



Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

Departamento de Bacteriología - Micología

**Susceptibilidad a triazoles y pesquisa
de la mutación M220 en aislados de
*Aspergillus fumigatus***

Tesis para optar por el título de Máster en
Bacteriología - Micología

Lic. Javier Luis San Juan Galán

La Habana



Departamento de Bacteriología – Micología
Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

Tesis de Maestría

Susceptibilidad a triazoles y pesquisa
de la mutación M220 en aislados de
Aspergillus fumigatus

Autor: Javier Luis San Juan Galán

Tutor: DrC. Carlos M. Fernández Andreu

Asesor: Dr. Gerardo F. Martínez Machín

La Habana, 2019

“Hacer las cosas bien importa más que el hacerlas”

C. M. F. A.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS	3
III.	MARCO TEÓRICO.....	4
III.1	Antecedentes	4
III.2	Identificación y ubicación taxonómica de <i>Aspergillus fumigatus</i>	5
III.3	Ecología y distribución.....	6
III.4	Patogénesis de la infección pulmonar y respuesta del hospedero	7
III.5	Diagnóstico de la aspergilosis pulmonar.....	8
III.6	Los triazoles en el tratamiento de la aspergilosis.....	11
III.7	Susceptibilidad antifúngica en <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
III.8	Mecanismos de resistencia a triazoles en <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
III.9	<i>Aspergillus fumigatus</i> y aspergilosis en Cuba.....	16
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
IV.1	Aislados.....	18
IV.2	Pruebas de susceptibilidad	18
IV.3	Extracción de ácidos nucleicos	19
IV.4	Amplificación del fragmento del gen <i>cyp51A</i>	20
IV.5	Secuenciación.....	20
IV.6	Análisis estadístico.....	21
IV.7	Consideraciones éticas y bioseguridad.....	22
V.	RESULTADOS.....	23
VI.	DISCUSIÓN	29
VII.	CONCLUSIONES	38
VIII.	RECOMENDACIONES.....	39
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
X.	ANEXOS	50

Resumen

La aspergilosis es una enfermedad fúngica causada por diferentes especies del género *Aspergillus*. Entre los agentes etiológicos asociados con mayor frecuencia se encuentra *A. fumigatus*, causa del 90 % de las aspergilosis a nivel mundial. El tratamiento de esta enfermedad tiene como primera línea el empleo de triazoles pero en las últimas décadas se ha observado un incremento en la aparición de aislados de *A. fumigatus* con resistencia a azoles asociada a la mutación M220 y a otras sustituciones aminoacídicas en la enzima 14- α -esterol demetilasa. Los objetivos de este trabajo son determinar la susceptibilidad antifúngica frente a triazoles de un grupo de aislados de *A. fumigatus* y detectar la mutación M220 en aquellos que resulten resistentes. Para ello se realizaron pruebas de susceptibilidad por el método de E-Test en 30 aislados de *A. fumigatus*. Se evaluaron los triazoles itraconazol, voriconazol y posaconazol. Los aislados resistentes se seleccionaron para amplificar una región del gen del citocromo p450 con posibilidad de portar la mutación M220 y se secuenció dicha región. De los 30 aislados, nueve resultaron resistentes frente a itraconazol y ninguno lo fue frente a los otros dos triazoles. Los aislados resistentes tuvieron un 100 % de identidad en el alineamiento con la misma región amplificada de una cepa tipo salvaje y no se detectaron polimorfismos en el codón 220. Otros mecanismos moleculares de resistencia deben ser evaluados así como diferentes alternativas de origen de los genotipos mediante estudios de epidemiología molecular.

I. Introducción

El género *Aspergillus* es uno de los taxones fúngicos con mayor diversidad de especies dentro del reino *Fungi* (dominio *Eukarya*) y su sistemática ha cambiado con el desarrollo de la micología y con la aparición de nuevos métodos de clasificación. Sus representantes están vinculados con la vida diaria del hombre en diversas actividades que van desde la industria biotecnológica, el mercado de productos comestibles y bebidas, la fitopatología, la conservación y restauración de objetos patrimoniales, y el campo de las enfermedades infecciosas, donde la aspergilosis y sus diferentes formas clínicas constituyen un reto entre las micosis, con altas tasas de morbilidad y mortalidad. Es en este espacio que destaca *A. fumigatus* como la especie de mayor repercusión por ser la causa del 90 % de las formas de aspergilosis a nivel global (Bennett, 2010).

Se puede encontrar a *Aspergillus* como causa de onicomycosis, queratitis y endoftalmitis, micetomas, otomicosis, sin embargo son las formas respiratorias las que representan un mayor riesgo para la vida de los pacientes. La aspergilosis pulmonar es una enfermedad que se adquiere por vía respiratoria al inhalar conidios o propágulos fúngicos de *Aspergillus*. Como especie de mayor importancia clínica, *A. fumigatus* tiene una amplia variedad de atributos patogénicos que le permiten colonizar e invadir los tejidos del hospedero para terminar causando infecciones localizadas en el pulmón o con diseminación a otros sistemas de órganos. El diagnóstico de la enfermedad es difícil y se recomienda un enfoque integral con análisis clínico-epidemiológico, radiológico y microbiológico para la confirmación del mismo. Como estrategias para la terapia, la mayoría de las guías terapéuticas recomiendan la utilización de polienos, equinocandinas y triazoles como antifúngicos de elección, siendo estos últimos los que se indican como primera línea. No obstante, en las últimas dos décadas la frecuencia de *A. fumigatus* resistentes a azoles se ha incrementado de manera exponencial, derivando en limitaciones al momento de asignar tratamiento (Bernal - Martínez *et al.*, 2016).

Las investigaciones sobre evaluaciones de susceptibilidad antifúngica en *A. fumigatus* y los mecanismos moleculares de resistencias asociados a fenotipos con valores de concentración mínima inhibitoria elevados frente a triazoles han demostrado que la presencia de mutaciones en el gen de la enzima 14 – α – esterol demetilasa es la causa más frecuente para el origen de este fenómeno. Estos polimorfismos se expresan como sustituciones aminoacídicas y modificaciones del promotor del gen que afectan la expresión y estructura de la proteína, esencial para el

mantenimiento de la membrana citoplasmática y la homeostasia celular. Entre las diversas mutaciones puntuales, el reemplazo aminoacídico de la metionina en el codón 220 (M220) es una de las más habituales, vinculada a pacientes que están sometidos a tratamientos prolongados con triazoles. La misma confiere resistencia absoluta frente a itraconazol y susceptibilidad variable frente al resto de los antifúngicos de la misma familia farmacológica (Parker *et al.*, 2014).

En Cuba se han realizado pocos estudios sobre la susceptibilidad antifúngica de *A. fumigatus* y el conocimiento de sus características genóticas es muy limitado. Se han descrito múltiples aislados que circulan en el país y exhiben fenotipos resistentes a itraconazol lo que evidencia la necesidad de investigaciones encaminadas a esclarecer sobre las causas moleculares que dan lugar a la resistencia (San Juan - Galán *et al.*, 2017a).

En este trabajo se evaluó la susceptibilidad antifúngica *in vitro* frente a triazoles en aislados de *A. fumigatus* y se determinó la existencia de polimorfismos de simple nucleótido en el gen de la 14 – α – esterol demetilasa asociados a los fenotipos resistentes.

II. Objetivos

- Determinar los patrones de susceptibilidad a itraconazol, voriconazol y posaconazol presentes en los aislados de *Aspergillus fumigatus*.
- Identificar los genotipos portadores de la mutación M220 en los aislados resistentes a triazoles.

III. Marco teórico

III.1 Antecedentes

En el año 1729, durante la observación de varias preparaciones microscópicas para la confección de su tratado *Nova Plantarum Genera*, el botánico Pier Antonio Micheli describió un grupo de estructuras correspondientes a un microorganismo fúngico y lo denominó *Aspergillus* por su marcado parecido con un instrumento utilizado en las cortes religiosas llamado “aspergillum” (Bennett, 2010). En 1768 Haller validó el nombre de este género pero no fue hasta 1832 que Fries lo oficializó en los códigos de taxonomía de la época (Samson *et al.*, 2014). Años antes, Link había establecido la naturaleza saprófita de estos hongos al aislar varias especies de *Aspergillus* de detritos vegetales. Sin embargo, hasta ese momento se desconocía sobre su capacidad patogénica. Las primeras evidencias de *Aspergillus* como agente etiológico de una infección en humanos las proporcionó Rudolph Virchow tras un análisis de un caso publicado en 1847 por el estudiante de medicina Theodor Sluyter (Knoke *et al.*, 2003). La mayor relevancia médica de *A. fumigatus* en comparación con el resto de las especies del género quedó marcada en un estudio del eminente doctor francés Louis Rénon donde describe, con argumentos experimentales y clínicos, los atributos de *A. fumigatus* como patógeno primario con capacidad para producir infecciones en humanos, un concepto que hasta la fecha se había mantenido en discusión por especialistas anteriores (Rénon, 1897).

Durante la primera mitad del siglo XX, los trabajos publicados sobre aspergilosis fueron en aumento a la par del desarrollo de la micología médica. En 1926 Lapham publicó un artículo donde planteaba la posible relación entre la tuberculosis y la aspergilosis basada en el estudio de múltiples casos clínicos. De igual manera planteó las dificultades para la diferenciación entre ambas enfermedades y las implicaciones terapéuticas que pudiese tener la aspergilosis en el proceso de recuperación de la tuberculosis (Lapham, 1926). En la década del 50 se publicaron algunos trabajos sobre la capacidad invasiva del sistema nervioso central de *A. fumigatus* (Iyer *et al.*, 1952). En 1952 Hinson y Moon publicaron una serie de casos de aspergilosis con diferentes manifestaciones broncopulmonares que contribuyeron de forma significativa al entendimiento de las presentaciones clínicas y de su epidemiología (Arenas, 2014). Para esa fecha el único fármaco efectivo para el tratamiento de las diferentes formas clínicas de aspergilosis era la anfotericina B que, a pesar de funcionar como fungicida y fungistático contra la mayoría de las especies de

Aspergillus, su elevada nefrotoxicidad reducía sus posibilidades en la práctica clínica (Sugar, 1986).

A finales de los '80 y principio de los '90 del pasado siglo, la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), aprobó la comercialización de los imidazoles y triazoles que se convertirían en una nueva alternativa terapéutica no solamente por su potencial antifúngico sino también por su reducida toxicidad en comparación con los polienos como la anfotericina B (Ghannoum y Rice, 1999). Entre ellos, el itraconazol adquirió relevancia global, reemplazando a los imidazoles (miconazol y ketoconazol) en el tratamiento de micosis sistémicas graves y de la aspergilosis (Maertens, 2004). Sin embargo, no tardaron en aparecer los primeros trabajos donde se demostraba la susceptibilidad disminuida a esta droga en múltiples aislados de *A. fumigatus* de origen clínico y ambiental. El primer informe sobre la resistencia a itraconazol se realizó en 1997 en tres aislados de *A. fumigatus* obtenidos en California, Estados Unidos (Howard *et al.*, 2009). Desde entonces la aparición de aislados resistentes se ha hecho más frecuente. Según datos del 2014 del programa global de vigilancia ARTEMIS, el 5,8 % de los aislados clínicos registrados ese año mostraron niveles elevados de concentración mínima inhibitoria frente a uno o más triazoles, además su incidencia tiene niveles mayores en determinados países como Holanda o Reino Unido (Parker *et al.*, 2014).

En la actualidad, la aspergilosis y su principal agente, *A. fumigatus*, se ha convertido en una de las principales micosis oportunistas con una cifra global estimada de 600 000 muertes anuales entre formas clínicas invasivas y crónicas (Denning, 2016) y la resistencia a los triazoles es una de las causas importantes en el fallo del tratamiento.

III.2 Identificación y ubicación taxonómica de *Aspergillus fumigatus*

Con el perfeccionamiento de la sistemática en el reino *Fungi* (dominio *Eukarya*), el género se ha modificado taxonómicamente en varias ocasiones y actualmente *A. fumigatus* se encuentra ubicado en la división *Ascomycota*, orden *Eurotiales*, familia *Aspergillaceae*, género *Aspergillus*, subgénero *Fumigati*, sección *Fumigati* (Tsang *et al.*, 2018). Al igual que para el resto de las especies se recomienda que la identificación y clasificación se haga en base a sus características culturales y micromorfológicas, su perfil de metabolitos y su información filogenética (Kocsubé *et al.*, 2016). Este enfoque polifásico brinda certeza en la clasificación estricta de las especies pero debe tenerse en cuenta que la disponibilidad de recursos para realizar todas estas técnicas es

limitada en la mayoría de los escenarios clínicos por lo que la taxonomía convencional sigue siendo una herramienta muy empleada para la identificación.

La cepa tipo de *A. fumigatus* presenta colonias de tonos verde azulados a gris verdosos; crecimiento rápido con colonias no restringidas mayores de 30 mm de diámetro en agar Czapek con extracto de levadura (ACE) y agar extracto de malta (AEM); ausencia de cleistotecios; cabezas conidiales azules y tonos verde-oscuro a grisáceos; esporulación columnar; vesículas subclavadas y uniseriadas con las fiálides en los dos tercios de la superficie de la vesícula; estipe incoloro a gris cerca del ápice con dimensiones de 50-350 x 3,5-10 μm ; conidios globosos a elipsoides; lisos o finamente rugosos de 2-3 μm de diámetro de color verde; crecimiento a 50°C; débil producción de ácido en agar creatina sacarosa (de Hoog *et al.*, 2011).

La producción de extrolitos en *A. fumigatus* tiene una gran diversidad con más de 60 compuestos diferentes entre micotoxinas, policétidos, sideróforos, fumiquinazolin, pseurotinas, piriropenos, ergo-alcaloides, entre otros (Frisvad y Larsen, 2016).

En la caracterización genotípica de *A. fumigatus*, los genes más utilizados para los análisis de filogenia son la β -tubulina, la calmodulina, la región de los espaciadores internos de transcripción del ADNr (ITS1-5,8S-ITS2) y la actina. Para la identificación se debe hacer uso de dos marcadores moleculares: uno primario muy representativo del género, como pueden ser los ITS, que se amplifiquen con cebadores universales, y otro secundario, como la β -tubulina y la calmodulina, que brinden mayor especificidad por el reconocimiento de múltiples polimorfismos dentro de los diferentes grupos filogenéticos (Samson *et al.*, 2014).

III.3 Ecología y distribución

Tanto *A. fumigatus* como el resto de las especies pertenecientes al género *Aspergillus* se definen como hongos anemófilos por su amplia dispersión en la atmósfera terrestre, con un desarrollo evolutivo que le permite a sus esporas y propágulos recorrer grandes distancias transportados por las corrientes de aire. Además, como parte de su fisiología, posee una extensa batería enzimática que facilita la obtención de nutrientes de casi cualquier sustrato y lo convierten en un microorganismo cosmopolita y ubicuo, aislado con frecuencia de plantas, materia orgánica en descomposición, suelos y bioaerosoles (Kwon-Chung y Sugui, 2013). La diversidad de hábitats de estos hongos está influenciada por la temperatura, la disponibilidad de agua, la salinidad y otros parámetros biofísicos que son esenciales. También su gran adaptación y su extensa producción de

metabolitos secundarios facilita su competencia interespecífica con otros microorganismos colonizadores de un mismo ecosistema (Paulussen *et al.*, 2017).

A. fumigatus es un contaminante frecuente de la cáscara de granos y granos trillados en depósitos de reserva, lo que constituye un potencial riesgo para los trabajadores involucrados en las labores de almacén (Mulinge y Chesters, 1970; Malik *et al.*, 2014; Zulkifli y Zakaria, 2017). Los ambientes interiores de casas, oficinas, hospitales, archivos, bibliotecas y otras edificaciones también puede ser un nicho ecológico importante para *A. fumigatus*, donde comparte espacio con otras especies del mismo género (McGinnis, 2007; Rojas *et al.*, 2008; Samson *et al.*, 2010).

III.4 Patogénesis de la infección pulmonar y respuesta del hospedero

La aspergilosis pulmonar es una enfermedad infecciosa del sistema respiratorio que puede adoptar varias formas clínicas en función del estado inmunológico y de las condiciones preexistentes del paciente. La aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) y la aspergilosis pulmonar crónica (APC) son infecciones donde el sistema inmune del individuo no está comprometido; sin embargo, existe una deficiencia respiratoria de base que permite al agente etiológico asentarse como patógeno. La aspergilosis invasiva es la forma clínica más agresiva, siempre desencadenada por una inestabilidad del sistema inmune con marcada neutropenia y déficit linfocitario (Kanj *et al.*, 2018).

El inicio de la infección comienza con la inhalación de los conidios o propágulos fúngicos. Los conidios tienen su superficie recubierta con hidrofobinas y melanina que mantienen ocultos los patrones de reconocimiento asociado a patógenos (PAMPs) y así evitan la activación de la respuesta innata. Una vez que comienza el proceso de germinación al cabo de 4-6 horas, la estructura de la superficie celular cambia y algunos PAMPs, como los β -1,3 glucanos, quedan expuestos y son reconocidos por diferentes receptores de reconocimiento de patrones (receptores tipo Toll, lectinas con unión a manosas, receptores de lectinas tipo C, receptores tipo NOD, entre otros) que activan el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos. En paralelo con la actividad de los neutrófilos, las citoquinas producidas por las células presentadoras de antígenos generan la activación de los linfocitos T CD4⁺ que comienzan la diferenciación a las diferentes subpoblaciones que intervienen en la respuesta adaptativa, ya sea pro-inflamatoria o de tolerancia. De igual manera estas citoquinas activan la población de linfocitos T CD8⁺ con actividad fungicida directa. Las infecciones crónicas como los aspergilomas o la APC y sus diferentes variantes por lo

general se presentan asociadas a una cavidad o a otras alteraciones de la anatomía del pulmón que faciliten un nicho ecológico para el asentamiento del hongo. Una vez allí, el micelio se desarrolla en una homeostasia controlada entre la acción del sistema inmune y sus mecanismos de supervivencia, formando una bola fúngica, denominada aspergiloma, que puede estar inerte durante años. En el caso de las APC, el micelio comienza a invadir la periferia de la cavidad penetrando en el tejido pulmonar con serios riesgos para la vida de los pacientes (Dagenais y Keller, 2009; van de Veerdonk *et al.*, 2017).

Los macrófagos alveolares y neutrófilos tienen un papel esencial en la respuesta primaria contra la infección por *Aspergillus fumigatus*, eliminando las partículas fúngicas del tracto respiratorio. En pacientes que tienen una neutropenia prolongada, receptores de trasplantes sólidos, sida, inmunodeficiencias primarias o que están bajo terapia inmunosupresora con corticosteroides o bloqueadores de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa, estas poblaciones celulares y el reclutamiento linfocitario están afectados y el desarrollo de la aspergilosis es mucho más agresivo, con alto riesgo de cursar por formas invasivas (Cadena *et al.*, 2016).

III.5 Diagnóstico de la aspergilosis pulmonar

La aspergilosis es una enfermedad de diagnóstico complejo donde la integración de los elementos clínico-epidemiológicos, la imagenología y los resultados microbiológicos e histopatológicos son fundamentales para la correcta identificación de la enfermedad.

El reconocimiento clínico y la anamnesis permiten determinar síntomas y antecedentes característicos de la aspergilosis. A pesar de que *A. fumigatus* es un microorganismo ubicuo pueden encontrarse altas cuantías de inóculo en sitios donde se utilice el compost vegetal, existan plantas y flores o se estén realizando procesos de renovación constructiva; estos lugares son fuentes potenciales de infección (Bonifaz, 2012).

La descripción del cuadro clínico no tiene un período de incubación definido, es muy amplia y varía de forma sutil entre las diferentes formas de infección. En la ABPA, los síntomas se presentan como un asma clásico con tos seca o productiva, malestar general y pérdida de peso. La tos puede generar hemoptisis ante accesos constantes. Hay casos alérgicos donde las manifestaciones no son pulmonares y se limitan a rinitis con rinorrea, prurito nasal, congestión intermitentes y epifora. Para casos más severos como la bronquitis mucomembranosa estos síntomas son mucho más crónicos e intensos (Arenas, 2014).

Los aspergilomas se presentan con sintomatología similar a la ABPA aunque es usual que los pacientes se mantengan en fase subclínica con estabilidad de la lesión pulmonar e incluso en algunos casos con resolución de la bola fúngica. El síntoma de mayor atención lo constituye la hemoptisis causada por la fricción del aspergiloma contra las paredes de la cavidad donde radica. A menudo este tejido está inflamado y los vasos sanguíneos circundantes se rompen por la acción mecánica y producen el sangramiento. Esto también es un riesgo para la entrada de partículas aspergilaes al torrente sanguíneo que ante un deterioro del sistema inmune puede conducir a una aspergilosis invasiva (Lee *et al.*, 2014).

La APC es otra de las diferentes presentaciones que mayor repercusión tiene por su alta morbilidad y mortalidad. Esta enfermedad se presenta durante tres meses o más tiempo en pacientes inmunocompetentes o en ausencia de una inmunodepresión considerable, con síntomas más agravados que en las patologías anteriores y de igual manera la hemoptisis constituye uno de los mayores riesgos. La pérdida de peso es también un indicio común en la APC que muchas veces se emplea como indicador cuantitativo en la evolución favorable durante el tratamiento antifúngico (Godet *et al.*, 2014).

Las infecciones invasivas por *A. fumigatus* como la aspergilosis pulmonar invasiva (API) cursan como un estado grave de pacientes con inmunodepresión y producen insuficiencia respiratoria, fiebre, disnea, expectoración mucopurulenta y hemoptisis. Además estas presentaciones clínicas pueden conducir a una diseminación por vía hematogena con afectación de órganos sólidos, manifestaciones mucocutáneas y colapso de múltiples funciones fisiológicas (Kanj *et al.*, 2018).

La radiología es una herramienta esencial en el diagnóstico de las diferentes formas de aspergilosis. En la ABPA las imágenes de rayos X a menudo muestran una gran sombra homogénea sin cambio volumétrico en los lóbulos pulmonares superiores. En imágenes de tomografía axial computarizada (TAC) es frecuente observar bronquiectasias centrales con engrosamiento de las paredes bronquiales, fibrosis en los lóbulos superiores y gran cantidad de secreción mucosa (Tracy *et al.*, 2016).

De acuerdo con Smith y Denning, en los aspergilomas las imágenes de rayos X y la TAC evidencian un material compacto que se presenta como una sombra esférica rodeada de aire, ocupa una cavidad preexistente y puede ser único o pueden haber múltiples aspergilomas en dependencia del grado de cavitación del individuo (Smith y Denning, 2011).

En la APC, la presencia de cavitaciones es un elemento radiológico clave. El hongo coloniza e invade las paredes de la cavidad, dándole un aspecto irregular en la imagen de rayos X. En la TAC se puede definir un engrosamiento de la membrana pleural con destrucción del parénquima pulmonar. También esta forma clínica puede estar asociada con aspergilomas y, aunque menos frecuente, la presentación de nódulos aspergilaes puede ser compatible con una APC (Denning *et al.*, 2016).

En las formas invasivas las imágenes pulmonares suelen caracterizarse por la presencia de uno o varios nódulos mayores de un centímetro, algunos rodeados de un halo opaco de presencia temporal causado por un posible edema o una hemorragia. En ocasiones algunos de estos macronódulos tienen apariencia de estar infartados o se agrupan en pequeños grupos con una disminución en su tamaño. Otro signo radiológico importante son las consolidaciones, presentes en el 30% de los individuos con aspergilosis invasiva. La observación de algunos de los elementos patognomónicos de la API depende también del progreso de la enfermedad y en algunas fases de la misma pueden no mostrarse con claridad en las imágenes radiológicas (Pasqualotto, 2010).

Desde el laboratorio, las pruebas para el diagnóstico de la aspergilosis son variadas y de igual manera dependen del tipo de forma clínica que se sospeche. En el caso de la ABPA el diagnóstico debe apoyarse en resultados positivos de la respuesta tipo I en la prueba cutánea para *Aspergillus*, los títulos de IgE total mayor a 1000 UI/mL, precipitinas, IgG e IgE específica para *Aspergillus* y un conteo elevado de eosinófilos en pacientes sin terapia de esteroides (Agarwal *et al.*, 2013).

En el aspergiloma y la APC también la serología es fundamental para el diagnóstico. La determinación de altos niveles de anticuerpos IgG específicos para *Aspergillus* combinado con resultados positivos de cultivo micológico y del examen directo de muestras bronquioalveolares apoyan la detección de una APC o aspergiloma (Hayes y Novak - Frazer, 2016).

Para el diagnóstico de la aspergilosis invasiva, la prueba de detección de galactomananos y los estudios histopatológicos son las pruebas más recomendadas, aunque su especificidad puede ser cuestionable. El cultivo micológico no es muy útil por su baja sensibilidad, aunque se mantiene aún dentro de la rutina de procesamiento de las muestras respiratorias. También la detección de 1,3 - β - D - glucanos puede ser útil para guiar el diagnóstico, sin embargo no es específica para *Aspergillus* y por tanto no es confirmatoria. (Patterson *et al.*, 2016).

Las técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) son una alternativa alentadora para la identificación de la aspergilosis, en especial en pacientes de riesgo. No obstante, hay puntos críticos en la estandarización (tipo de muestra a procesar, período de evaluación, influencia de la terapia antifúngica en el resultado del PCR) en los que todavía la comunidad de expertos valora modificaciones para mejorar la sensibilidad y especificidad. Aun así se sugiere que su utilización se realice de conjunto con pruebas serológicas y estudios radiológicos para dar robustez al diagnóstico de la enfermedad.

III.6 Los triazoles en el tratamiento de la aspergilosis

Las principales guías terapéuticas a nivel internacional tienen establecidos tres grupos farmacológicos fundamentales para el tratamiento de la aspergilosis en sus diferentes formas clínicas: los polienos, los triazoles y las equinocandinas. Entre estos antimicóticos, los triazoles están definidos como la primera línea de tratamiento para la aspergilosis (Jenks y Hoenigl, 2018).

Los triazoles actúan de forma indirecta como inhibidores competitivos de la proteína 14 – α – esterol demetilasa, una enzima de la familia del citocromo p450 (CYP) que posee un dominio “hemo” en su sitio activo y cataliza la demetilación oxidativa del lanosterol o el eburicol, precursores del ergosterol. En consecuencia, se afecta la ruta anabólica del ergosterol, componente fundamental de la membrana celular que garantiza su estabilidad y permeabilidad y que, en su ausencia, conduce al desequilibrio osmótico y en consecuencia a la muerte celular. El efecto antifúngico también resulta de la acumulación de intermediarios metabólicos tóxicos en el espacio citoplasmático celular. Estos fármacos se formulan en complejos con β -ciclodextrina, lo cual en pacientes con insuficiencia renal puede ser un agravante. De igual manera su metabolismo puede generar hepatotoxicidad y al interactuar con otras proteínas de la familia CYP presentes en los mamíferos pueden tener una interacción negativa con algunos agentes quimioterapéuticos empleados en la terapia oncológica (fosfamida, vincristina) y otras drogas (rifampicina, fenitoína) que alteran su metabolismo y concentración sérica (Ashley y Perfect, 2019).

Las drogas de este grupo recomendadas para el tratamiento y profilaxis son el voriconazol, el itraconazol y el posaconazol, aunque existen nuevos candidatos como el isavuconazol y el albaconazol que muestran buenos resultados farmacocinéticos y farmacodinámicos además de un buen desempeño *in vitro* frente a diferentes especies de *Aspergillus* (Pasqualotto y Denning, 2008; Ananda - Rajah y Kontoyiannis, 2015) .

Para la terapia primaria están indicadas las dosis intravenosas de voriconazol en pacientes con síndromes invasivos y/o crónicos por *Aspergillus*. Como alternativa pueden emplearse en dosis orales el itraconazol y el posaconazol, con especial énfasis en este último durante la profilaxis del paciente de alto riesgo de API. Para la ABPA se recomienda en particular el uso del itraconazol. La remoción quirúrgica del micelio combinada con la implementación de antifúngicos puede ser imprescindible en el tratamiento de lesiones endo/pericárdicas o en los aspergilomas de pacientes con marcada hemoptisis. Para los casos infantiles es necesario el ajuste de dosis y el médico de asistencia debe tener en cuenta la forma clínica y los factores de riesgo que tiene el paciente al momento de indicar tratamiento (Patterson *et al.*, 2016; Ullmann *et al.*, 2018).

III.7 Susceptibilidad antifúngica en *Aspergillus fumigatus*

Desde 1966 la comunidad científica internacional aprobó el método de Kirby – Bauer para la evaluación de la susceptibilidad *in vitro* frente a los diferentes antimicrobianos comercializados por las grandes industrias farmacéuticas de la época. La metodología se circunscribía a bacterias de interés clínico y a medida que fue desarrollándose la medicina y la microbiología también la estandarización de las técnicas se optimizó (Wheat, 2001). En esa época el reconocimiento de infecciones fúngicas era poco, bien porque no existían enfermedades debilitantes ni tratamientos inmunodepresores con la magnitud actual o bien porque faltaba desarrollo en los métodos diagnósticos enfocados en la micología médica y se desconocía la prevalencia e incidencia de las micosis. En cualquier caso, no es hasta 1983 que el subcomité de evaluación para la susceptibilidad antifúngica del National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS, hoy CLSI) comienza a realizar un estudio multicéntrico que permitiera evaluar un grupo de técnicas empleadas sobre la susceptibilidad antifúngica para los agentes etiológicos de las micosis (Arikan, 2007). En 1985 el subcomité expide un documento oficial denominado M20-CR que recogía toda la información acumulada proveniente de las instituciones que habían participado en el estudio. Los resultados del informe establecían la necesidad de un procedimiento normalizado basado en cultivos en medio líquido y con suficiente repetitividad entre las instituciones como para definir valores estándares de concentración mínima inhibitoria para estos microorganismos patógenos (Fothergill, 2012).

La primera propuesta de un documento oficial para evaluar la susceptibilidad antifúngica se hizo en 1992 y fue aprobada en 1997 para emplearse en levaduras del género *Candida*. No fue hasta

1998 que se propuso una metodología análoga para los hongos filamentosos y se aprobó en 2002 para el género *Aspergillus* y otros hongos filamentosos productores de abundantes conidios, salvo los dermatofitos y hongos con dimorfismo térmico (CLSI, 2008b; CLSI, 2008a). Este documento se mantiene hasta la fecha con diversas actualizaciones (M38-A2) que han incluido a los dermatofitos y otros hongos que en el inicio no se tenían contemplados así como nuevas metodologías con base en la difusión en agar (M61-A) que facilitan la evaluación de la susceptibilidad en los laboratorios con menor capacidad de recursos (CLSI, 2008a; CLSI, 2017). Sin embargo aún existen interrogantes a definir, como los puntos de cortes para algunos de los triazoles, en especial los de última generación.

En paralelo, la comunidad científica europea también trabajó en la evaluación de la susceptibilidad antifúngica con un enfoque similar al de CLSI aunque con variaciones de la metodología. El subcomité de antifúngicos de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) emitió en 2008 un documento oficial (Edef. 9.1) que contenía un método estandarizado de microdilución en caldo para mohos formadores de conidios (Rodríguez - Tudela *et al.*, 2016). Esta versión se actualizó en 2015 con la edición del documento Edef. 9.3 (EUCAST, 2015). A pesar de las diferencias en cuanto a concentración y modo de cuantificación del inóculo, formato de las placas utilizadas y composición del medio de cultivo entre las técnicas aprobadas por CLSI y EUCAST, diversos trabajos han mostrado correlación entre ambos (Cuenca-Estrella *et al.*, 2010; Bernal - Martínez *et al.*, 2016).

Durante el proceso de estandarización de la metodología de cultivo en microdilución para las pruebas de susceptibilidad existen variables técnicas que son esenciales: equilibrio ácido-base del medio, propiedades químico-físicas de las drogas a evaluar, preparación y concentración del inóculo, tiempo y temperatura de incubación y criterios de interpretación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Como objetivos definitivos una prueba de susceptibilidad debe proporcionar la cuantificación confiable sobre la actividad relativa de varios antifúngicos, correlacionar los resultados *in vitro* con el resultado *in vivo*, predecir el potencial terapéutico de antifúngicos noveles e identificar microorganismos con fenotipos resistentes (Espinel-Ingroff, 2008).

Un aspecto importante que deriva de la evaluación de la susceptibilidad es la definición de los valores de corte epidemiológico (VCE) y de los puntos de corte de susceptibilidad (PCS), útiles

para trazar la estrategia terapéutica a seguir. Para ello es necesario determinar la distribución de la población salvaje, relacionar los valores de CMI con respecto al resultado del tratamiento en el paciente y analizar la farmacodinámica y farmacocinética de los antifúngicos y su influencia en la respuesta al tratamiento. Los términos de PCS y VCE no deben utilizarse indistintamente ya que reflejan conceptos diferentes sobre la clasificación de los aislamientos según la actividad antifúngica de una droga en cuestión o la presencia de mecanismos de resistencia en un microorganismo de la población (EUCAST, 2019b). De acuerdo con los datos suministrados por EUCAST en su página oficial, en el caso de *Aspergillus fumigatus* solo existe evidencia concreta para establecer PCS para la anfotericina B, el isavuconazol, el itraconazol, el posaconazol y el voriconazol (EUCAST, 2019a). Por otro lado, el CLSI no tiene establecido PCS para ninguno de los triazoles frente a *Aspergillus*, no obstante sí propone VCE para *A. fumigatus* frente a itraconazol, voriconazol y posaconazol (Pfaller *et al.*, 2013).

III.8 Mecanismos de resistencia a triazoles en *Aspergillus fumigatus*

La problemática en torno a la resistencia a triazoles en el género *Aspergillus* tiene tres décadas en las que se ha acrecentado y en estos momentos constituye un factor de riesgo para aquellos pacientes que cursan cualquiera de las formas invasivas o saprófitas de aspergilosis. Las primeras publicaciones sobre la temática fueron realizadas en Estados Unidos, sin embargo, la mayoría de los casos publicados en la actualidad radican en varios países del continente europeo, con énfasis en los Países Bajos y Reino Unido, aunque también países del continente asiático (China, India, Irán, Japón, Kuwait y Pakistán), Tanzania y Australia han informado aislados resistentes (Rivero - Menendez *et al.*, 2016).

Al igual que en otros microorganismos la resistencia a fármacos en *A. fumigatus* puede presentarse de dos formas: primaria (también intrínseca) o secundaria (adquirida). La primera clasificación representa una característica inherente al hongo que le permite soportar altas concentraciones de un antifúngico aun cuando nunca antes ha estado en contacto con él. La resistencia adquirida por otro lado es la respuesta adaptativa del hongo para desarrollar mecanismos moleculares que le permitan sostener su viabilidad ante un cambio desfavorable en el ambiente como resulta el efecto de un antimicótico. Este fenómeno se expresa en la célula como la reducción en las cantidades intracelulares del antifúngico que está en actividad o como alteraciones cuantitativas o estructurales que tiene la diana molecular de tal fármaco (Chandrasekar y Manavathu, 2009).

Modificaciones en la estructura de la 14- α -esterol demetilasa, sobreexpresión de la misma, alteraciones en la permeabilidad de la membrana citoplasmática y la pared celular y transporte activo de la droga hacia el medio extracelular son las diferentes vías sobre las que la resistencia a triazoles se sustenta en *A. fumigatus*. La 14- α -esterol demetilasa es una proteína citocromo p450 codificada en el gen *cyp51*. Este gen posee dos variantes alélicas, *cyp51A* y *cyp51B*, que de forma independiente expresan la misma enzima y en ausencia de ambas el crecimiento fúngico se ve afectado. De manera peculiar todas las mutaciones asociadas a la resistencia a triazoles suceden en el alelo A sin que todavía quede claro el papel del alelo B en la susceptibilidad frente a estos antifúngicos (García - Rubio *et al.*, 2017). Están descritas más de 25 mutaciones puntuales en *cyp51A* que pueden conducir a la resistencia a triazoles (Parker *et al.*, 2014). La gran mayoría de estas mutaciones representan polimorfismos de simple nucleótido que se traducen en cambios aminoacídicos de la estructura proteica. Estos cambios pueden o no ser únicos. Las mutaciones que se detectan con mayor frecuencia son G54 (con reemplazos aminoacídicos de E/K/R/V/W) que confiere resistencia a itraconazol y a posaconazol, M220 (con reemplazos aminoacídicos de K/I/T/V) que confiere resistencia a itraconazol, posaconazol y susceptibilidad variable frente a voriconazol, G138 (con reemplazos aminoacídicos de C/R), G448S y L98H que confieren resistencia panazólica (Howard y Arendrup, 2011). Algunas de estas mutaciones puntuales, como la L98H, están acompañadas de inserciones nucleotídicas en la región del promotor del gen *cyp51*. Estas inserciones a modo de secuencias tándem modifican la expresión del gen, aumentando la concentración citosólica de la proteína y de esta manera también se minimiza el efecto del antifúngico sobre el metabolismo celular. Entre las mutaciones más frecuentes de este tipo se encuentran la TR34, TR53 y TR46 (repetición en tándem de 34, 53 y 46 pares de bases respectivamente), cada una asociada a fenotipos con diferente distribución (Rietveld *et al.*, 2017).

Otro mecanismo molecular asociado a la susceptibilidad disminuida frente a triazoles en *A. fumigatus* es la síntesis de transportadores transmembrana que expulsan la droga al medio extracelular. Existen dos grandes grupos dentro de esta clasificación: los MFS (del inglés *Major Facilitators Superfamily*) y los ABC (del inglés *ATP binding-cassete*). Hasta la fecha se han descrito en esta especie fúngica más de 250 proteínas MFS y más de 40 transportadores ABC (Cannon *et al.*, 2009). El primero de estos mecanismos se concentra en el rol de algunos de sus miembros, los transportadores antifúngico:H⁺ antiporter (AHA). El transporte activo depende del gradiente electroquímico de protones que trae consigo el ingreso intracelular de los iones H⁺ y

genera una corriente de eflujo del fármaco hacia el medio extracelular. Proveniente de este grupo, se plantea que Mfs56 es un transportador presente en *A. fumigatus* con un papel importante para la resistencia a itraconazol, posaconazol y ravuconazol. Además algunos autores sugieren que otros miembros del cluster 10 de los AHA pudiesen tener funciones similares en la resistencia (Costa *et al.*, 2014). En el caso de las proteínas ABC, estas poseen dominios transmembranas y sitios de unión/hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) para generar la energía necesaria en la expulsión de las drogas antifúngicas. En *A. fumigatus* existen interrogantes sobre la identidad y regulación de estas bombas de eflujo dependientes de ATP. En la actualidad solo se conoce al gen *cdr1B* con relación directa en la resistencia a triazoles. Algunos investigadores han detallado otros transportadores, como *atrF* y *afuMDR4*, y sugieren que pudiesen tener algún papel en el fenómeno de la resistencia sin embargo no hay evidencias suficientes para atribuirle su implicación directa (Sanglard, 2016).

Muy en relación con las bombas de eflujo y la problemática de la resistencia antifúngica en *A. fumigatus* está la producción de biopelículas. Las biopelículas son comunidades microbianas estructuradas sobre una matriz extracelular propia y protectora que tiene a sus componentes unidos entre sí o a una superficie determinada. Además dichos componentes, y se entiende por componentes a las diferentes comunidades asociadas, interactúan a través de diferentes moléculas y dan lugar a un fenómeno de comunicación química y cooperación microbiana para crecer y adaptarse al entorno circundante (Rajendran, 2013). Esta resistencia se define como fase-dependiente ya que resulta del estado fisiológico de las colonias contenidas en la biopelícula y donde influyen la densidad celular, la composición de la matriz, la regulación de los MFS y los ABC, la tolerancia a estrés, la presencia de células persistentes, entre otros factores (Kaur y Singh, 2014).

III.9 *Aspergillus fumigatus* y aspergilosis en Cuba

Cuba tiene una extensa diversidad en su micobiota y *Aspergillus* es uno de los principales géneros que se aíslan con mayor frecuencia en los estudios microbiológicos de ambientes interiores y exteriores (Almaguer, 2016). Los períodos estacionales de predominio del género por lo general son aquellos de temporada de lluvias, entre mayo y octubre, donde *A. fumigatus* representa una fracción de la aeromicobiota (Almaguer y Rojas-Flores, 2013). En el país, al igual que en otros, la aspergilosis no es una enfermedad de declaración obligatoria, aunque existen informes de casos

publicados en el último quinquenio (Ferrer-Pérez *et al.*, 2014; Grave de Peralta *et al.*, 2016; Beltrán *et al.*, 2019), no existe un índice oficial de reportes de casos de aspergilosis y se hace complejo estimar el número de casos anuales. A pesar de ello, existen en el país factores como el tabaquismo, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el asma y enfermedades debilitantes del sistema inmune (Negrín - Villavicencio *et al.*, 2012; Gorbea *et al.*, 2014; Bess - Constantén *et al.*, 2018) que son determinantes en el desarrollo de una infección por *Aspergillus* y pueden contribuir al estudio epidemiológico de la enfermedad.

En Cuba no se conoce con profundidad el estado de la resistencia a triazoles en *A. fumigatus*. Estudios como los de San Juan – Galán *et al.* han demostrado la existencia de aislados clínicos y ambientales de *Aspergillus* que muestran una sensibilidad disminuida a itraconazol en pruebas *in vitro* (San Juan - Galán *et al.*, 2017a; San Juan - Galán *et al.*, 2017b). No obstante se desconocen los genotipos portadores de los mecanismos de resistencia que circulan en el país y cómo las mutaciones influyen en la expresión de los fenotipos.

IV. Materiales y métodos

IV.1 Aislados

Se seleccionó una muestra de 30 aislados de *Aspergillus fumigatus* conservados en la Colección de Hongos Patógenos del Laboratorio Nacional de Referencia de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK). Para su revitalización se empleó agar malta con extracto de levadura (AME) (Anexos) y los cultivos se incubaron a 28°C durante 7-10 días. Se empleó la clave taxonómica de de Hoog *et al.* para confirmar la pureza e identificación de los cultivos (de Hoog *et al.*, 2011) y se evaluaron las siguientes características fenotípicas: textura y color de la colonia en el reverso y anverso, tipo de esporulación, velocidad de crecimiento, difusión de pigmentos, tamaño y forma de la vesícula, color, textura y longitud del conidióforo, célula pie, presencia o no de métula, tamaño, forma, textura y color de los conidios, presencia o no de células de Hülle y otras estructuras teleomórficas (cleistotecios, ascosporas). Para la evaluación de las características culturales y micromorfológicas mencionadas anteriormente y la confirmación de sus identidades como *A. fumigatus* se utilizó AME y agar Czapek con extracto de levadura (ACE) (Anexos) y los cultivos se incubaron a 28°C, 37°C y a 50°C durante 7-10 días.

IV.2 Pruebas de susceptibilidad

Se evaluó la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de todos los aislados de *A. fumigatus* frente a itraconazol, voriconazol y posaconazol. Se utilizó el método de difusión en agar mediante E-test y se siguieron las indicaciones del fabricante (BioMérieux): se cultivaron los aislados de *A. fumigatus* en AME a 37°C durante 7-10 días y se prepararon inóculos de sus conidios en 5 mL de solución salina con 0,01 mL de Tween 20. La concentración se ajustó a $0,4-5 \times 10^5$ conidios/mL mediante cámara de Neubauer. Se embebió un hisopo estéril en la suspensión de conidios y se sembró el inóculo mediante método de sábana en placas de agar RPMI-1640 con 2 % de glucosa (Anexos). Luego de inoculadas las placas se aplicaron las tiras de E-test correspondientes a itraconazol, voriconazol y posaconazol (rangos de concentración 0,002-32 µg/mL) en posición central y con cuidado de no formar burbujas de aire. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 48 horas. La lectura de los resultados se realizó de forma visual y se interpretó la concentración mínima inhibitoria (CMI) como el valor del gradiente de concentración de la tira de E-test donde el halo de inhibición (80% de efecto inhibitorio en el crecimiento) corta de forma tangencial. Se emplearon para los triazoles evaluados frente a *A. fumigatus* los VCE que se presentan a

continuación: itraconazol, 1,0 µg/mL; voriconazol, 1,0 µg/mL; posaconazol, 0,5 µg/mL. Para la interpretación de los resultados se definió que cualquier aislado con una CMI igual o por encima de los VCE para cada triazol fuese considerado tipo no salvaje con posibilidad de tener resistencia adquirida al antifúngico en cuestión. Como cepa control se utilizó *Aspergillus fumigatus* tipo salvaje, ATCC® MYA-3627.

IV.3 Extracción de ácidos nucleicos

Para la obtención del micelio vegetativo de *A. fumigatus* sin esporulación se utilizó medio líquido de Sabouraud - dextrosa (Anexos). Se incubaron los cultivos a 37°C durante 7-10 días en agitación. Con una aguja de inoculación se tomó un inóculo equivalente a 200 mg (peso húmedo) de micelio, se lavó dos veces con EDTA a 0,5 M y se añadió a un vial eppendorf (1,5 mL) con 400 µL de buffer para formación de esferoplastos (Anexos). A continuación se agregaron entre 20 y 30 perlas de vidrio de 1 mm, se procedió a agitar en vórtex durante 5 minutos y luego se incubó el vial a 37°C durante 2½ horas. Pasado este tiempo se volvió a agitar en vórtex durante otros 5 minutos y a partir de este paso se siguieron las recomendaciones del QIAGEN UCP Pathogen Mini Kit (QIAGEN Group): se agregaron 40 µL de proteinasa K (20mg/mL), se agitó en vórtex por 1 minuto y se incubó a 56°C durante 20 minutos. Luego se añadieron 200 µL del buffer lisis APL2, se agitó por 1 minuto en vórtex y se incubó el vial a 70°C durante 10 minutos. A continuación se centrifugó el vial a 14 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, se separó el sobrenadante a un vial nuevo y se desechó la biomasa. Se adicionaron 300 µL de etanol al sobrenadante y se agitó intensamente en vórtex. Se descargó la solución en una columna del QIAGEN UCP DNA mini kit y se centrifugó la columna a 8000 rpm por 1 minuto. Se separó la columna a un nuevo tubo colector y se desechó el anterior. Se agregaron 600 µL del buffer APW1 a la columna y se repitieron los dos pasos anteriores. Se agregaron 600 µL del buffer APW2 y se centrifugó a 14 000 rpm por 3 minutos. Se separó la columna a un nuevo tubo colector y se desechó el anterior. Se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm por 3 minutos. Se separó la columna a un vial eppendorf 1,5 mL y se desechó el tubo colector anterior. Se adicionaron 60 µL de buffer AE en el centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1-2 minutos y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto para la elución del ADN. Finalmente se desechó la columna, se cerró el vial con el ADN y se conservó adecuadamente rotulado a -80°C.

IV.4 Amplificación del fragmento del gen *cyp51A*

Para la detección de la mutación M220 se empleó el protocolo descrito por Spiess *et al.* con modificaciones referentes al equipamiento empleado (Spiess *et al.*, 2012). Se llevó a cabo un PCR a punto final de un solo paso para amplificar una región del gen *cyp51A* que pueden contener la mutación M220. Para la mezcla de reacción se utilizó el sistema Taq PCR (QIAGEN Group): ThermoPol buffer [10X], deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) [10mM], ambos cebadores Sentido y Antisentido [10 µM], *Taq*Polimerasa [2,5 U] y se completó con agua ultrapura para biología molecular. El volumen final de la mezcla de reacción fue 45 µL y se utilizaron 5 µL de ADN diana para un total de 50 µL. Las secuencias de cebadores (Eurofins[®]) utilizados para la región que puede presentar el polimorfismo de simple nucleótido M220 fue la siguiente: M220_Sentido 5'-GCCAGGAAGTTCGTTCCAA-3'; M220_Antisentido 5'-CTGATTGATGATGTCAACGTA-3'.

El programa de amplificación empleado en el termociclador (BIOER Inc.) fue el siguiente: un paso de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos; 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, hibridación de los cebadores a 52°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto; un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos. La comprobación del producto de PCR se realizó en electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Los parámetros de amperaje y voltaje utilizados en la cámara electroforética (Thermo Scientific, Amersham Biosciences) fueron 90 mA y 110 V respectivamente. La lectura del gel se realizó en un transluminador de luz ultravioleta (AnalytickJena).

Como control positivo de la PCR se utilizó ADN (50 ng/µL) de la cepa *Aspergillus fumigatus* tipo salvaje, ATCC[®] MYA-3627. Como control negativo se empleó agua ultrapura para biología molecular.

IV.5 Secuenciación

El producto amplificado de la región se purificó mediante Qiaquick PCR Purification (QIAGEN Group) y se siguieron las recomendaciones del fabricante: se añadieron 40 µL del producto de PCR y 200 µL de buffer PB en un vial de 1,5 mL y se agitó en vórtex. Se agregó la mezcla en una columna de separación y se centrifugó a 14 000 rpm por un minuto. A continuación se desechó el residuo del tubo colector, se agregaron 750 µL de buffer PE en la columna y se centrifugó a 14 000 rpm por un minuto. En un nuevo tubo colector vacío se centrifugó la columna nuevamente

para eliminar los residuos de etanol del paso anterior. Se cambió la columna a un vial de 1,5 mL y se desechó el tubo colector. Se añadieron 50 μ L del buffer EB en el centro de la membrana, se incubó la columna a temperatura ambiente por un minuto y luego se centrifugó a 14 000 rpm por 1 minuto. Se conservó el ADN purificado a -20° C hasta su utilización.

Para el proceso de secuenciación se utilizó el estuche comercial CEQ DTCS quickstart (Beckman Coulter) y se procedió de la manera que sugiere el fabricante con la mezcla de secuenciación de cada cebador: en un tubo de 0,2 mL se añadieron 1 μ L del cebador [5 μ M], 8 μ L de la MasterMix propia del estuche, 8 μ L del producto de PCR purificado [20 ng/ μ L] y se completó con agua ultrapura calidad biología molecular para un volumen final de 20 μ L.

Para la amplificación de los cebadores en el termociclador se utilizó el siguiente protocolo: 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 segundos, hibridación a 52°C por 20 segundos y 72°C por 4 minutos.

Tras la reacción de secuencia se añadieron a cada vial 5 μ L de la solución terminadora (acetato de sodio [3M], EDTA [100mM], glucógeno [20 mg/mL]; 2:2:1). La mezcla se agregó en un vial de 1,5 mL y se adicionaron 60 μ L de etanol absoluto para agitarse en vórtex. El vial se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos a 4°C. Seguidamente se retiró con cuidado el sobrenadante, protegiendo el pellet, y se adicionaron 200 μ L de etanol al 70%. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante con cuidado y se dejó secar el pellet durante 20 minutos. Luego se resuspendió el pellet en 40 μ L de formamida, se agregó en una placa de 96 pocillos y se cubrió con una gota de aceite mineral para introducirse en el secuenciador. El secuenciador utilizado fue GenomeLab GeXP (Beckman Coulter).

La edición de las secuencias se realizó en el software MEGA X ver. 10.0.5. Para el alineamiento, análisis y detección de la mutación en las secuencias se emplearon los algoritmos de la herramienta online BLASTx ver. 2.9.0+ (Altschul *et al.*, 1997).

IV.6 Análisis estadístico

Todo el procesamiento estadístico se realizó en el software GraphPad versión 6.01 y en el Microsoft Excel 2013 versión 15.0.4420.1017.

IV.7 Consideraciones éticas y bioseguridad

El protocolo de la investigación, perteneciente al proyecto institucional con título “Susceptibilidad antifúngica *in vitro* de hongos filamentosos de interés médico” (Código 18013) se evaluó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y por el Comité de Ética del IPK. La información referente a todos los aislados está contenida en la base de datos de la Colección de Hongos Patógenos del LNRM-IPK y todo el proceso fue autorizado y supervisado por el Curador de la colección y por la Jefa del Laboratorio. La confidencialidad de los resultados también quedó en manos de estos cargos.

Para el trabajo en el laboratorio se tuvieron en cuenta los procedimientos establecidos según los Protocolos Normalizados Operacionales del LNRM-IPK. Todo el trabajo se realizó en un Gabinete de Bioseguridad clase II según lo establecido la resolución No. 103 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), de fecha 8 de octubre de 2002. El género *Aspergillus* está incluido entre los agentes biológicos que afectan al hombre, en el grupo de riesgo II, según declara la Resolución No. 38 del mismo organismo, fechada del 24 de marzo de 2006, por lo que representa riesgo individual moderado y comunitario limitado.

Se siguieron las pautas dispuestas en el Manual de Bioseguridad del IPK en relación a las buenas prácticas y uso de equipos de protección personal (batas y sobretapas, guantes, etc). El LNRM-IPK está certificado con licencia de Bioseguridad declarada por el Centro Nacional de Seguridad Biológica lo que garantizó sus condiciones para el correcto procesamiento y caracterización de los aislados y la eliminación final del material de desecho contaminado.

V. Resultados

Los 30 aislados se confirmaron como *A. fumigatus* de acuerdo a sus características culturales y micromorfológicas y su termotolerancia a 50°C en todos los casos, que lo distingue de otras especies de su misma sección taxonómica. En las figuras V.1 y V.2 se muestran imágenes de los cultivos y de las observaciones microscópicas. Los aislados presentaron colonias con un promedio de crecimiento rápido (> 65 mm de diámetro en 7 días) en ACE a 25° C y 37° C, con abundantes hifas aéreas y conidióforos de color verde oscuro. En AME las colonias presentaron un color menos azulado y el promedio de su velocidad de crecimiento fue menor (50 mm en 7 días) bajo las mismas condiciones de temperatura. En la micromorfología se observaron conidióforos de estipes lisos, hialinos y en algunos casos con una ligera coloración verde en la región apical de la vesícula. Los conidióforos presentaron esporulación columnar con células conidiógenas en distribución uniseriada. Las vesículas se apreciaron con forma subclavada y se distinguieron los conidios con forma esférica o sub-esférica en ocasiones, mostrando ligeras rugosidades en su superficie.

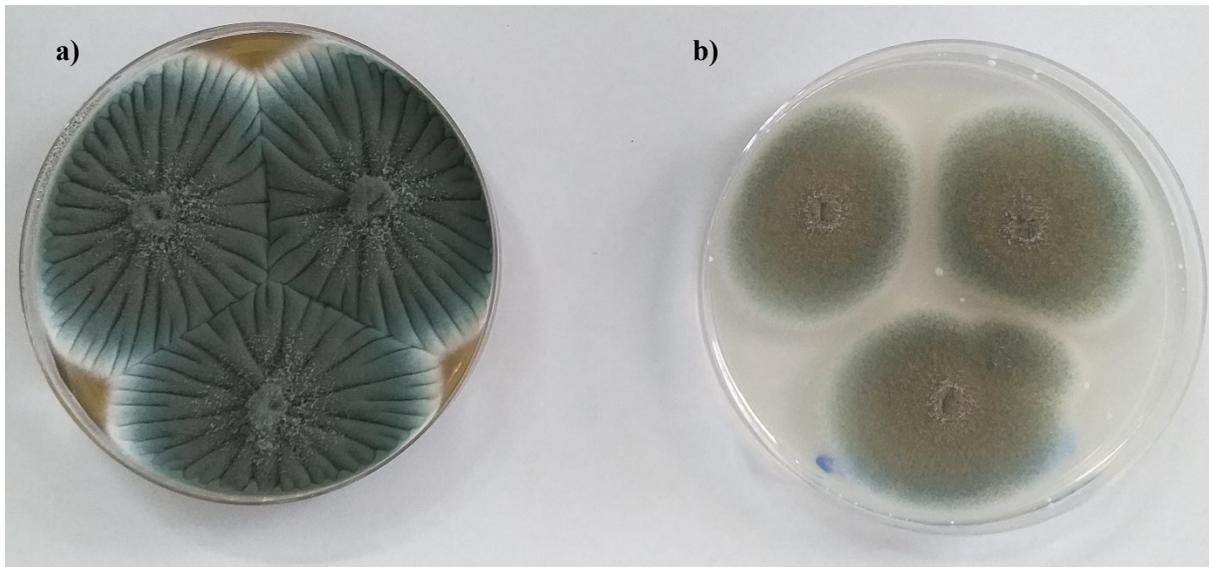


Figura V.1. Características de las colonias evaluadas de *Aspergillus fumigatus* en cultivo a 37°C durante 5 días. a) ACE y b) AME



Figura V.2. Observación microscópica a 400X con ácido láctico al 70%. Características micromorfológicas de los conidióforos de las colonias evaluadas de *Aspergillus fumigatus*.

Del total de la muestra evaluada frente a itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ) y posaconazol (PCZ) se encontraron 9 aislados resistentes al primero y ningún aislado resistente a los otros dos triazoles de acuerdo a los criterios establecidos como valores de corte epidemiológico. En la Figura V.3 se muestra la distribución de aislados de acuerdo a su respuesta frente a los triazoles evaluados.

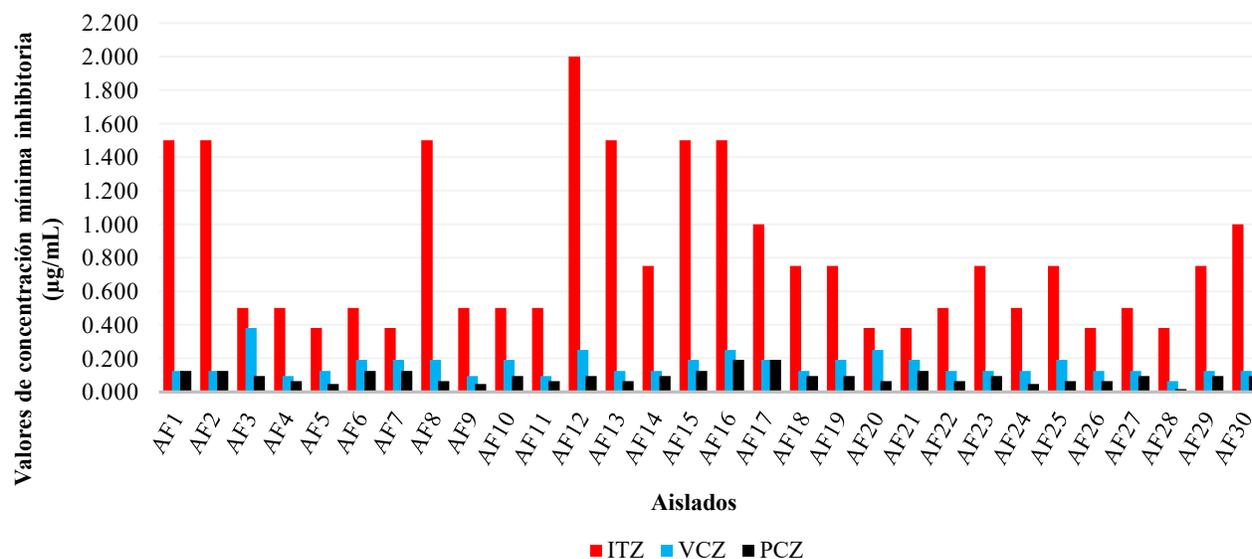


Figura V.3. Valores de concentración mínima inhibitoria frente a itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ) y posaconazol (PCZ) para los aislados de *A. fumigatus* evaluados en el estudio.

Las medias geométricas para los valores de CMI de itraconazol, voriconazol y posaconazol fueron 0,700; 0,150 y 0,083 µg/mL respectivamente. En la tabla V.1 se muestran los estadísticos de la distribución de los valores de CMI para los triazoles evaluados.

Tabla V.1. Estadísticos descriptivos para los valores de CMI de itraconazol, voriconazol y posaconazol en los aislados de *A. fumigatus* evaluados. Los valores se presentan en µg/mL.

ESTADÍSTICOS	ANTIFÚNGICOS		
	Itraconazol	Voriconazol	Posaconazol
Mínimo	0,380	0,064	0,016
Máximo	2,000	0,380	0,190
Desviación estándar	0,467	0,064	0,038
Varianza	0,219	0,004	0,002
Mediana (CMI ₅₀)	0,625	0,125	0,094
Percentil 90 (CMI ₉₀)	1,500	0,250	0,125
Test de Shapiro-Wilk	>0,001 (p>0,05) *	>0,001 (p>0,05) *	0,010 (p>0,05) *

*Significativo

Las figuras V.4 y V.5 muestran la interpretación de los criterios de resistencia y sensibilidad para los triazoles evaluados por Etest.

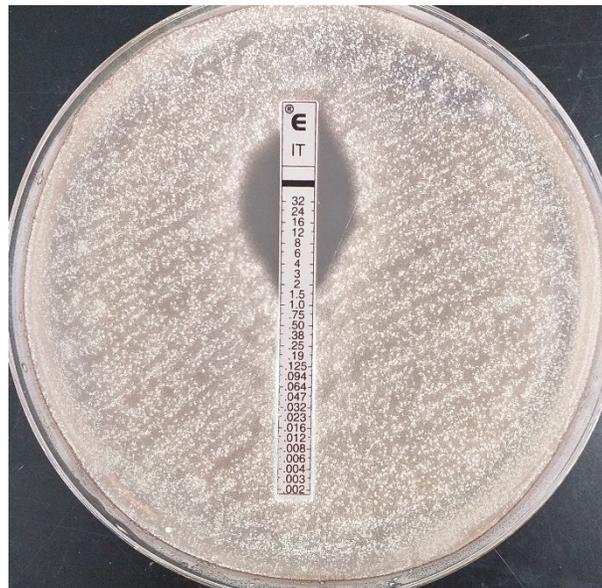


Figura V.4. E-Test de itraconazol con valor de CMI = 1,5 µg/mL para un aislado resistente (Ej. AF15).

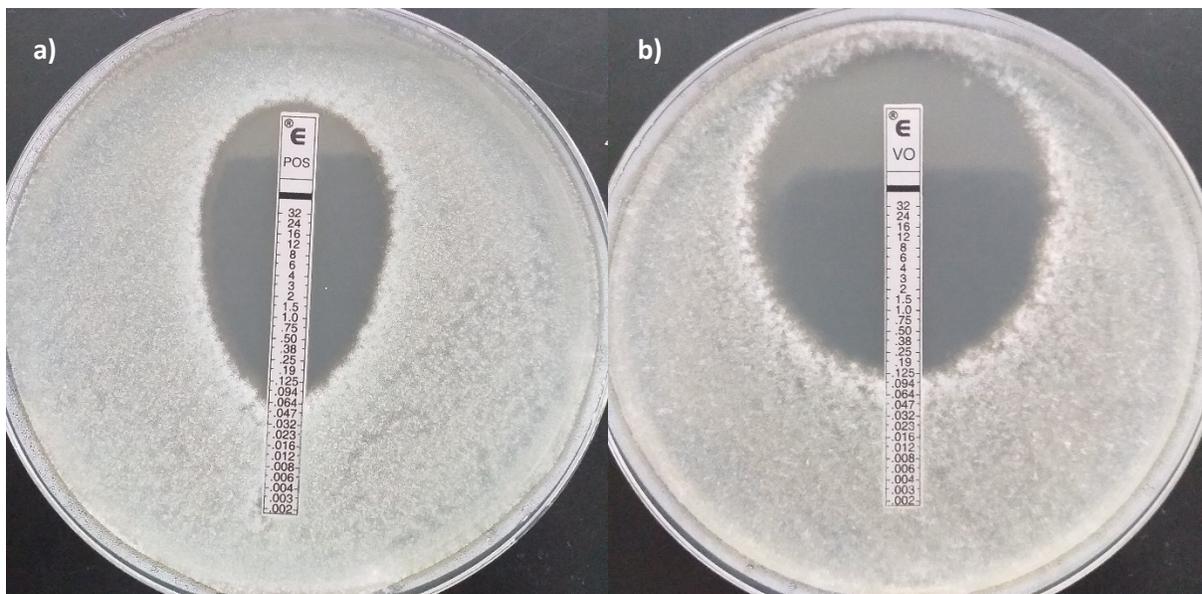


Figura V.5. E-Test de a) posaconazol y b) voriconazol para un aislado sensible (Ej. AF22).

En la figura V.6 se muestra la visualización de la corrida electroforética con las bandas de 173 pares de bases correspondientes a los amplicones del gen *cyp51* que tienen la posibilidad de contener la mutación en el codón 220 para la sustitución de la metionina en esa posición.

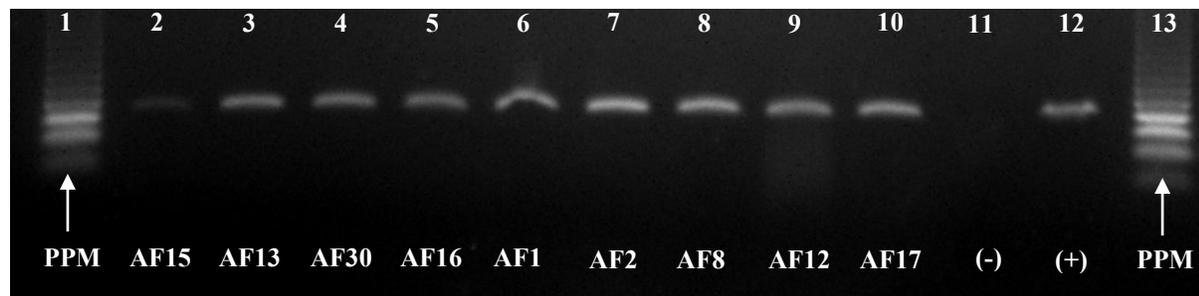


Figura V.6. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2 %. Región de 173 pb del gen *cyp51A* para la detección del reemplazo aminoacídico M220. Pocillos 1 y 13, patrón de peso molecular de 50 pb (PPM); pocillos 2-10, amplicones de los aislados resistentes a itraconazol; pocillo 11, (-) control negativo de la PCR; pocillo 12, (+) control positivo de la PCR, *A. fumigatus* ATCC MYA-3627.

La búsqueda en BLASTx alineó las secuencias con la secuencia de referencia Af293 (Número de acceso XP752137.1), indexada como proteína 14 – α – esterol demetilasa de una cepa salvaje y sensible a azoles perteneciente a la especie *A. fumigatus*. En la tabla V.2 se presentan los parámetros del BLASTx para el alineamiento de las secuencias.

Tabla V.2. Parámetros del BLASTx para el alineamiento de las secuencias de los aislados resistentes con la secuencia de referencia Af293.

Nombre de la secuencia	Valor de E	Identities aminoacídicas (%)
AF1	2E-28	46/46 (100)
AF2	2E-31	49/49 (100)
AF15	6E-28	45/45 (100)
AF13	6E-72	45/45 (100)
AF12	4E-74	45/45 (100)
AF30	5E-28	45/45 (100)
AF17	6E-28	45/45 (100)
AF16	1E-28	46/46 (100)
AF8	8E-31	49/50 (98)

En la Figura V.7 se presenta el alineamiento en la posición M220 y en ningún caso se comprobó la presencia del polimorfismo en este codón.

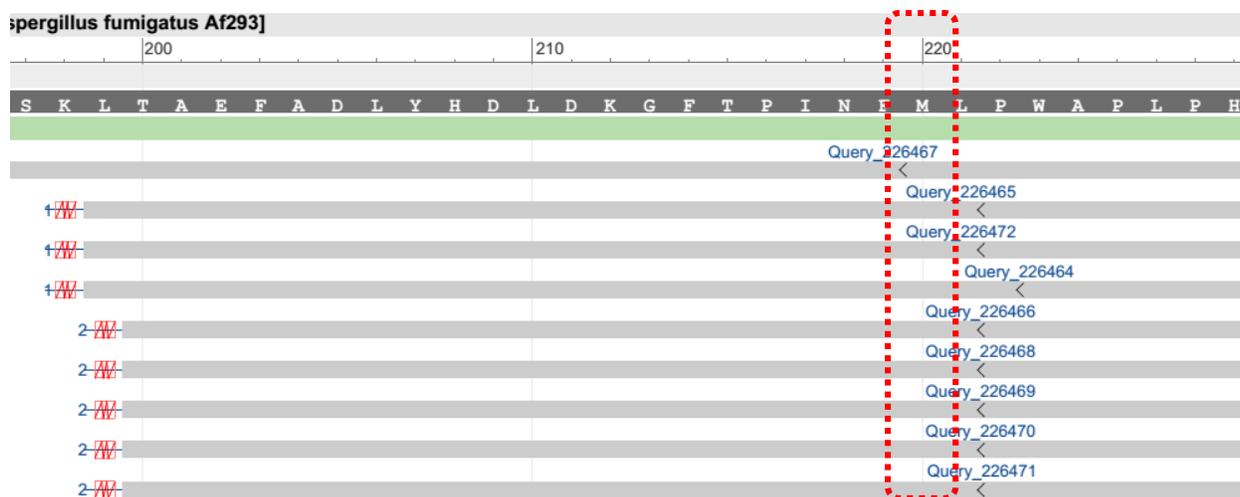


Figura V.7. Resultado del alineamiento de las nueve secuencias de los aislados resistentes a itraconazol con la 14 – α – esterol demetilasa de Af293, cepa tipo salvaje de *A. fumigatus*. En el recuadro de color rojo se señala la metionina en la posición 220 conservada en todas las secuencias. Las bandas grises representan las secuencias de nucleótidos alineadas. La nomenclatura en orden descendente es la siguiente: AF2, AF1, AF15, AF8, AF30, AF12, AF17, AF13 y AF16.

VI. Discusión

La emergencia de microorganismos resistentes a los diferentes antimicrobianos disponibles en el mercado es un problema en auge que interesa a todas las entidades nacionales e internacionales relacionadas con la salud humana y las estrategias de control de las enfermedades infecciosas. Los hongos no quedan fuera de este contexto y en las últimas cuatro décadas el incremento en la frecuencia de aislamiento de levaduras y hongos filamentosos drogorresistentes ha resaltado la necesidad de establecer sistemas de vigilancia para la resistencia antifúngica. Dentro de esta problemática, el género *Aspergillus*, y en particular la especie *A. fumigatus* y otras de su misma sección, exigen una atención diferenciada por sus implicaciones en la salud, donde la aspergilosis ocupa un puesto primario, junto a la candidiasis, en las causas de muertes por infecciones fúngicas. Estas especies son potenciales portadoras de mecanismos que confieren sensibilidad disminuida frente a los antifúngicos y por ello resulta fundamental la evaluación de la susceptibilidad *in vitro* y el reconocimiento de marcadores moleculares de resistencia.

La identificación garantizada de *A. fumigatus* en este estudio no solo lo aseguraron las pruebas convencionales con base en la morfología sino también la termotolerancia a 50° C, un criterio insoslayable y estricto en términos de clasificación taxonómica para esta especie. No obstante, junto a *A. fumigatus* se encuentran otros miembros de la sección *Fumigati* que son muchas veces indiferenciables mediante técnicas convencionales de identificación y que muestran patrones de susceptibilidad resistentes con alta frecuencia. Un grupo de investigadores realizó un estudio de susceptibilidad mediante la metodología Sensititre Yeast One para 86 aislados clínicos de *Aspergillus* entre los que se encontraban seis miembros de la sección *Fumigati* diferentes de *A. fumigatus* (*A. hiratsukae*, *A. thermomutatus*, *A. udagawae* y tres aislados pertenecientes a la especie *A. lentulus*). Todos ellos mostraron valores de CMI superiores a 1 µg/mL para voriconazol lo que clasificó como aislados tipo no salvaje de acuerdo con los VCE empleados en ese estudio (Mello *et al.*, 2017). En otro trabajo publicado, investigadores del Instituto de Salud Carlos III en España determinaron, mediante el método de microdilución del CLSI, resistencia a itraconazol y voriconazol en 12 aislados de *A. lentulus* y dos aislados de *A. fumigatiaffinis*, todos de origen clínico (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). Aunque las muestras en las investigaciones mencionadas no fueron suficientemente amplias como para obtener resultados decisivos sobre la predisposición intrínseca a desarrollar resistencia a triazoles de estas especies, ambos aportan evidencias

importantes en su caracterización además de mostrar la efectividad de otros azoles, como el posaconazol, para su empleo alternativo en la terapia antifúngica.

Los triazoles componen el principal grupo farmacológico empleado en el tratamiento de las infecciones por *A. fumigatus*, siendo el voriconazol el antimicótico de primera línea utilizado y el posaconazol y el itraconazol propuestos como terapia alternativa o profiláctica según la forma clínica en el paciente y el estado evolutivo de la enfermedad (Patterson *et al.*, 2016; Ullmann *et al.*, 2018). No obstante, *A. fumigatus* es una especie con gran capacidad adaptativa y numerosos estudios de susceptibilidad han confirmado su capacidad para desarrollar fenotipos resistentes a estos antifúngicos (Bernal - Martínez *et al.*, 2016).

Las pruebas de susceptibilidad antifúngica por E-Test son métodos de fácil desarrollo, con mínima necesidad de recursos, de personal capacitado y aportan resultados confiables sobre los valores de CMI, con excelente correlación con respecto a los métodos de referencia estandarizados por el CLSI y el EUCAST. En el caso particular de la evaluación del itraconazol y el voriconazol, el E-Test tiene buen desempeño y puede emplearse con seguridad para la detección de resistencia en *A. fumigatus* y otras especies (Sanguinetti y Posteraro, 2018).

La detección de nueve aislados (30 %) con fenotipos resistentes a itraconazol indica que Cuba no está exenta de esta situación. En otros trabajos a nivel global la detección de resistencia oscila entre valores similares. Mediante la metodología de E-test, investigadores iraníes publicaron patrones de susceptibilidad para itraconazol en 30 aislados de *A. fumigatus* con valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0,750 y 1,00 µg/mL respectivamente (Badiiee *et al.*, 2012). En Holanda, varios investigadores encontraron, en un pesquisaje en 420 aislados de *A. fumigatus*, valores de resistencia frente a triazoles en el 37 % de ellos, con una alta prevalencia de mutaciones en el gen *cyp51A* (Buil *et al.*, 2018). Otros estudios en Estados Unidos, enfocados en aislamientos ambientales, publicaron la presencia de 19 % de *A. fumigatus* resistentes a itraconazol en 200 aislados con un estrecho vínculo a mutaciones de la 14- α esterol demetilasa (Hurst *et al.*, 2017). En pacientes alemanes con trasplantes de médula ósea, se aislaron un total de 27 *A. fumigatus* de los cuales el 29,6 % fueron resistentes a itraconazol y a voriconazol (Steinmann *et al.*, 2015). No obstante, algunos trabajos difieren de estos resultados en cuanto a frecuencia de aparición de resistencia frente a antifúngicos triazólicos. Con el empleo de los mismos VCE que se evaluaron en la presente investigación, otros científicos encontraron resistencia a itraconazol en 10 de 128

aislados clínicos de *A. fumigatus* (Balajee *et al.*, 2004), una cifra inferior a los resultados que aquí se presentan. De la misma manera en Austria se encontraron valores de CMI₉₀ equivalentes a 1 µg/mL para 27 aislados de *A. fumigatus* en evaluación (Lass-Flörl y Perkhofner, 2008), lo que representa un valor más bajo que el que se presenta en este trabajo.

En el caso del voriconazol y del posaconazol no se observaron aislados con posible genotipo resistente durante este estudio, lo que coincide con lo que está publicado en la literatura científica internacional. Varios trabajos sobre la acción del voriconazol y el posaconazol en *A. fumigatus* revelan bajos valores de CMI con ningún aislamiento resistente frente a estos antifúngicos (Espinel-Ingroff y Rezusta, 2002; Felton *et al.*, 2010; Gheith *et al.*, 2014). Una posible causa de esto es que dichos fármacos son de reciente desarrollo y por tanto su utilización y comercialización ha estado limitada durante más tiempo bajo las condiciones de patentes y control de calidad que exigen las entidades regulatorias internacionales (Maertens, 2004). Además como parte de la evolución farmacológica, las nuevas alternativas triazólicas poseen otras dianas paralelas que refuerzan su efecto antifúngico. En el caso particular del voriconazol también actúa sobre otras demetilinas de la ruta biosintética del ergosterol (Chandrasekar y Manavathu, 2009). Estos resultados plantean una propuesta segura y efectiva para el tratamiento de las infecciones por *A. fumigatus* y sugieren su consideración en el Cuadro Nacional de Medicamentos del país, donde solo están contemplados el itraconazol y algunos imidazoles sin utilidad para las aspergilosis.

No obstante la efectividad de los azoles más modernos no es absoluta y son cada vez más frecuentes las publicaciones sobre resistencia a voriconazol y posaconazol. Modificaciones como TR46/Y121F/T289A y TR34/L98H se detectan en aislados con fenotipos que presentan valores altos de CMI frente a voriconazol, por encima de 4 µg/mL. Durante una investigación realizada en Holanda con el objetivo de determinar la presencia de estas mutaciones bajo tratamiento con voriconazol encontraron 60 pacientes portadores de ellas de un total de 63 pacientes evaluados lo que evidencia la alta incidencia de estos polimorfismos. De igual manera TR46/Y121F/T289A también se ha detectado en Bélgica en pacientes fallecidos por aspergilosis invasiva en terapia con triazoles (van der Linden *et al.*, 2013).

La frecuencia de aislamiento de *A. fumigatus* resistente a triazoles en Cuba va en incremento y demanda trabajos de mayor profundidad sobre genotipos circulantes y epidemiología molecular. Resultados publicados en investigaciones previas del Laboratorio Nacional de Referencia de

Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” revelaron la presencia de aislados de origen clínico y ambiental de *A. fumigatus* con altos valores de CMI frente a itraconazol y anfotericina B y se señalaron como una alerta microbiológica para el sistema de salud (San Juan - Galán *et al.*, 2017b). En el Cuadro Nacional de Medicamentos sólo está contemplado el itraconazol dentro del grupo de los triazoles recomendados para el tratamiento de la aspergilosis por lo que la vigilancia de la resistencia antifúngica en Cuba para *A. fumigatus* debe estar focalizada en este antifúngico por la presión selectiva que puede generar en los ambientes intrahospitalarios.

En este trabajo se evaluó la presencia de la mutación M220 como causa de la resistencia a itraconazol y, aunque no se detectó la mutación en ninguno de los aislados, la diversidad de polimorfismos en *cyp51A* es amplia y pudiera suceder que otros mecanismos sean los que actúan y dan lugar a estos aislados resistentes. Hasta la fecha se han descrito más de 40 mutaciones diferentes asociadas al gen de la 14 – α - esterol demetilasa, la mayoría como polimorfismos de simple nucleótido expresados como sustituciones aminoacídicas o combinaciones de estos con secuencias de repeticiones en tándem adicionadas en la región del promotor del gen (Parker *et al.*, 2014). La mutación M220 aparece con mayor frecuencia en los pacientes con infecciones crónicas por *Aspergillus* que están bajo terapia con azoles durante prolongados períodos de tiempo, generando genotipos con resistencia a itraconazol y puede proporcionar sensibilidad disminuida y variable frente al voriconazol y al posaconazol respectivamente (Arikan - Akdagli *et al.*, 2018). En relación a este comentario, el análisis de la información de los aislados evaluados en el presente trabajo reveló que seis de los nueve fenotipos resistentes detectados tienen un origen clínico de pacientes con terapia azólica y aún así carecen de la mutación M220, lo que sugiere que deben ser otros los mecanismos de resistencia que predominan en los pacientes tratados en Cuba.

Existen varias hipótesis sobre la aparición de la resistencia triazólica. Al igual que en bacterias, la presión selectiva del medio ambiente potencia el surgimiento de fenotipos de *A. fumigatus* adaptados a altas concentraciones de antifúngicos. Sin embargo, a diferencia de ellas cuyos mecanismos de transformación, conjugación y transducción les facilitan la transferencia horizontal de material genético, la transmisión y modificación de la información genética en los hongos tienen su base fundamental en los procesos de recombinación genética que ocurren durante la conversión a estados sexuales, asexuales y parasexuales y en la acción de genes reguladores sobre la expresión del genoma (Webster y Weber, 2007). La variabilidad en el gen *cyp51* que condiciona el

surgimiento de resistencia puede deberse a mutaciones adquiridas durante cambios en el ciclo de vida de *Aspergillus*. Investigadores han logrado reproducir este proceso *in vitro* al cruzar cepas heterotálicas compatibles que son portadoras de mutaciones diferentes y donde una fracción de las ascosporas resultantes de ese cruce presentó una nueva mutación producto de la combinación de las anteriores. La meiosis puede conducir a un entrecruzamiento cromosómico desbalanceado con desapareamiento de determinadas regiones que generan adiciones o deleciones genéticas (Zhang *et al.*, 2017a).

La reproducción asexual también tiene un papel esencial en el desarrollo de resistencia al garantizar la expresión de todos los núcleos celulares que posee el micelio, un hecho que en condiciones vegetativas no sucede porque ocurre segregación por los núcleos predominantes. Un grupo de investigadores en Holanda demostraron, durante un experimento evolutivo para una misma cepa sensible, un alto contraste en los valores de crecimiento micelial y de CMI frente a cinco triazoles diferentes para condiciones con esporulación asexual y sin ella. Los resultados de este trabajo evidenciaron el importante rol que tienen los ciclos asexuales para la selección de generaciones resistentes en los ecosistemas que habita *A. fumigatus*, incluidos los sitios anatómicos que invade durante una aspergilosis y donde solo la fase anamórfica está presente (Zhang *et al.*, 2015).

La presencia de polimorfismos en *cyp51A* no siempre está asociada a condiciones intrínsecas del microorganismo sino a su adquisición a causa de la presión selectiva del ambiente. En este sentido, un posible precedente para la aparición de resistencia triazólica en *A. fumigatus* es la acción directa del hombre sobre los ecosistemas agrícolas.

Desde 1970 se utilizan azoles en la agricultura y en la actualidad existen más de 20 inhibidores diferentes donde valen mencionar como los más comercializados el tebuconazol, difenoconazol, propiconazol, epoxiconazol, procloraz, entre otros. El empleo en la agricultura de fungicidas del tipo inhibidores de demetilación (IDM) es una técnica con amplia difusión que ha demostrado ser efectiva en el incremento de beneficios para cultivos de alta demanda. Sin embargo, estos plaguicidas constituyen un riesgo ya que comparten estructuras y mecanismos de acción similares con otros miembros de su familia química y múltiples instituciones han demostrado que pueden conducir al desarrollo de resistencia cruzada (Ziogas y Malandrakis, 2015). Son compuestos que pueden persistir activos durante varios meses en el suelo, plantas y otros ecosistemas. Faria –

Ramos *et al.* demostraron que el tratamiento de colonias de *A. fumigatus* con concentraciones progresivas de procloraz durante un mes originaba nuevas colonias con altos valores de CMI para voriconazol, itraconazol, posaconazol y fluconazol (Faria-Ramos *et al.*, 2014). De igual manera Zhang *et al.* desarrollaron un experimento similar donde sometieron un grupo de aislados de *A. fumigatus* a un tratamiento durante siete semanas con cinco IDM diferentes. El análisis de sus patrones evolutivos tanto para las CMI relativas como para los cambios en el morfotipo de los aislados evaluados planteó la selección de colonias resistentes como consecuencia de la acción de los fungicidas agrícolas, en especial el tebuconazol y el difenoconazol. Además determinaron la segregación de algunos loci asociada a la resistencia a los triazoles clínicos a causa de un cruzamiento sexual entre aislados heterotálicos, lo que refuerza la hipótesis expuesta en párrafos anteriores (Zhang *et al.*, 2017b).

La utilización de fungicidas químicos en la agricultura cubana es una práctica frecuente que merece atención y análisis. De acuerdo con lo establecido en la Gaceta Oficial No.16 de la República de Cuba y aprobado por el Ministerio de Salud Pública y por el Ministerio de Agricultura, en el país está autorizada la comercialización y distribución, única o combinada, de 11 azoles de uso agrícola entre los que valen destacar el procloraz, difenoconazol, tebuconazol, tetraconazol y propiconazol, todos ellos mencionados como fuente potencial para la resistencia cruzada a triazoles clínicos (Cuba, 2016). Cabe valorar entonces cuáles son las estrategias de empleo de triazoles a nivel nacional. Para disminuir la aparición de resistencia antifúngica en el ambiente el Comité de Acción para la Resistencia a los Fungicidas (del inglés, *Fungicide Resistance Action Committee*) recomienda usar combinaciones de plaguicidas con otros mecanismos de acción para así reducir las concentraciones y la presión selectiva en los cultivos, aplicar los tratamientos solo cuando sea estricto, necesario y en las dosis recomendadas y disponer de otras medidas como buenas prácticas agronómicas, siembra de variedades resistentes y buena higiene de las plantas (Brent y Hollomon, 2007). La puesta en práctica de estas medidas garantizaría la racionalización en las estrategias de cultivo y la disminución del aislamiento de hongos resistentes con capacidad patogénica, *A. fumigatus* incluido.

La presión selectiva y el abuso de azoles en el ambiente no es un problema circunscrito al ámbito rural. La presencia de estos químicos está muy presente en las regiones urbanas donde su utilización se asocia con frecuencia a jardines y áreas de cultivo de plantas ornamentales como

macetas y jardineras. En el sur de Inglaterra y Gales varios investigadores realizaron estudios comparativos entre aislados de *A. fumigatus* provenientes de zonas rurales y urbanas y encontraron en éstas últimas un predominio de fenotipos resistentes portadores de mutaciones en *cyp51A*. Los muestreos con mayor frecuencia de aislamiento fueron las locaciones de cultivo de plantas ornamentales alrededor de centro hospitalarios. Estos resultados contradicen las hipótesis sustentadas hasta el momento de que la resistencia a azoles en *A. fumigatus* es un problema asociado fundamentalmente a la agricultura. Es posible que el control y manejo en el empleo de triazoles en los campos agrícolas es mucho más estricto que en áreas no reguladas como jardines y otros sitios urbanos donde los trabajadores no siguen pautas bien definidas para añadir los fungicidas lo que puede constituir un factor determinante para la aparición de resistencia en estos lugares (Tsitsopoulou *et al.*, 2018; Sewell *et al.*, 2019). Este planteamiento sugiere la necesidad de hacer muestreos para la detección de fenotipos resistentes de *A. fumigatus* en las llamadas “áreas verdes” aledañas a instituciones de salud cubana, en especial aquellas que atienden pacientes de riesgo para aspergilosis.

Existe también la posibilidad de que en Cuba no existan cepas autóctonas de *A. fumigatus* resistentes y los aislamientos en cuestión tengan un origen externo al país. El género *Aspergillus* pertenece al grupo de hongos denominados anemófilos por sus características de dispersión en la atmósfera. Son microorganismos cuyas esporas son capaces de mantenerse suspendidas en el aire durante tiempo prolongado y su estructura y metabolismo le permiten mantener su viabilidad sin que las radiaciones solares o la desecación las afecten (Burge, 2011). Las características de este tipo de hongos los convierte en colonizadores natos y les permiten recorrer grandes distancias, incluso de magnitud intercontinental, en coyuntura natural con fenómenos atmosféricos como huracanes, tormentas de polvo, El Niño, entre otros (Magyar *et al.*, 2016).

Aunque desde otro punto de vista pero en relación a la dispersión de los hongos anemófilos, en Cuba se ha registrado la importación de agentes fúngicos foráneos por vía natural, como *Peronospora tabacina*, o moho azul del tabaco. En 2001 una epifitias asociada a este microorganismo se reportó en la región de Pinar del Río pronosticada por el transporte de conidios de *Peronospora tabacina* en la circulación del huracán Michelle. Las modelaciones atmosféricas mostraron la trayectoria de movimiento de conidios desde Centroamérica, específicamente Honduras y Nicaragua. Situaciones similares ocurrieron en 2002 y 2003 por los huracanes Isidore

y Lili (Lopetegui *et al.*, 2006). Dentro de esta hipótesis también cabe destacar la influencia de las tormentas de polvo provenientes del desierto del Sahara que acostumbran a afectar el Caribe en los meses de julio y agosto y traen consigo gran cantidad de elementos ajenos a los ecosistemas caribeños. Según los centros meteorológicos de varias islas del Caribe el incremento de alérgenos en esta época del año está asociado con el polvo del Sahara, una situación que también se relaciona con un incremento en el ingreso de pacientes asmáticos en instituciones hospitalarias. En muestreos ambientales que se han realizado de estas tormentas de polvo del desierto se han encontrado incluso hongos con importante riesgo para los ecosistemas caribeños como *Aspergillus sydowii*, agente causal de la aspergilosis coralina (Garrison *et al.*, 2006; Monteil, 2008). Se han descrito cepas de *A. fumigatus* portadoras de las mutaciones TR34/ L98H en países de África por lo que existe la posibilidad de importación desde esta región (Mushi *et al.*, 2016).

Cuba no está exenta de riesgos de importación asociados a su ubicación geográfica y a la intensa actividad meteorológica en el área del mar Caribe. Aunque las investigaciones en el continente americano sobre la resistencia a triazoles de *A. fumigatus* son incipientes, estudios en Colombia y Estados Unidos confirmaron la presencia de fenotipos resistentes portadores de mutaciones en *cyp51A* del tipo M220 y L98H. También en Suramérica se han encontrado otras nuevas mutaciones de tipo “repeticiones en tándem” que al parecer tienen una frecuencia mayor que aquellas puntuales (Gonçalves, 2016; Verweij *et al.*, 2016). Existen un gran número de polimorfismos diferentes asociados a la resistencia a triazoles que no se determinaron en este trabajo y que pueden ser la causa de los fenotipos observados. Estas áreas se encuentran a distancias cercanas de Cuba y pueden ser fuentes potenciales para cepas importadas. Estudios enfocados en la búsqueda de otros mecanismos de resistencia combinados con el empleo de microsátélites para la obtención de resultados de epidemiología molecular permitirían descifrar la hipótesis del origen foráneo de los aislados y cómo se distribuyen los genotipos de *A. fumigatus* a lo largo del país.

Este trabajo constituye el primer paso para futuras investigaciones encaminadas a conocer la distribución en el país de mecanismos moleculares de resistencia en *A. fumigatus* con sensibilidad disminuida frente a triazoles. De igual manera muestra por primera vez la ausencia de mutaciones asociadas a la terapia y sugiere replantearse la fuente de la resistencia antifúngica con énfasis particular en la agricultura y otros ambientes urbanos sometidos a la acción de plaguicidas.

Además ratifica la efectividad de triazoles como el voriconazol y el posaconazol como medicamentos de elección para el tratamiento de las aspergilosis por su potente actividad fungicida *in vitro*.

VII. Conclusiones

- La existencia de fenotipos de *A. fumigatus* resistentes a itraconazol en Cuba sugiere la necesidad de incluir a este microorganismo en el desarrollo de la vigilancia para la resistencia antifúngica por su rápida dispersión en el ambiente.
- El voriconazol y el posaconazol representan la mejor alternativa de elección para la asistencia de pacientes con aspergilosis en Cuba.
- La ausencia de mutaciones M220 relacionadas con la terapia antifúngica apunta a nuevos enfoques sobre el origen de la resistencia antifúngica con particular interés en la influencia de plaguicidas agrícolas en ambientes rurales y urbanos.

VIII. Recomendaciones

- Determinar otros mecanismos moleculares de resistencia vinculados a la acción de fungicidas de uso agrícola.
- Realizar estudios de epidemiología molecular para determinar el origen y distribución de los aislados resistentes a triazoles.

IX. Referencias bibliográficas

- Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin & Exper Allerg.* 2013;43:850-73.
- 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;52(4):1244-51. **10.1128/AAC.00942-07.**
- Almaguer M. Diversidad y dinámica de la aeromicobiota en dos zonas del Occidente de Cuba: rural y urbana [Tesis de Doctorado]. Facultad de Biología: Universidad de La Habana; 2016.
- Almaguer M, Rojas-Flores TI. Aeromicota viable de la atmósfera de La Habana, Cuba. *NACC.* 2013;20:35-45.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-402.
- Ananda - Rajah MR, Kontoyiannis D. Isavuconazole: a new extended spectrum triazole for invasive mold diseases. *Future Microbiol.* 2015;10(5):693-708.
- Arenas R. *Micología Médica Ilustrada.* 5ta ed. México D. F., México: McGraw-Hill; 2014. 401 p.
- Arikan - Akdagli S, Ghannoum M, Meis JF. Antifungal resistance: specific focus on multidrug resistance in *Candida auris* and secondary azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Fungi.* 2018;4(129):1-13. **10.3390/jof4040129.**
- Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol.* 2007;45:569-87.
- Ashley ED, Perfect JR. Pharmacology of azoles: UpToDate; 2019 [cited 2019 17/04/2019]. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/pharmacology-of-azoles>.
- Badiie P, Alborzi A, Moeini M, Haddadi P, Farshad S, Japoni A, *et al.* Antifungal susceptibility of the *Aspergillus* species by etest and CLSI reference methods. *Arch Iran Med.* 2012;15(7):429-32.
-

Referencias bibliográficas

- Balajee SA, Weaver M, Imhof A, Gribskov J, Marr KA. *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1197-203.
- Beltrán N, San Juan - Galán JL, Fernández - Andreu CM, Yera DM, Pita MB, Perurena - Lancha MR, *et al.* Chronic pulmonary aspergillosis in patients with underlying respiratory disorders in Cuba - a pilot study. *J Fungi.* 2019;5(18):1-8. **10.3390/jof5010018.**
- Bennett JW. An overview of the genus *Aspergillus*. En: Machida M, Gomi K, editors. *Aspergillus: molecular biology and genomics.* Poole, UK: Caister Academic Press; 2010. p. 238.
- Bernal - Martínez L, Alastruey - Izquierdo A, Cuenca - Estrella M. Diagnostics and susceptibility testing in *Aspergillus*. *Future Microbiol.* 2016;11(2):315-28. **10.2217/fmb.15.140.**
- Bess - Constantén S, Alonso - Alomá I, Sánchez - Sordo E, López - Nistal LM, Torres - Vidal RM, Martínez - Morales MA, *et al.* Anuario Estadístico de Salud. La Habana: Ministerio de Salud Pública, 2018.
- Bonifaz JA. *Micología Médica Básica.* 4ta ed. México D. F., México: McGraw-Hill; 2012.
- Brent KJ, Hollomon DW. *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?* Bristol, UK: FRAC; 2007. 60 p.
- Buil JB, Hagen F, Chowdary A, Verweij PE, Meis JF. Itraconazole, voriconazole, and posaconazole CLSI MIC distributions for wild-type and azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Fungi.* 2018;4(103):1-9. **10.3390/jof4030103.**
- Burge H. *Fungal aerosols: EMLab P&K; 2011* [cited 2019 13/08/2019]. Disponible en: <https://www.emlab.com/resources/education/environmental-reporter/fungal-aerosols/>.
- Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Invasive aspergillosis: Current strategies for diagnosis and management. *Infect Dis Clin N Am* 2016;30:125-42.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, *et al.* Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews.* 2009;22(2):291-321. **10.1128/CMR.00051-08.**
- Chandrasekar PH, Manavathu EK. Antifungal resistance: *Aspergillus*. En: Mayers DL, editor. *Antimicrobial Drug Resistance.* New York: Humana Press; 2009. p. 953-65.

Referencias bibliográficas

- CLSI. Performance standards for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi document M61-A; Approved Standard - First Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi document M38-A2; Approved Standard - Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008a.
- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts document M27-A3; Approved Standard - Third Edition. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008b.
- Costa C, Dias PJ, Sa-Correia I, Teixeira MC. MFS multidrug transporters in pathogenic fungi: do they have real clinical impact? *Frontiers in physiology*. 2014;5:197. **10.3389/fphys.2014.00197**.
- Lista oficial de plaguicidas autorizados, NC575 (2016).
- Cuenca-Estrella M, Lopez AG, Izquierdo AA, Martinez LB, Cuesta I, Buitrago MJ, *et al*. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the sensititre yeastone and e-Test techniques for *in vitro* detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1782-6.
- Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(3):447-65.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. Utrecht, The Netherlands: CBS; 2011.
- Denning DW. Global Action Fund for Fungal Infections Geneva, Switzerland 2016 [updated 10/01/2016 19/01/2016]. Disponible en: www.gaffi.org.
- Denning DW, Cadranet J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, *et al*. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J*. 2016;47:45-68.
- Espinel-Ingroff A. In vitro susceptibility testing: When, where and what to use. *J Invasive Fungal Infect*. 2008;2(2):52-62.

Referencias bibliográficas

- Espinel-Ingroff A, Rezusta A. E-test method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to the new triazoles voriconazole and posaconazole and to established antifungal agents: comparison with NCCLS broth microdilution method. J Clin Microbiol. 2002;40(6):2101-7. **10.1128/JCM.40.6.2101-2107.2002.**
- EUCAST. Antifungal agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs: EUCAST; 2019a [24/04/2019]. Disponible en: <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>.
- EUCAST. Definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut off values: EUCAST; 2019b [24/04/2019]. Disponible en: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- EUCAST. E.def 9.3. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds: EUCAST; 2015.
- Faria-Ramos I, Farinha S, Neves-Maia J, Tavares PR, Miranda IM, Estevinho LM, *et al.* Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. BMC Microbiol. 2014;14(155):1-5. **10.1186/1471-2180-14-155.**
- Felton TW, Baxter C, Moore CB, Roberts SA, Hope WW, Denning DW. Efficacy and safety of posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis. Clin Infect Dis. 2010;51(12):1383-91.
- Ferrer-Pérez A, Roche-Albernas C, Ramos-Valdés J, Alfonso-González CP, González-Cárdenas Y, Vázquez-La Rosa L, *et al.* Aspergilosis invasiva neuropulmonar. Acta Médica del Centro. 2014;8(2):7.
- Fothergill AW. Antifungal susceptibility testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) methods. En: Hall GS, editor. Interactions of yeasts, moulds and antifungal agents: How to detect resistance. Texas: Humana Press; 2012. p. 65-74.
- Frisvad JC, Larsen TO. Extrrolites of *Aspergillus fumigatus* and other pathogenic species in *Aspergillus* section *Fumigati*. Front Microbiol. 2016;6(1485):1-14.
- García - Rubio R, Cuenca - Estrella M, Mellado E. Triazole resistance in *Aspergillus* species: an emerging problem. Drugs. 2017:1-15. **10.1007/s40265-017-0714-4.**
- Garrison VH, Foreman WT, Genualdi S, Griffin DW, Kellogg CA, Majewski MS, *et al.* Saharan dust, a carrier of persistent organic pollutants, metals and microbes to the Caribbean. Rev Biol Trop. 2006;54(3):1-5.

- Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(4):501-17.
- Gheith S, Saghrouni F, Bannour W, Ben Youssef Y, Khelif A, Normand AC, *et al*. In vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin of *Aspergillus* spp. isolated from patients with haematological malignancies in Tunisia. *SpringerPlus*. 2014;3(19):1-8.
- Godet C, Philippe B, Laurent F, Cadranel J. Chronic pulmonary aspergillosis: an update on diagnosis and treatment. *Respiration*. 2014;88:162-74.
- Gonçalves SS. Global aspects of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* with focus on Latin American countries. *J Fungi*. 2016;3(5):1-10. **10.3390/jof3010005**.
- Gorbea MB, Varona P, La Rosa MC, Rocha RGG, Medina RS, Montes de Oca NA, *et al*. III Encuesta nacional de factores de riesgo y actividades preventivas de enfermedades no transmisibles. Cuba 2010-2011. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas, 2014.
- Grave de Peralta YT, Muñoz MC, Digón SS. Aspergilosis pulmonar en una mujer adulta. *Medisan*. 2016;20(8):2071-5.
- Hayes GE, Novak - Frazer L. Chronic Pulmonary Aspergillosis—Where Are We? and Where Are We Going? *J Fungi*. 2016;2(18):1-34. **10.3390/jof2020018**.
- Howard SJ, Arendrup MC. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol*. 2011;49:90-5.
- Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag AM, Fisher MC, Pasqualotto AC, *et al*. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(7):1068-76.
- Hurst SF, Berkow EL, Stevenson KL, Litvintseva AP, Lockhart SR. Isolation of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* from the environment in the south-eastern USA. *J Antimicrob Chemother*. 2017. **10.1093/jac/dkx168**.
- Iyer S, Dodge PR, Adams RD. Two cases of *Aspergillus* infection of the central nervous system. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1952;15(3):152-63.
- Jenks JD, Hoenigl M. Treatment of aspergillosis. *J Fungi*. 2018;4(98):1-17. **10.3390/jof4030098**.

- Kanj A, Abdallah N, Soubani AO. The spectrum of pulmonary aspergillosis. *Respir Med.* 2018;141:121-31. **10.1016/j.rmed.2018.06.029.**
- Kaur S, Singh S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2014;52(1):2-9. **10.3109/13693786.2013.819592.**
- Knoke M, Bernhardt H, Schwesinger G. Early description of a pulmonary aspergillosis 1847 from Greifswald. *Mycoses.* 2003;46(Suppl 1):37-41.
- Kocsubé S, Perrone G, Magistà D, Houbraken J, Varga J, Szigeti G, *et al.* *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Stud Mycol.* 2016;85:199-213. **10.1016/j.simyco.2016.11.006.**
- Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus* —what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *Plos Pathogens.* 2013;9(12):1-4.
- Lapham ME. Aspergillosis of the lungs and its association with tuberculosis. *JAMA.* 1926;87(13):1031-3.
- Lass-Flörl C, Perkhof S. *In vitro* susceptibility-testing in *Aspergillus* species. *Mycoses.* 2008;51:437-46.
- Lee JK, Lee YJ, Park SS, Park JS, Cho YJ, Park YS, *et al.* Clinical course and prognostic factors of pulmonary aspergilloma. *Respirol.* 2014 Jul 3. **10.1111/resp.12344.**
- Lopetegui CM, Menéndez GMM, Pérez YT, López ME, Castillo EMG. Aplicaciones de la aerobiología en el sistema de predicción y vigilancia de la enfermedad moho azul del tabaco en la provincia Pinar del Río, Cuba. *Avances.* 2006;8(4):1-11.
- Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(1):1-10.
- Magyar D, Vass M, Li D-W. Dispersal Strategies of Microfungi. En: Li D-W, editor. *Biology of Microfungi.* Switzerland: Springer International Publishing; 2016. p. 315-71.
- Malik A, Ali S, Shahid M, Bhargava R. Occupational exposure to *Aspergillus* and aflatoxins among food-grain workers in India. *Int J Occup Environ Health.* 2014;20(3):189-93. **10.1179/2049396714Y.0000000055.**
- McGinnis MR. Indoor mould development and dispersal. *Med Mycol.* 2007;45:1-9.
- Mello E, Posteraro B, Vella A, de Carolis E, Torelli R, D'Inzeo T, *et al.* Susceptibility testing of common and uncommon *Aspergillus* species against posaconazole and other mold-active

- antifungal azoles using the Sensititre method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):1-7. **10.1128/AAC.00168-17.**
- Monteil MA. Saharan dust clouds and human health in the English-speaking Caribbean: what we know and don't know. *Environ Geochem Health.* 2008;30:339-43.
 - Mulinge SK, Chesters CGC. Ecology of fungi associated with moist stored barley grain. *Ann Appl Biol.* 1970;65(2):277-84. doi:**10.1111/j.1744-7348.1970.tb04588.x.**
 - Mushi MF, Buname G, Bader O, Gross U, Mshana SE. *Aspergillus fumigatus* carrying TR34/L98H resistance allele causing complicated suppurative otitis media in Tanzania: Call for improved diagnosis of fungi in sub-Saharan Africa. *BMC Infect Dis.* 2016 Sep 2;16:464. **10.1186/s12879-016-1796-4.**
 - Negrín - Villavicencio JA, Rodríguez - Vázquez JC, Estévez - Torres GC, Estruch - Fajardo IM, Marrero - Martínez O. *Asma bronquial. Aspectos básicos para un tratamiento integral.* 2da ed. La Habana, Cuba: Ecimed; 2012.
 - Parker JE, Warrilow AGS, Price CL, Mullins JGL, Kelly DE, Kelly SL. Resistance to antifungals that target CYP51. *J Chem Biol.* 2014;7:143-61.
 - Pasqualotto AC. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention.* 1st ed. Pasqualotto AC, editor. London, England: Springer; 2010. 9-15 p.
 - Pasqualotto AC, Denning DW. New and emerging treatments for fungal infections. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(1):19-30. **10.1093/jac/dkm428.**
 - Patterson TF, Thompson III GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbercht R, *et al.* Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016:1-60. **10.1093/cid/ciw326.**
 - Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, *et al.* Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology.* 2017;10(2):296-322. **10.1111/1751-7915.12367.**
 - Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2571-81. **10.1128/JCM.00308-13.**

- Rajendran R. Adaptive resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus* biofilms [Tesis de Doctorado]. Glasgow, UK: University of Glasgow; 2013.
- Rénon L. Étude sur l'aspergillose chez les animaux et chez l'homme. Paris, France: Académie de Médecine; 1897. 322 p.
- Rietveld AG, Verweij PE, Melchers W, Leendertse PC, Hoftijser E, Zwaan BJ. Azole resistance selection in *Aspergillus fumigatus*. Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment, 2017.
- Rivero - Menendez O, Alastruey - Izquierdo A, Mellado E, Cuenca - Estrella M. Triazole resistance in *Aspergillus spp.*: a worldwide problem? J Fungi. 2016;2(21):1-20. **10.3390/jof2030021.**
- Rodríguez - Tudela JL, Arendrup MC, Arikan S, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, *et al.* Edef 9.1: Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para hongos filamentosos formadores de conidias. EUCAST. 2016:1-20.
- Rojas TI, Martínez E, Aira MJ, Almaguer M. Aeromicota de ambientes internos: comparación de métodos de muestreo. Bol Micol. 2008;23:67-73.
- Samson RA, Houbraeken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and indoor fungi. Utrecht, The Netherlands: CBS KNAW Fungal Biodiversity Center; 2010.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol. 2014;78:141-73. **10.1016/j.simyco.2014.07.004.**
- San Juan - Galán JL, Fernández - Andreu CM, Almaguer M, Perurena - Lancha MR, Martínez - Machín G, Velar - Martínez R, *et al.* Susceptibilidad in vitro de cepas cubanas de *Aspergillus* de origen clínico y ambiental. Biomédica. 2017a;37(4):452-9. **10.7705/biomedica.v34i2.3447.**
- San Juan - Galán JL, Fernández - Andreu CM, Martínez - Machín G, Perurena - Lancha MR, Velar - Martínez R, Illnait - Zaragoza MT. Emergencia en Cuba de especies de *Aspergillus* resistentes a antifungicos. BOLIPK. 2017b;27(13):97-104.
- Sanglard D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. Front Med. 2016;3(11):1-10. **10.3389/fmed.2016.00011.**

- Sanguinetti M, Posteraro B. Susceptibility testing of fungi to antifungal drugs. *J Fungi*. 2018;4(110):1-16. **10.3390/jof4030110**.
- Sewell TR, Zhang Y, Brackin AP, Shelton JMG, Rhodes J, Fisher MC. Elevated prevalence of azole resistant *Aspergillus fumigatus* in urban versus rural environments in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;AAC.00548-19. **10.1128/aac.00548-19**.
- Smith NL, Denning DW. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. *Eur Respir J*. 2011;37(4):865-72.
- Spiess B, Seifarth W, Merker N, Howard SJ, Reinwald M, Dietz A, *et al*. Development of novel PCR assays to detect azole resistance mediating mutations of the *Aspergillus fumigatus* *cyp51A* gene in primary clinical samples from neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3905-10. **10.1128/AAC.05902-11**.
- Steinmann J, Hamprecht A, Vehreschild MJGT, Cornely OA, Buchheidt D, Spiess B, *et al*. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:1522-6. **10.1093/jac/dku566**
- Sugar AM. The polyene macrolide antifungal drugs. En: Peterson PK, Verhoef J, editors. *Antimicrobial agents*. 1. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers; 1986. p. 229-44.
- Tracy MC, Okorie CUA, Foley EA, Moss RB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Fungi*. 2016;2(17):1-18. **10.3390/jof2020017**.
- Tsang CC, Tang JYM, Lau SKP, Woo PCY. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era: past, present and future. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:197-210. **10.1016/j.csbj.2018.05.003**.
- Tsitsopoulou A, Posso R, Vale L, Bebb S, Johnson E, White PL. Determination of the prevalence of triazole resistance in environmental *Aspergillus fumigatus* strains isolated in South Wales, UK. *Front Microbiol*. 2018;9(1395):1-8. **10.3389/fmicb.2018.01395**.
- Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, *et al*. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:e1-e38. **10.1016/j.cmi.2018.01.002**.

- van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2017 09/18/online;15:661. **10.1038/nrmicro.2017.90**.
- van der Linden JWM, Camps SMT, Kampinga GA, Arends JPA, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJA, *et al*. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis*. 2013;57(4):513-20.
- Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJG, Meis JF. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis*. 2016;62(3):362-8. **10.1093/cid/civ885**.
- Webster J, Weber R. *Introduction to Fungi*. 3rd ed. UK: Cambridge University Press; 2007. 297-314 p.
- Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(S1):1-4.
- Zhang J, Debets AJM, Verweij PE, Melchers WJG, Zwaan BJ, Schoustra SE. Asexual sporulation facilitates adaptation: the emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Evolution*. 2015:1-15. **10.1111/evo.12763**.
- Zhang J, Snelders E, Zwaan BJ, Schoustra SE, Meis JF, Van Dijck P, *et al*. A novel environmental azole resistance mutation in *Aspergillus fumigatus* and a possible role of sexual reproduction in its emergence. *mBio*. 2017a;8:1-14. **10.1128/mBio.00791-17**.
- Zhang J, van den Heuvel J, Debets AJM, Verweij PE, Melchers WJG, Zwaan BJ, *et al*. Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. *Proc R Soc B*. 2017b;284:1-9. **10.1098/rspb.2017.0635**.
- Ziogas BN, Malandrakis AA. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs). En: Ishii H, Hollomon DW, editors. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management*. Tokyo: Springer Japan; 2015. p. 199-216.
- Zulkifli NA, Zakaria L. Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. *HAYATI J Biosci*. 2017;24:26-34. **10.1016/j.hjb.2017.05.002**.

X. Anexos

Medios de cultivo y soluciones

- Agar malta con extracto de levadura (AME) (BioLife)
 - Dextrina; 2,5 g/L
 - Glicerol; 1,0 g/L
 - Peptocomplejo; 2,6 g/L
 - Agar; 17,0 g/L
 - Extracto de levadura; 5 g/L

Resuspender todos los componentes en 1 L de agua destilada. Autoclavear a 115°C por 15 minutos.

- Agar Czapek con extracto de levadura (ACE) (BioLife)
 - Sacarosa; 30,0 g/L
 - NaNO₃; 2,0 g/L
 - K₂H₃PO₄; 1,0 g/L
 - MgSO₄; 0,5 g/L
 - KCl; 0,5 g/L
 - FeSO₄; 0,01 g/L
 - Extracto de levadura; 5 g/L
 - Agar; 15,0 g/L

Resuspender todos los componentes en 1 L de agua destilada. Autoclavear a 121°C por 15 minutos.

- RPMI – 1640 agarizado (Sigma - Aldrich)
 - RPMI – 1640 (sin bicarbonato, con glutamina y rojo fenol); 10,4 g/L
 - Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico (MOPS); 34,5 g/L
 - Agar; 15,0 g/L
 - Glucosa; 20 g/L

Resuspender RPMI – 1640 en 400 mL de agua ultrapura. Añadir el MOPS y mezclar hasta que quede disuelto. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH al 1M. Completar a 500 mL con agua ultrapura. Esterilizar por filtración. Preparar 500 mL de agar (17 g) y glucosa (20 g) y autoclavar a 121°C por 15 minutos. Normalizar la temperatura del agar y del RPMI – 1640 a 50°C en un baño termostático. Mezclar de forma homogénea la solución de agar y el RPMI – 1640 y dispensar en placas de 90x15 mm. Todas las cantidades deben prepararse para un litro ya que este es el volumen final.

- Medio líquido de Sabouraud – dextrosa (BioCen)
 - Hidrolizado enzimático de caseína; 5,0 g/L
 - Peptona bacteriológica; 5,0 g/
 - Dextrosa; 20,0 g/L

Resuspender todos los componentes en 1 L de agua destilada. Autoclavear a 121°C por 15 minutos.

- Buffer para formación de esferoplastos
 - Sorbitol; 1,0 M
 - EDTA; 0,1 M
 - Liticasa; 1,5 mg/mL
 - Ditiotreitól; 0,05 M
 - pH 7,5

Para 40 mL: mezclar 7,3 g de sorbitol, 1,5 g de EDTA, 60 mg de liticasa en 39,7 mL de agua ultrapura. Añadir 0,3 mL de ditiotreitól. Conservar a -20°C en alícuotas.