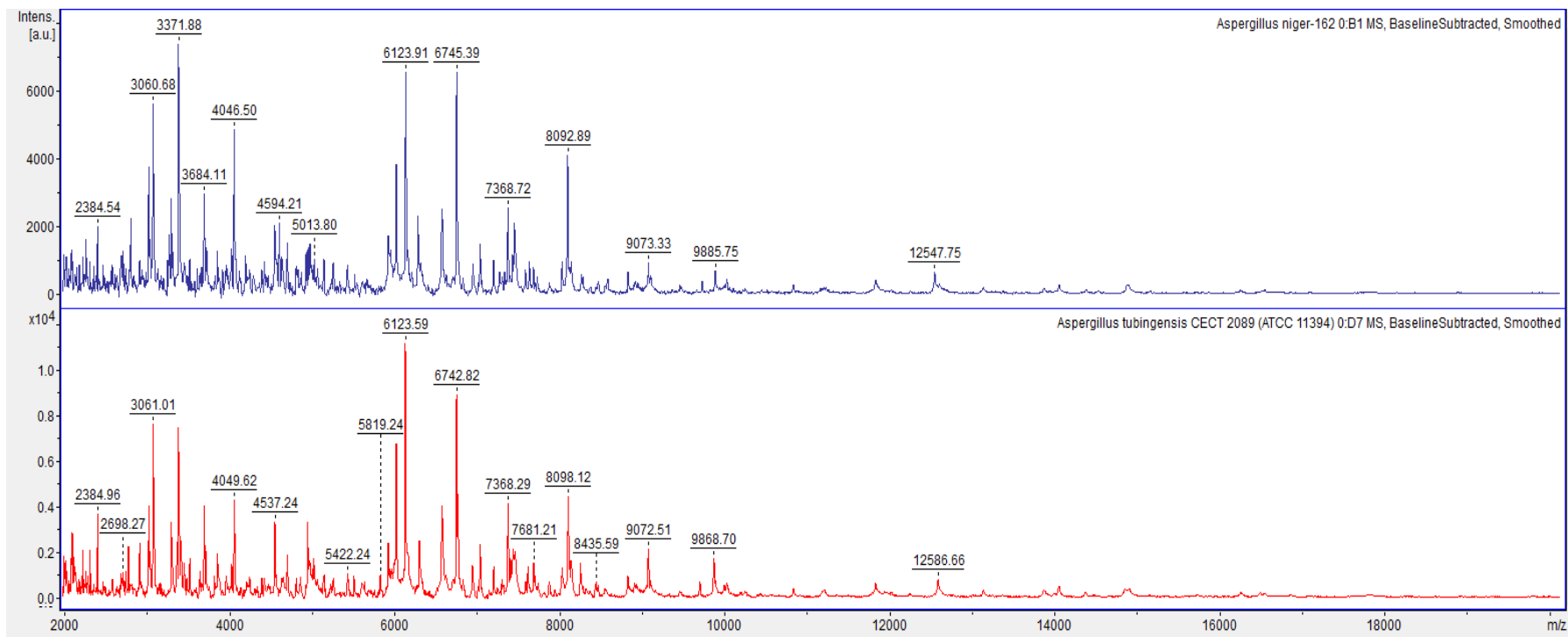
Sección Flavi



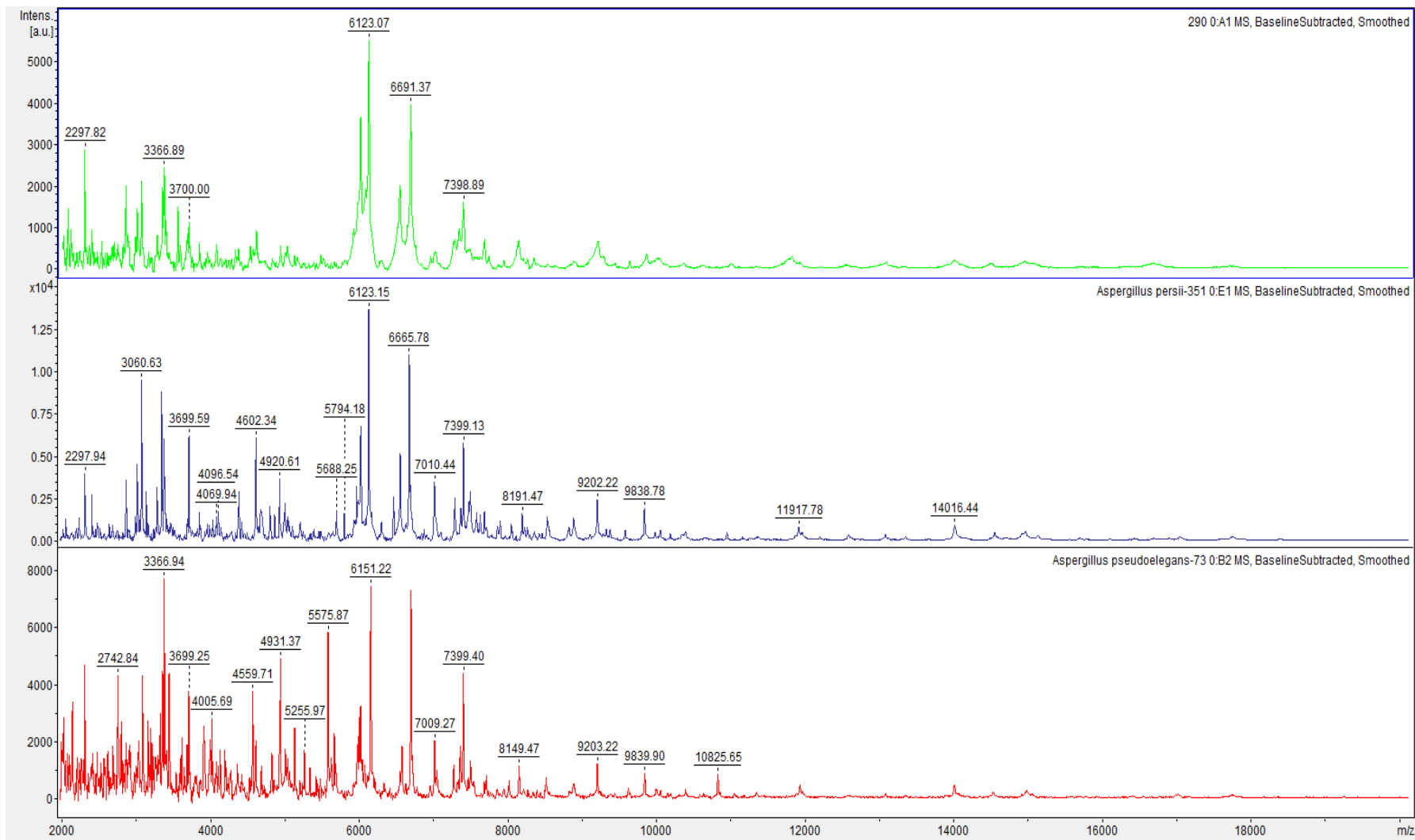
Anexo 1



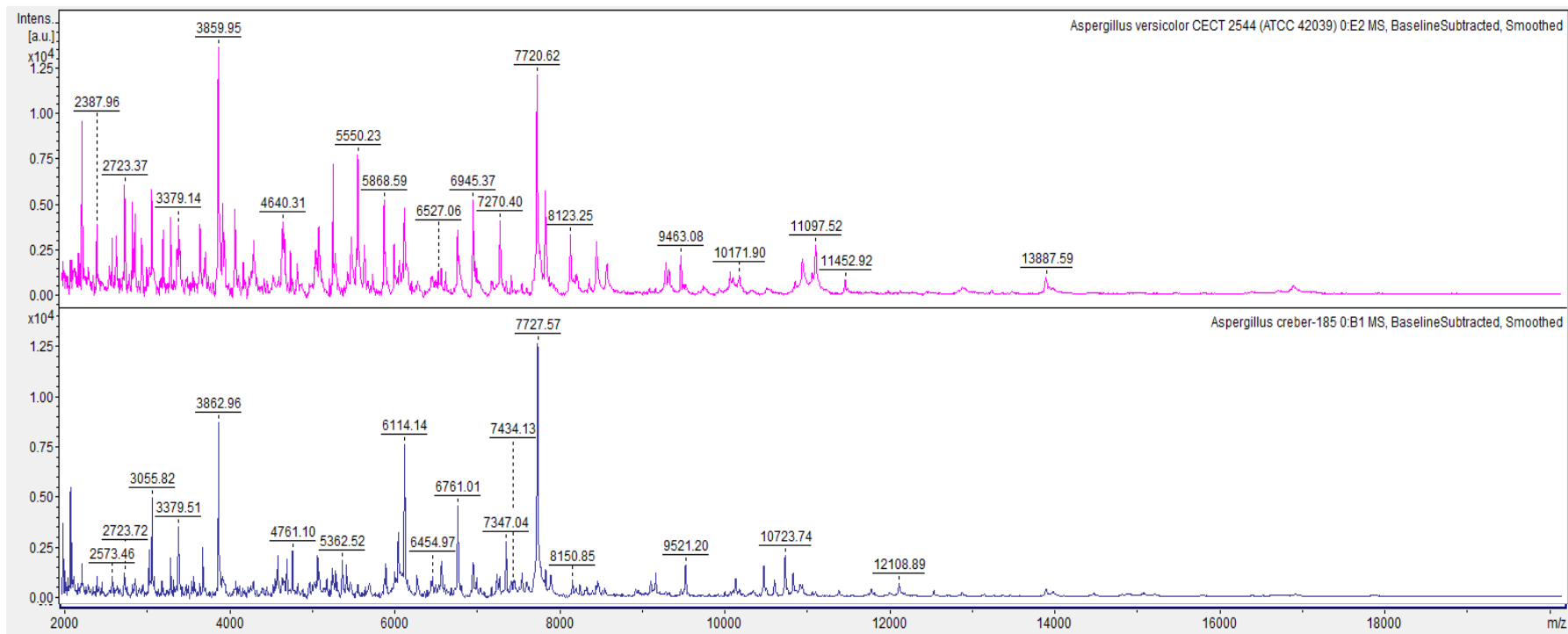
Sección Nigri



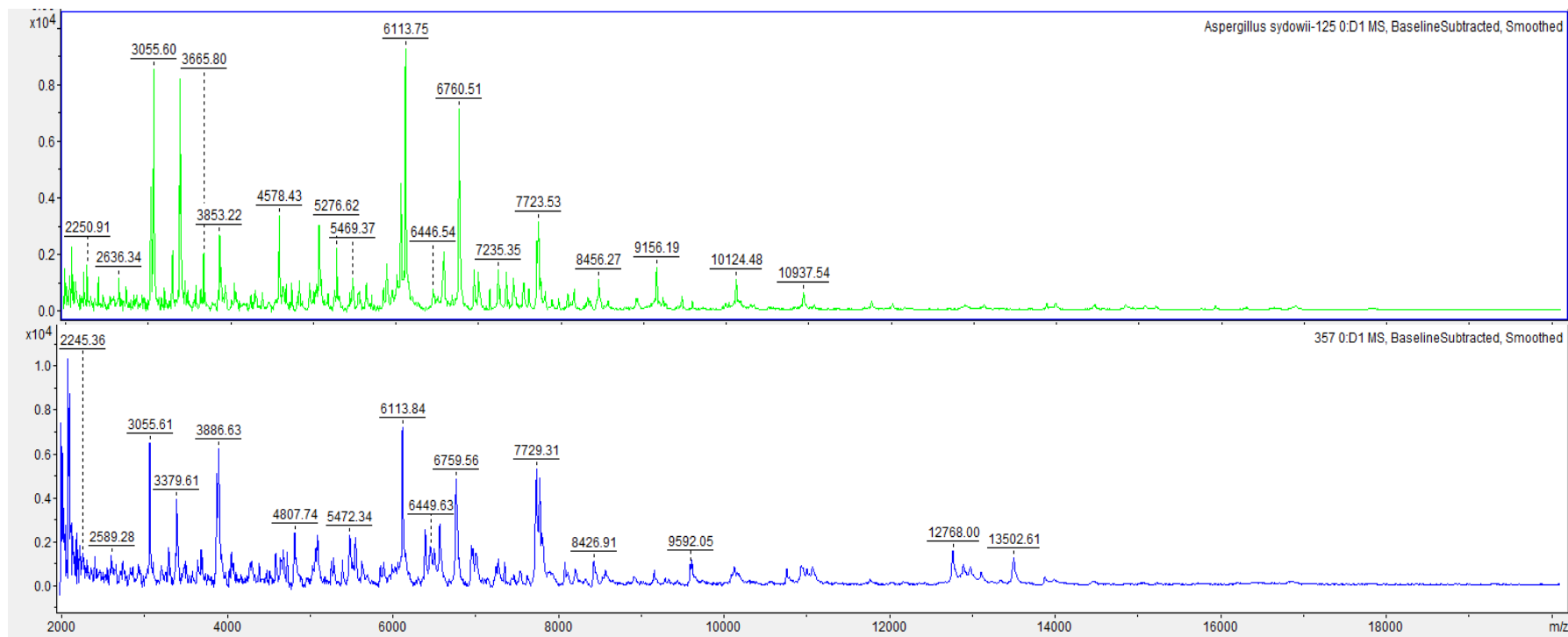
Sección *Circumdati*



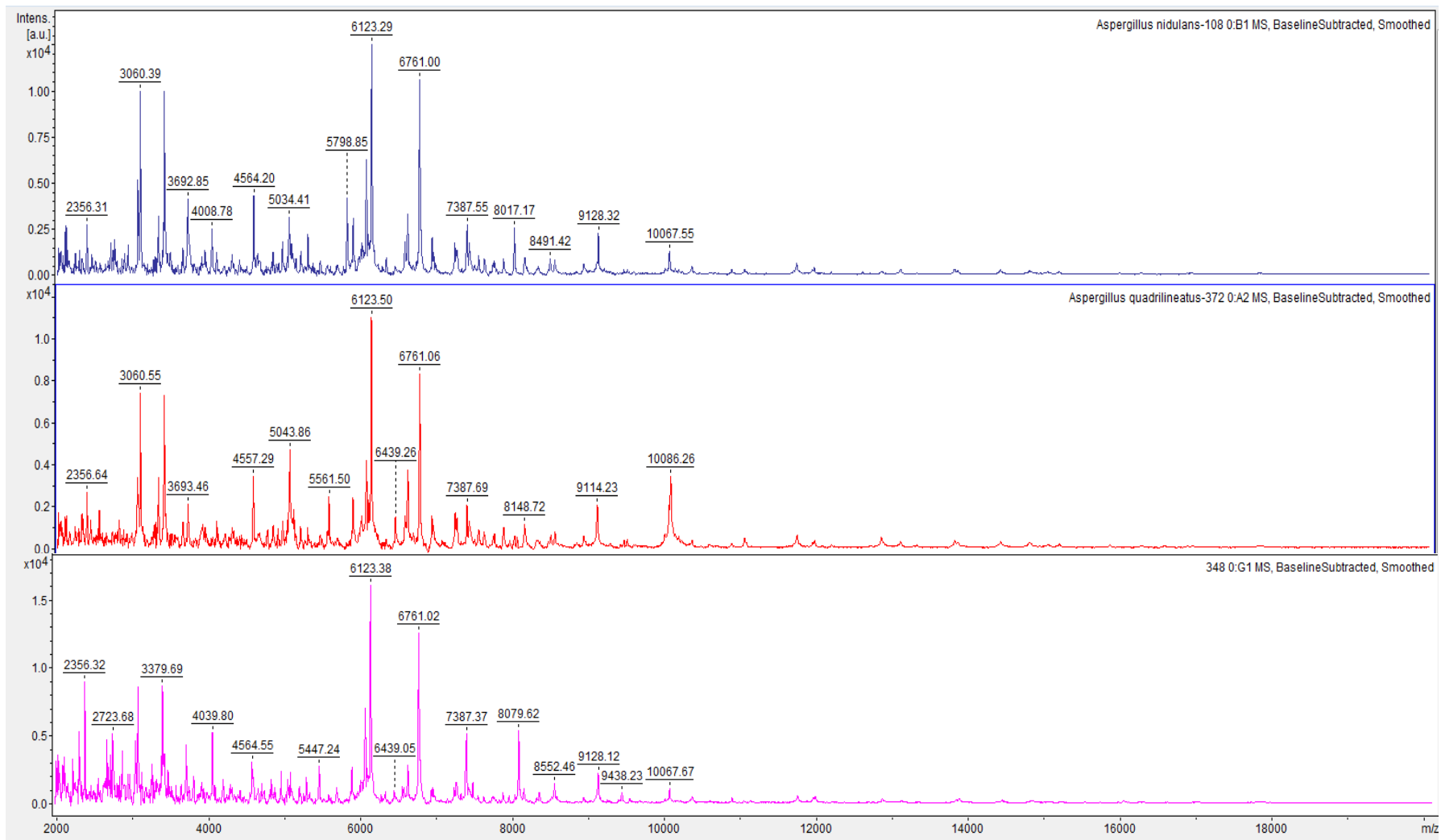
Sección *Versicolores*



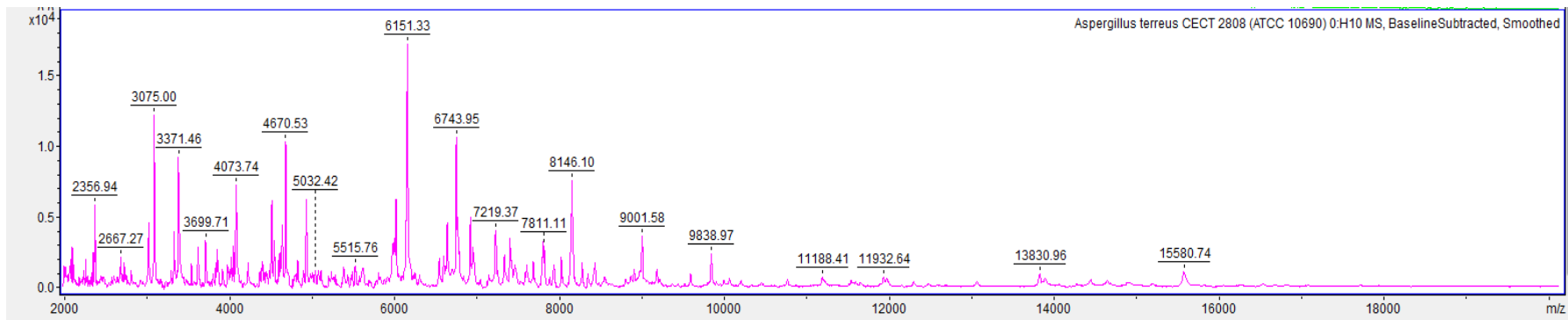
Anexo 1



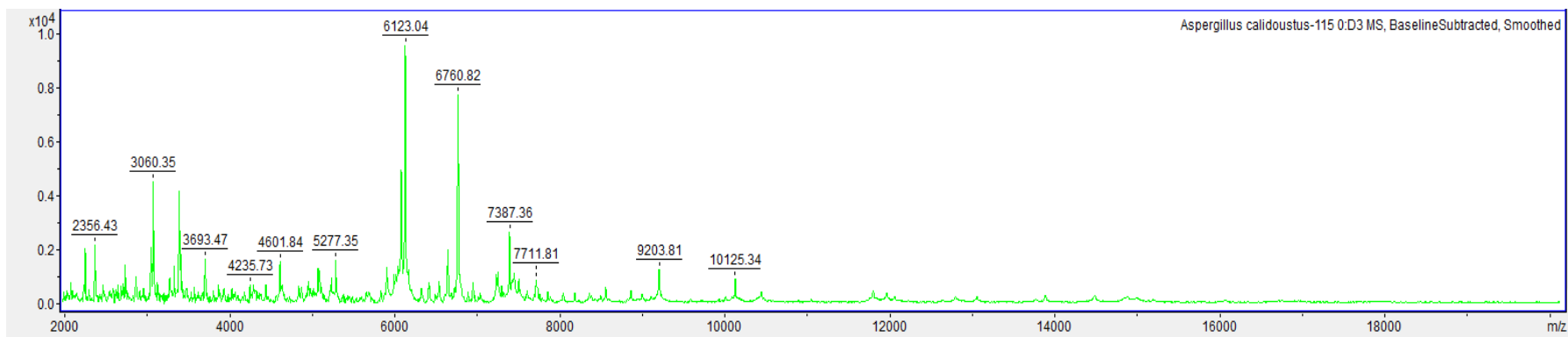
Sección *Nidulantes*



Sección *Terrei*



Sección *Usti*



Anexo 2. Publicación científica