



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OBTENCIÓN DE LOS PATRONES DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS DE HONGOS DEL GÉNERO *ASPERGILLUS SP.* UTILIZANDO EL MÉTODO COMERCIAL DE MICRODILUCIÓN EN PLACA SENSITITRE YEASTONE, EN MUESTRAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
LEONARDO BARUCH RIOS GARCÍA

MÉXICO D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz
VOCAL	Q.F.B. Gerardo García Camacho
SECRETARIO	Q.F.B. José Oscar González Moreno
SUPLENTE	Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez
SUPLENTE	Q.F.B. Marisol Gandarillas Ortíz de Montellano

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Instituto Nacional de Pediatría, Laboratorio de Parasitología y Micología, Servicio de Micología.

Director del tema: Q.F.B. Gerardo García Camacho

Asesor del tema: Q.F.B. José Oscar González Moreno

Sustentante: Leonardo Baruch Rios García

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Leonardo Rios Arellano: Por enseñarme a salir adelante a pesar de las dificultades.

Elizabeth García Camacho: Por tu amor, por tus cuidados y por consolarme en los momentos difíciles.

A ambos porque desde que nací me han guiado por el buen camino y siempre me han demostrado que con trabajo duro y entrega se pueden lograr grandes cosas.
Gracias por alentarme durante esta etapa de mi vida.

LOS AMO

A MIS ABUELOS:

José Luis García O. y Gloria Camacho B.: Porque siempre conté con su amor y apoyo para seguir adelante.

A la memoria de aquellos que se nos adelantaron en el camino pero aún siguen en nuestros corazones, a mis abuelos Leonardo Rios M. y Pilar Arellano C.

A MIS BISABUELOS:

Tiburcia Bastida "Buchita" y Hermenegildo Camacho (QEPD): Gracias por sus consejos y por demostrarme que el corazón no envejece.

A MIS HERMANOS:

Raziel Rios G. e Ian García C.: Por ser uno de los motores en mi vida que me impulsa a seguir adelante.

A MIS TIOS Y PRIMOS:

Porque todos me han enseñado que no hay pero que valga cuando se quiere alcanzar una meta.

A MIS AMIGOS:

Juan Manuel Licón, Francisco Licón, Toshiro Komiyama, Ken Komiyama, por brindarme su amistad y pasar ratos geniales a su lado.

AL Q.F.B. GERARDO GARCÍA Y A LA MÉDICO H.P. ANGÉLICA MONSIVÁIS:

Por su apoyo incondicional y por darme un ejemplo de superación.

A CLAUDIA ARELI TORRES G.

Jamás me olvidaría de ti mi princesa, gracias por estar conmigo apoyándome en los momentos buenos y malos, por ayudarme a crecer personal y profesionalmente, por todo tu cariño y comprensión, por alentarme durante todo este proyecto, con todo mi amor para ti mi cielo.

AGRADECIMIENTOS

AL LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA Y MICOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA:

Por brindarme las facilidades para llevar a cabo este proyecto.

A LA Q.F.B. MÓNICA MIRABAL GARCÍA:

Por su apoyo y enseñanzas a lo largo de este trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
Características de los hongos	3
Condiciones de crecimiento.....	4
Nutrición	4
Fenómenos reproductivos.....	5
Micosis	5
Micosis pulmonares	6
<i>Aspergillus sp.</i>	6
Morfología del Genero <i>Aspergillus</i>	8
Secciones de <i>Aspergillus</i>	9
Aspergilosis	11
Epidemiología de aspergilosis.....	12
Manifestaciones clínicas.....	14
Diagnóstico de aspergilosis	16
Examen directo	16
Medios de Cultivo	17
Métodos inmunológicos.....	17
Antígeno galactomanano	18
Deteccion de 1-3-β-D-glucano	19
Tratamiento.	20
Antifúngicos.....	21
Clasificación de los antifúngicos y agentes físicos.	22
Mecanismos de acción y parámetros farmacocinéticos de antifungicos.....	23
Resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos.....	24
Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i> a los antifúngicos.....	25
Métodos de dilución en caldo.	26
Método de difusión en disco.	26
Sensititre® YeastOne® (YO8).....	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28

OBJETIVOS	30
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos	30
MATERIALES Y MÉTODO.....	31
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
TÉCNICAS.....	33
<i>RESULTADOS</i>	40
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	60
CONCLUSIONES.....	70
<i>ANEXOS</i>	72
<i>REFERENCIAS</i>	75

INTRODUCCIÓN

Históricamente, las pruebas de sensibilidad de antifúngicos se llevan a cabo por varios métodos, los cuales se basan principalmente en dilución en caldo y difusión en agar o disco de difusión. Estos métodos producen resultados tan diversos como los métodos mismos. En 1982, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, en ese entonces el National Committee of Clinical Laboratory Standards, NCCLS) estableció un subcomité para revisar las pruebas de sensibilidad de antifúngicos. Sus resultados fueron documentados 3 años más tarde en el NCCLS M20-CR (reporte del comité) y afirmó que aproximadamente el 20% de los hospitales y los laboratorios de referencia, se dedican efectivamente a las pruebas de sensibilidad de los antifúngicos como parte de su programa de asistencia al paciente. Las pruebas predominantemente se trataban de variaciones del método de dilución en caldo y se limitó a hongos levaduriformes ^{1,2}.

Tras este informe, la Subcomisión determinó que era necesario desarrollar un método estándar para las pruebas de sensibilidad antifúngica. La meta del subcomité era desarrollar un método que fuera reproducible entre laboratorios en comparación con el desarrollo de un método que se correlaciona la concentración mínima inhibitoria (CMI) con el resultado del paciente. El subcomité reportó que el estándar debería ser basado en un método de dilución en caldo usando un medio sintético para las pruebas ^{1,2}.

La creciente incidencia y diversidad de las infecciones fúngicas oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, ha favorecido el mejor conocimiento de las micosis, y el desarrollo de nuevos antifúngicos que ofrezcan nuevas alternativas al tratamiento clásico de estas infecciones; al mismo tiempo, se ha evidenciado un interés creciente por las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos para levaduras y hongos filamentosos. La aparición de cepas resistentes es un factor que puede condicionar la terapéutica.

En el caso de las levaduras, se realizó un gran esfuerzo para el establecimiento de una técnica adecuada de referencia habiéndose aceptado por la gran mayoría de los investigadores el Documento M 27-A publicado en 1997; por el National Committee for Clinical Laboratories Standards de Estados Unidos de Norteamérica. Como complemento del método de sensibilidad para levaduras, en 1998 el CLSI publicó su propuesta metodológica para el estudio de sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos (documento M38-P) y en 2002 aprobó el método definitivo (documento M38-A). ^{1,10}.

Para lo anterior es necesario comprender que los hongos al proliferar asumen dos formas básicas que son la de levaduras y los mohos. Esta última forma ocurre por la producción de colonias filamentosas multicelulares integradas por túbulos cilíndricos ramificados llamados hifas, cuyo diámetro varía de 2 a 10 micrómetros. Se le da el nombre de micelio, a la masa de hifas entremezcladas acumulada durante la fase de crecimiento activo. Algunas hifas se dividen y forman células gracias a la intervención de estructuras cruzadas llamadas tabiques o septos, que de manera típica se forman a intervalos regulares durante la fase de hifas ^{3,4}.

Además de su proliferación vegetativa en la forma de levaduras o mohos, los hongos producen esporas o conidias para mejorar su supervivencia. Éstas pueden ser dispersadas fácilmente, son más resistentes a situaciones adversas y germinan cuando surgen circunstancias adecuadas para la proliferación ^{2,6}. En la actualidad hay una tendencia taxonómica que indica que cuando se usa la palabra o terminación espóra (del griego spora = semilla) sólo se refiere a una forma de reproducción sexuada, y conidio (llamada también conidia, por su traducción del inglés, término que proviene del griego koni = polvo o polvillo), si se trata de la anamórfica o asexuada. La fecha exacta de unificación de este término no se conoce, sin embargo algunos autores toman literalmente la palabra conidio, o conidia, como sinónimo de espóra ^{3,4}.

Aspergillus es un género de hongos filamentosos hialinos ubicuos, productores de enfermedades de distribución universal que ocasionalmente pueden aparecer en forma de brotes hospitalarios tras obras de remodelación. Se denomina aspergilosis a todos padecimientos causados por dicho género, el cual fue descrito por primera vez en 1729 por P.A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un “aspergillum” (instrumento usado para dispersar agua bendita) ^{3,5,6,7}.

Los hongos del género *Aspergillus* tienen una distribución universal y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, multiplicándose en el suelo, las plantas y la materia orgánica en descomposición. Estos hongos se encuentran habitualmente en el aire (tanto en ambientes abiertos como cerrados), agua, alimentos y polvo ^{3,8,7}.

Para los seres humanos los patógenos más frecuentes pertenecen a la sección *fumigati*, es el *Aspergillus fumigatus*, pero pueden causar enfermedad otros más como *A. flavus* de la sección *flavi*, *A. niger* de la sección *nigri*, *A. terreus* de la sección *terrei* y *A. lentulus* de la sección *fumigati*. El género en cuestión produce abundantemente conidios que pueden ser dispersados fácilmente en el aire (por aerosol) ^{3,4,7}.

La inhalación de conidias de *Aspergillus* es el modo más frecuente de adquisición de la enfermedad en humanos. Su periodo de incubación es desconocido y no muestra un carácter infectocontagioso. Representa la causa más frecuente de infección fúngica invasora en pacientes oncohematológicos, especialmente en aquellos afectados por leucemias agudas mieloides o sometidos a trasplantes de progenitores hematopoyéticos ^{7, 8, 9}.

MARCO TEÓRICO

Características de los hongos

Los hongos son organismos eucariontes con núcleos organizados, cuya membrana nuclear está bien definida; son aerobios, heterótrofos y en general no móviles (debido a la presencia de algunos hongos flagelados incluidos en *Chytridiomycota* y *Oomycota* como *Pythium insidiosum*). Se reproducen por conidias. Tienen dos tipos de células fúngicas: las somáticas que incluyen núcleos pequeños cuyos proceso de división es por mitosis ordinaria y las reproductoras, que contienen núcleos mucho más grandes, de la cual su división celular es por meiosis, observándose incluso husos cromáticos y placas metafásicas no muy diferentes a las que se presentan en las células filogenéticamente más evolucionadas ^{3, 4, 6}.

Al igual que otros eucariontes, las células fúngicas poseen mitocondrias y sistema endomembranoso (retículo endoplásmico y aparato de Golgi), dictiosomas o cuerpos cisternales, los cuales derivan a microvesículas y macrovesículas. La membrana celular basal está bien organizada y contiene gran cantidad de esteroides, en especial ergosterol, sustancia de la que depende el mecanismo de acción de algunos fungistáticos como los polienos y azoles, que bloquean la formación de éstos, y por lo tanto, dejan la membrana defectuosa ^{3, 6}.

La pared celular es una de sus estructuras características, básicamente formada por quitina (N-acetilglucosamina), celulosa, glucanas, mananas y algunos glicopeptidos; estos compuestos dan rigidez a la pared celular y son de importancia en la taxonomía y propiedades antigénicas ^{3, 6}.

Condiciones de crecimiento

Existen circunstancias óptimas para cada especie; la mayoría de los hongos crecen entre los 0 y los 55°C, teniendo por lo general un rango de temperatura ideal entre 20°C y 30°C, así tenemos los siguientes tipos ^{3,7}:

- Psicrófilos: se desarrollan entre 0 a 20°C. Temperatura óptima alrededor de 15 y 17°C.
- Mesófilos: con amplio rango de crecimiento: 0 a 50°C. Teniendo como rango óptimo entre 15 y 40°C.
- Termófilos: su rango de crecimiento es entre 20 a 50°C.

Los hongos oportunistas y patógenos que afectan al ser humano por lo general crecen entre 35 y 40°C por lo que están dentro del grupo de los mesófilos y termófilos ^{3,7}.

A diferencia de las bacterias los hongos son acidófilos, crecen mejor entre pH de 5.6 a 6.8. La luz no es vital, sin embargo, para muchas especies ésta juega un papel importante en la esporulación, en especial cuando hay cambios alternados de luz-oscuridad ^{3,7}.

Nutrición

Los hongos no poseen cloroplastos, por lo tanto no son fotosintéticos; su nutrición siempre es por absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas, se realiza de dos maneras: como saprófitos o saprobios cuando se toman nutrientes de materias orgánicas muertas o en descomposición, y la segunda como parásitos cuando se nutren de materia viva, incluso hay algunos que llegan a ser parásitos facultativos u obligados; por esta propiedad los hongos son heterótrofos, debido a que no pueden manufacturar sus propios nutrientes. Para su crecimiento necesitan carbohidratos como fuente de carbono, sobre todo glucosa, sacarosa y maltosa, nitrógenos (proteínas o sales de nitrógeno) y H₂O; precisan también de los iones inorgánicos más comunes. Pueden sintetizar las vitaminas necesarias para su crecimiento y reproducción, pero hay especies que llegan a ser deficientes en éstas y requieren tomarlas del medio externo, siendo las principales tiamina y biotina. Tiene la capacidad para almacenar ácidos grasos, acil-gliceroles y glucógeno en vacuolas ^{3,7}.

Fenómenos reproductivos

Los hongos se reproducen en forma asexual por mitosis o sexual por medio de la conjugación de dos células diferenciadas o no, y mediante tres fenómenos reproductivos que son ^{3, 6, 7}:

- Plasmogamia: mediante la unión de dos protoplasmas.
- Cariogamia: por la fusión de dos núcleos.
- Meiosis: división celular que dan origen a células haploides; en algunos casos el proceso es seguido de una o más divisiones mitóticas.

Micosis

Las micosis son las infecciones producidas por hongos. Muchos de estos organismos patógenos son exógenos y su hábitat natural se sitúa en el agua, la tierra y los restos orgánicos. Las micosis que aparecen con la máxima incidencia, como son la candidosis y las dermatofitosis, son causadas por hongos que forman parte de la biota normal o que están muy adaptados a sobrevivir en el hospedador humano. Por comodidad es posible clasificar las micosis en superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas o generalizadas y por oportunistas. El agrupamiento de las micosis en las categorías mencionadas muestra su puerta corriente de entrada en el sitio inicial de ataque. Sin embargo, surgen enormes traslapes o puntos comunes, porque las micosis generalizadas muestran manifestaciones subcutáneas y viceversa. Muchos sujetos que terminan por mostrar infecciones por oportunistas tienen graves enfermedades primarias y disminución de sus defensas inmunitarias; sin embargo, las micosis sistémicas primarias también aparecen en tales enfermos y los organismos oportunistas también pueden infectar a sujetos inmunocompetentes. Durante la infección, muchos pacientes terminan por mostrar intensas respuestas inmunitarias de tipo celular y humoral a los antígenos de los hongos ^{3, 4, 6}.

La mayoría de los hongos exógenos penetra por vía aérea o cutánea. Algunos son cosmopolitas y otros están delimitados a zonas endémicas (*Histoplasma*, *Coccidioides immitis*). Hay cierta afinidad de los hongos por tejidos u órganos, por ejemplo, los dermatofitos por la queratina; *Cryptococcus neoformans* por tejido nervioso, e *Histoplasma* por componentes del sistema reticuloendotelial. Las personas sanas tienen inmunidad natural a las infecciones micóticas. Esta resistencia es inespecífica y depende de factores genéticos, hormonales, nutricionales, así como de la edad y el género; los cilios nasales, la piel y las mucosas también son barreras mecánicas, así como las secreciones, como el

sebo y el sudor que tienen actividad fungicida. Los microorganismos que penetran estas barreras desencadenan una respuesta inflamatoria y la fagocitosis. Los hongos actúan como antígenos y estimulan la producción de anticuerpos, células T y citocinas; favorecen la permeabilidad capilar, y tienen efecto citotóxico. Como no hay correlación entre las concentraciones de anticuerpos y el grado de protección, se cree que esta última depende de la inmunidad celular ^{3, 4, 6}.

Micosis pulmonares

En los últimos años se ha observado un aumento progresivo en la frecuencia de las infecciones pulmonares por hongos. Gran parte de este incremento se debe al mayor número de pacientes que sufren inmunodepresiones graves. Sin embargo, el empleo cada vez más extendido de los glucocorticoesteroides y de otros fármacos inmunodepresores, utilizados para tratar muy diversas enfermedades crónicas, ha hecho que el número de casos de infecciones pulmonares fúngicas en los pacientes inmunocomprometidos o en los individuos con una inmunodepresión de bajo grado también crezca día a día ^{9, 11, 12}.

Existen más de 100.000 especies de hongos ampliamente repartidos por el mundo, pero sólo una veintena son agentes habituales de infecciones respiratorias en el humano ¹¹⁻¹³.

Con excepción de *Candida albicans*, levadura endógena, el resto de los hongos son de procedencia exógena. La mayoría son saprofitos e inofensivos, pero pueden volverse patógenos cuando se presentan condiciones favorables en el organismo hospedero, son los hongos oportunistas. *Aspergillus* sólo origina un 1,1% de las infecciones fúngicas ^{11, 12, 14}.

Aspergillus sp

Aspergillus sp es un género de hongos de los cuales se conocen 175 especies ^{3,13} que están distribuidos ampliamente en la naturaleza y se encuentra comúnmente como saprofito en el suelo, plantas y materia orgánica en descomposición ^{7, 9, 11, 12}.

En general las conidias miden entre 2 - 8 μm de diámetro y son capaces de alcanzar las vías aéreas y alveolos donde pueden crecer a temperatura del cuerpo humano ^{11, 12, 15}.

En medios de cultivo las colonias son de crecimiento rápido, polvosas, blancas, verdes, amarillentas, café o negras. Los conidióforos son erectos y sin ramificar con una vesícula apical y sin septos en la base. Las fialides tienen forma de matraz o botella, se clasifican en dos tipos, las que crecen directamente de la vesícula (uniseriadas) y aquellas que crecen de una métula (biseriadas). De las fialides crecen las conidias las cuales, por su arreglo pueden formar columnas (columnares) o tener un crecimiento divergente (radiales) ^{13, 15}.

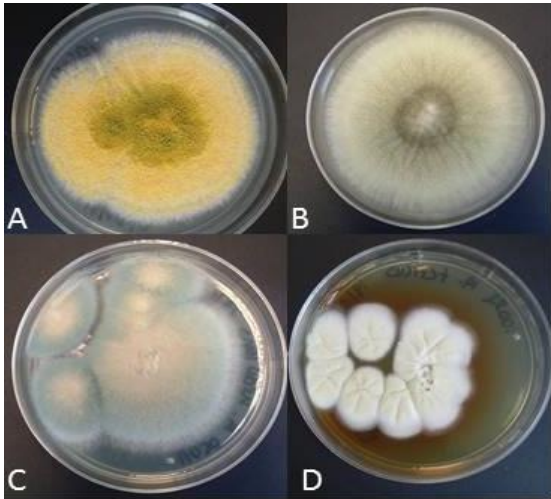


Imagen 1: Colonias de *Aspergillus sp* en Agar Sabouraud Dextrosa. A) Sección Flavi, *A. flavus*. B) Sección Nigri *A. niger*. C) Sección Fumigati, *A. fumigatus*. D) Sección Terrei *A. terreus*.

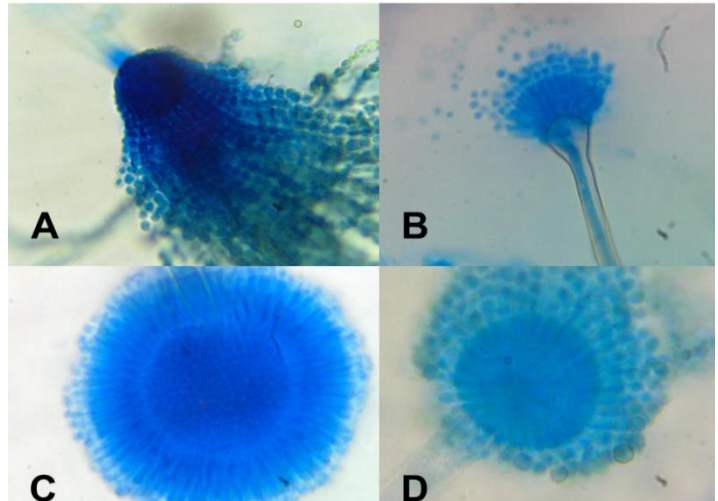


Imagen 2: Morfología microscópica de *Aspergillus Sp*. A y B) *A. fumigatus*, *A. nidulans*, arreglo columnar. C y D) *A. niger*, *A. Flavus* arreglo radial.

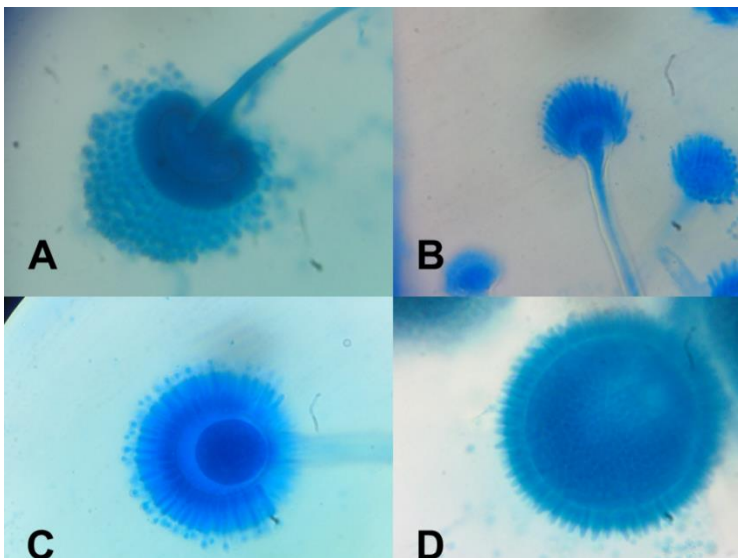
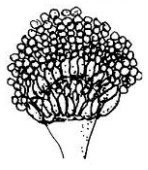



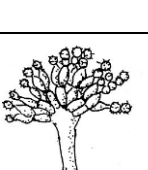
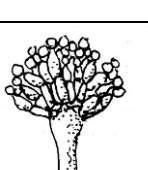





Imagen 3: Morfología microscópica de *Aspergillus Sp*. A) *A. fumigatus*, uniseriado columnar. B) *A. terreus*, biseriado columnar. C) *A. glaucus*, biseriado radial. D) *A. niger*, biseriado radial.

Morfología del Genero *Aspergillus*.

Cuadro 1. Características diferenciales de las especies de *Aspergillus* más comunes ¹⁵

Sección Especie	Patogenicidad	Morfología macroscópica	Morfología microscópica de los conidióforos	Tamaño y forma de las conidias	Morfología microscópica de las fialides	Ilustración de la morfología microscópica
Fumigati <i>A. fumigatus</i>	Causante más común de la aspergilosis invasiva diseminada; Agente frecuente de sinusitis.	Aterciopelada o polvosa; al principio blanca, después se torna de verde a gris. El reverso va de blanco a marrón.	Cortos(<300µm) Lisos	Redondas y lisas de 2 – 3.5 µm de diámetro	Uniseriado; usualmente en las dos terceras partes superiores de la vesícula, paralelo al eje del conidióforo.	
Nigri <i>A. niger</i>	Más común en infecciones de oído; frecuentemente como aspergiloma; raramente diseminado.	Algodonosa. Al principio blanco a amarillo después cambia a negro. El reverso va de blanco a amarillo.	Largos(400-3000µm) Lisos	Redondas y ásperas de 3.5 – 4.5 µm de diámetro	Biseriado; cubre la totalidad de la vesícula, cabeza en forma "radiada".	
Flavii <i>A. flavus</i>	Involucrado en infecciones pulmonares, sistémicas, sinusales, óticas, entre otras; produce aflatoxinas.	Aterciopelada; de amarillo a verde, o café. El reverso ligeramente dorado a café-rojizo.	Medianos(400-800µm) Ásperos, espinoso.	Redondas y lisas de 3 – 6 µm de diámetro	Uni y Biseriado; cubre totalmente la vesícula; señalan en todas direcciones.	
Versicolores <i>A. versicolor</i>	Solo ocasionalmente involucrado en infecciones pulmonares y otras infecciones.	Aterciopelada; al principio blanco, luego amarillo, anaranjado, marrón, verde, ocasionalmente rosáceo. Al reverso blanco, puede ser amarillo, naranja o rojo	Medianos(200-500 µm) Lisos	Redondas y rugosas de 2 – 3.5 µm de diámetro	Biseriado; holgadamente radiado; cubre casi toda la vesícula. (puede presentar células de Hülle)	
Usti <i>A. calidostus</i>	Ocasionalmente causa infecciones en varios sitios del cuerpo.	Aterciopelada; café o gris-oliva. Al reverso café-amarillo.	Cortos (130- 300 µm) Lisos; cafés cuando maduran.	Redondas y rugosas de 3 – 4 µm de diámetro	Biseriado; cubre holgadamente de la mitad superior hasta tres cuartas partes de la vesícula.	
Nidulantes <i>A. nidulans</i>	Puede causar infecciones en varios sitios; se ha observado en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.	Aterciopelada; generalmente verde pero puede cambiar a amarillo donde los cleistotecios se forman. El reverso marrón o rojo-púrpura.	Cortos(<250µm) Lisos; cafés.	Redondas y lisas o semirugosas de 3 – 4 µm de diámetro	Biseriado; corto; columnar; cleistotecios comúnmente presentes con ascosporas rojas; las células de Hülle son a menudo abundantes.	

Aspergillus <i>A. glaucus</i>	Raramente involucrado en enfermedades de las uñas, óticas y sistémicas.	Polvosa; verde con áreas amarillas. El reverso es amarillo. (Osmofílico, crecimiento mejorado con un 20% de sacarosa en el medio)	Medianos (300-700 μ m) Lisos	Redondas y rugosas de 5 – 8 μ m de diámetro	Uniseriado; radiado hasta casi columnar; cubre toda la vesícula (cleistotecios generalmente presentes)	
Terrei <i>A. terreus</i>	Involucrado en infecciones en una amplia variedad de sitios en el cuerpo.	En general aterciopelada. Color canela-café. Al reverso amarillo a café.	Cortos (<300 μ m) Lisos	Redondas y lisas de 2 – 2.5 μ m de diámetro	Biseriado; compactamente columnar .	
Clavati <i>A. clavatus</i>	Comúnmente relacionado con la aspergilosis alérgica; raramente involucrado en infecciones en el cuerpo.	Aterciopeladas; verdes. AL reverso blanco o marrón.	Largos (500 -2000 μ m) Lisos	Ovaladas y lisas de 2.5 – 4 X 3 – 6 μ m	Uniseriado: vesícula o clava (aprox. 200X40 μ m) completamente cubierta	

Secciones de *Aspergillus*

La clasificación de los *Aspergillus* ha sido basada tradicionalmente en la caracterización morfológica. Las características que definen a *Aspergillus* son la estructura de soporte de las conidias, el tamaño y arreglo de las cabezas conidiales, el color de las conidias y la velocidad y condiciones físicas (humedad y temperatura) de crecimiento en agar. Basados en estas características se dividió al género *Aspergillus* en 18 grupos, pero más recientemente estudios filogenéticos han clasificado a los *Aspergillus* en 4 subgéneros y 19 secciones ^{16, 17}.

Las especies de mayor interés clínico son: *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. ustus* ^{16, 17}.

Cuadro 2. Principales Secciones del género *Aspergillus* que agrupan especies de interés clínico ⁸.

Secciones	Especies de interés clínico
Fumigati	<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus lentulus</i> <i>Aspergillus fumisynnematus</i> <i>Aspergillus viridintans</i> <i>Neosartorya hiratsukae</i> <i>Neosartorya udagawae</i> <i>Neosartorya fischeri</i> <i>Neosartorya pseudofischeri</i> <i>Neosartorya fennelliae</i> <i>Neosartorya spinosa</i> <i>Neosartorya coreana</i>
Nidulantes	<i>Emericella nidulans</i> <i>Emericella quadrilineata</i>
Usti	<i>Aspergillus calidostus</i>
Terrei	<i>Aspergillus terreus</i>
Flavi	<i>Aspergillus alliaceus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parviticus</i>
Nigri	<i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus foeticus</i> <i>Aspergillus japonicus</i> <i>Aspergillus niger</i>

Dentro de la sección *Fumigati*, a la que pertenece la especie más importante del género, *A. fumigatus*, se han producido importantes cambios, tales como la reciente publicación de *Neosartorya fumigata* como estado sexual de *A. fumigatus* ^{17,19}.

Aspergillus lentulus es otra especie reciente de la misma sección, también morfológicamente parecida a *A. fumigatus*, de la que se puede distinguir básicamente por su lenta esporulación en cultivo y por presentar un patrón de resistencia a los antifúngicos diferente, siendo *A. lentulus* más resistente *in vitro* a la anfotericina B. *A. terreus* (sección *Terrei*) es otro complejo de especies de creciente interés clínico y que presenta también una sensibilidad disminuida a la anfotericina B ^{17,18}.

En 2011 el International Botanical Congress Nomenclature Section estableció el principio de "un hongo: un nombre" ^{52, 53}, por lo cual fue necesario considerar nuevas reglas de nomenclatura para el género *Aspergillus* y en abril de 2012 el International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus* (ICPA) propuso 3 opciones ^{17,19}.

Una opción es dividir *Aspergillus* en varios clados y utilizar el nombre del género más antiguo asociado con los géneros resultantes, como *Neosartorya*, *Emericella*, *Petromyces*, etc. La segunda opción se desprende de la primera opción para dividir *Aspergillus* en varios géneros con diferentes nombres (teleomorfos), y conservar *Aspergillus* para algunas secciones, por ejemplo, el nombre *Aspergillus* podría usarse cuando se trate de *A. niger*, *A. flavus* y *A. oryzae*, mientras que para las secciones Versicolores, Fumigati y *Aspergillus* las cuales presentan estados sexuales, tendría que usarse *Emericella*, *Neosartorya* y *Eurotium*, (*Emericella* para *E. nidulans* y *A. versicolor*, *Neosartorya* para *A. fumigatus* y *A. clavatus*, y *Eurotium* para *E. herbariorum* y *A. penicillioides*) ^{17,19}.

La tercera opción y la cual fue elegida por el ICPA el 11 de abril de 2012 era la de mantener el nombre *Aspergillus* y utilizar otros nombres para indicar estructuras de interés biológico por ejemplo *A. glaucus* con ascomas tipo *Eurotium* o *A. fischeri* (cuerpos fructíferos tipo *Neosartorya*). La consecuencia de esta elección es que la mayoría de los nombres de *Aspergillus*, incluyendo sus teleomorfos mantendrán su nombre *Aspergillus*, contribuyendo a la estabilidad de nomenclatura ^{17,19}.

Aspergilosis

Las especies de *Aspergillus* son típicamente oportunistas, las infecciones clínicas son causadas por cuatro de las secciones de *Aspergillus*, dentro de la sección *Fumigati*, *Aspergillus fumigatus* es responsable de un 80-85% de las mismas ^{9, 11, 12, 20, 21}. *Aspergillus flavus* de la sección *Flavi*, *Aspergillus niger* de la sección *Nigri* y *Aspergillus terreus* de la sección *Terrei* también son patógenos pero es poco frecuente encontrarlos en el ambiente y aún menos frecuente causando infecciones ^{9, 12}, especies como *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus nivosus* y *Aspergillus nidulans*, este último de la sección *Nidulantes*, también se han asociado a patología humana ^{11, 12}.

Dependiendo del estado inmunológico del paciente la germinación de las conidias puede ocurrir, seguido del crecimiento de las hifas y la enfermedad puede desarrollarse. El factor de riesgo históricamente más importante para la aspergilosis ha sido la neutropenia ^{4, 20, 30}. Sin embargo existen otros que se dan en pacientes no neutropénicos como son la Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC) y la fibrosis quística (FQ). También se relaciona a los trasplantes hematopoyéticos y a los pacientes con leucemia aguda con infecciones por *Aspergillus* ²⁴⁻²⁶.

Existen además factores ambientales como lo son la mala calidad del aire y las construcciones cercanas a los pacientes susceptibles ^{22, 23}.

La FQ es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva, caracterizada por disfunción de las glándulas de secreción exocrina.

Las primeras descripciones de la fibrosis quística fueron realizadas por Fanconi, en 1936, y por Andersen, en 1938. Recién en la década de 1980 se descubrió que el defecto fundamental se debe a la falla en la secreción celular de cloro. En 1985, el gen responsable del defecto fue localizado en el cromosoma 7; en 1989, se logró su aislamiento y caracterización y, a partir de ese momento, se comenzó a comprender la estructura y función de la proteína codificada por este gen, denominada Reguladora de Conductancia de Transmembrana de Fibrosis Quística (CFTR, por su sigla en inglés), un canal activado por AMP cíclico que conduce el cloro a través de las membranas de las células epiteliales y regula otros canales³³. Las conidias de *Aspergillus* en pacientes con fibrosis quística contribuyen al deterioro de la depuración mucociliar, la alteración en la acción de las proteínas fungicidas y del revestimiento de las vías respiratorias, así como de la inhibición de la fagocitosis y la capacidad para matar de las células fagocíticas.

Aunado al daño epitelial, también existe una fuerte reacción del sistema inmune lo cual provoca una inflamación del tejido ^{12, 27}.

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una inmunodeficiencia primaria que afecta la liberación de radicales libres las células fagocíticas. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por infecciones recurrentes y/o severas e inflamación crónica con formación de abscesos y granulomas desde muy temprana edad. En el mundo se calcula la frecuencia de EGC en aproximadamente 1/250.000 individuos. Los pacientes con EGC son susceptibles a padecer infecciones recurrentes, particularmente aquellas causadas por bacterias catalasa positivas y hongos ^{28, 29}.

Epidemiología de aspergilosis

Las especies del género *Aspergillus* son una de las principales causas de las enfermedades fúngicas invasoras en los enfermos más inmunodeprimidos, particularmente en los receptores de trasplantes de progenitores hematopoyéticos y de órgano sólido, ocasionando elevadas tasas de mortalidad entre los afectados^{37, 38}. Las formas de cómo se presentan clínicamente de las especies de *Aspergillus* son variadas, por ejemplo la sección Flavi produce un importante número de infecciones otorrinolaringológicas, con claro tropismo por senos paranasales, mientras que la sección Nidulantes es protagonista común en los pacientes diagnosticados con enfermedad granulomatosa crónica, por su parte la sección Terrei aunque siguen siendo causantes infrecuentes de aspergilosis, se ha asociado con grandes tasas de mortalidad debido a la falta de sensibilidad frente anfotericina B ^{20, 21}.

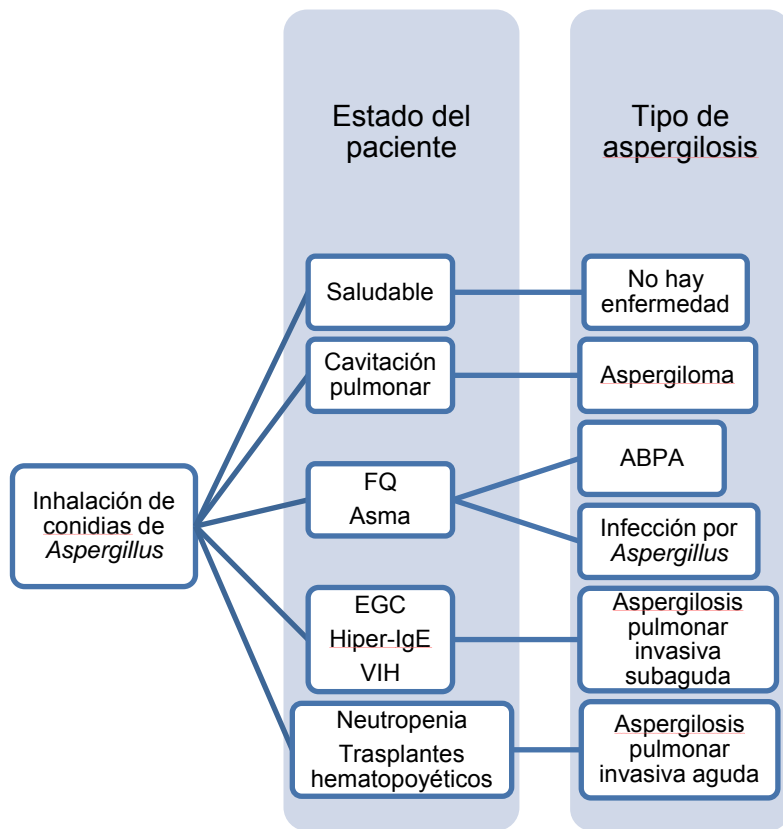


Figura1. Síndromes clínicos de la aspergilosis pulmonar relacionados con la condición y estado inmune del paciente. FQ: fibrosis quística; EGC: enfermedad granulomatosa crónica; VIH: virus de inmunodeficiencia humana; ABPA: aspergilosis broncopulmonar alérgica ²⁴.

Cuadro 3. Factores condicionantes y poblaciones de riesgo para desarrollar aspergilosis invasiva²⁰.

Factores de riesgo.

- Neutropenia.
- Déficits de función fagocitaria.
- Alteraciones de la inmunidad celular.
- Uso de corticoesteroides y otros inmunosupresores.
- Rotura de barreras mucocutáneas
- Exposición ambiental

Población de riesgo

- Neutropénico (≤ 500 neutrófilos/ μL por ≥ 10 días): LMA/SMD o alo-THP.
- Pacientes con EICH en tratamiento inmunosupresor.
- Receptor de órgano sólido: pulmón>corazón>intestino>hígado>riñón.
- Infección por VIH-SIDA son tratamiento antirretroviral con $\text{CD4} < 100$ células/ μL .
- Enfermedad granulomatosa crónica.
- Uso de terapias biológicas, principalmente anti-CD52 (alemtuzumab), Anti-TNF- α (infiximab>adalimumab>etanercept).
- Paciente crítico no hematológico.
- EPOC en tratamiento corticoideo crónico.
- Cirrosis hepática, enfermedad hepática avanzada.
- Post cirugía mayor y/o compleja

alo-THP: trasplante alógeno de progenitores hematopoyéticos; EICH: enfermedad del injerto contra el huésped; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; LMA: leucemia mieloide aguda; SMD: síndrome mielodisplásico; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Manifestaciones clínicas

Formas clásicas

Aspergillus sp. puede producir cuadros clínicos pulmonares muy diferentes, que van desde el asma bronquial hasta las infecciones invasivas, que son de extrema gravedad y cursan con diseminaciones hematógenas ^{8,9}.

La forma más frecuente de presentación en los pacientes en tratamiento por enfermedades oncohematológicas es la aspergilosis pulmonar invasora aguda que se manifiesta como una neumonía necrotizante (focal o difusa), generalmente muy sintomática (hemoptisis y disnea) durante el período de recuperación de la neutropenia (síndrome de la inmunorreconstitución) pero precedida de una fase de escasa expresividad clínica y radiológica (tos productiva, dolor torácico y fiebre que no responde a los antimicrobianos) ^{8,9}.

Forma “infrecuente”

La traqueobronquitis por *Aspergillus*, infección habitualmente descrita en pacientes sometidos a trasplante pulmonar y en SIDA, también ha sido reconocida en enfermos sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos. Es una forma rara de aspergilosis invasora a la que se le infiere una alta mortalidad. Se caracteriza por hallazgos muy característicos en la observación broncoscópica como ulceraciones de la mucosa bronquial, tapones mucosos y pseudomembranas que pueden ocluir las luces bronquiales y abocar a los pacientes a la insuficiencia respiratoria ^{8, 11, 30}.

Formas de alergia

En algunas personas atópicas la aparición de anticuerpos de tipo IgE contra los antígenos superficiales de los conidios de *Aspergillus* desencadena inmediatamente una reacción asmática en la nueva exposición. En otros, los conidios germinarán y las hifas colonizan el árbol bronquial sin invadir el parénquima pulmonar, fenómeno que es característico de la aspergilosis broncopulmonar alérgica ^{4, 14, 30}.

La ABPA se ha visto en el 1-25% de pacientes asmáticos y en pacientes con fibrosis quística tiene una prevalencia del 6-25%. En Norteamérica las estadísticas indican la presencia de la ABPA en el 7-14% de los pacientes asmáticos dependientes de corticoesteroides y en el 7% de aquellos con fibrosis quística ^{12, 14, 30}.

Dentro de la sección *Fumigati*, se ha observado que *Aspergillus fumigatus* libera sustancias que *in-vitro* han demostrado causar el desprendimiento de células epiteliales y que disparan la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como la interleucina IL-8 y, IL6 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 por sus siglas en inglés). En adición, algunas toxinas fúngicas inhiben el movimiento ciliar, las proteasas son probablemente responsables de la disminución de la actividad fagocítica y las elastasas y colagenasas secretadas por el hongo son factores que aumentan y perpetúan el daño a las vías aéreas ^{12, 14, 30}.

Aspergiloma y colonización extrapulmonar

Es la manifestación más común (50%), también conocida como “bola fúngica”, está compuesto por masas de micelios, células inflamatorias, fibrina, moco y restos tisulares en el interior de una cavidad pulmonar preexistente ^{8, 9, 11}.

Surge un aspergiloma cuando los conidios inhalados penetran en alguna cavidad existente, y en ella germinan y producen abundantes hifas en ese espacio pulmonar anormal. Están en peligro los enfermos que tenían ya alguna enfermedad cavitaria (como tuberculosis, sarcoidosis o efisema). Algunos enfermos son asintomáticos en tanto otros terminan por mostrar tos, disnea, adelgazamiento, fatiga y hemoptisis ^{4, 9, 11}.

Las infecciones localizadas no invasoras (colonización) por especies de *Aspergillus* pueden afectar los senos paranasales, el conducto auditivo, la córnea o las uñas ^{3, 4, 11}.

Aspergilosis invasora

Es en la actualidad la amenaza más grave para los pacientes inmunodeprimidos, particularmente para los receptores de un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. En ellos esta forma de aspergilosis se observa en un 10% a un 15% de los enfermos ^{8, 9, 31}.

Después de que los conidios son inhalados y germinan aparece enfermedad invasora en la forma de un cuadro neumónico agudo con diseminación. Los sujetos en peligro son los que tienen leucemia linfocítica o mielógena y linfoma, quienes han recibido trasplante de blastos, y en particular, los individuos sometidos a corticoterapia ^{4, 9, 11}.

Diagnóstico de aspergilosis

Las enfermedades fúngicas invasoras (EFI) tienen elevados porcentajes de mortalidad, ya que son complicaciones que aparecen en pacientes con mal estado general por su enfermedad de base y porque suelen detectarse cuando ya han causado lesiones macroscópicas extensas y cuadros invasores, por lo que es muy difícil que respondan al tratamiento antifúngico ^{32, 33}.

Por ello, la estrategia terapéutica más aceptada es pautar tratamiento profiláctico en pacientes con riesgo de EFI e iniciar terapia empírica cuando aparecen signos clínicos compatibles con infección, como neutropenia febril prolongada o signos de sepsis en enfermos críticos. Sin embargo, esta estrategia siempre ha tenido muchos detractores, ya que conlleva un uso inadecuado y excesivo de antifúngicos, lo que se relaciona con la aparición de efectos tóxicos, el desarrollo de resistencias y un gasto farmacéutico elevado ^{32, 33}.

La detección precoz de la aspergilosis ha sido siempre una de las principales demandas diagnósticas. Por ello, se han desarrollado técnicas alternativas que se emplean rutinariamente en la actualidad ^{32, 33}.

Examen directo

Una de las técnicas más empleadas para la detección de aspergilosis se trata del diagnóstico microbiológico convencional, el cual consiste en el examen microscópico de la muestra y el cultivo de la misma en agar, sin embargo éstas tienen una baja sensibilidad ya que el examen microscópico sólo puede discernir entre levaduras y hongos filamentosos, y el cultivo puede crecer lentamente lo que retrasaría el diagnóstico ^{32, 33}. El examen directo para búsqueda de estructuras fúngicas se realiza colocando una porción de la muestra del paciente en un portaobjetos, en el cual se tiene una gota de Hidróxido de Potasio al 10 o 20%, el cual sirve para aclarar las estructuras presentes, posteriormente se coloca un cubreobjetos sobre la muestra y se pasa por la flama para acelerar el aclaramiento ^{4, 6}.

En un examen directo de una muestra que contenga algún hongo filamentoso únicamente se observaran las hifas del mismo y no así las estructuras de reproducción. En el caso de hongos levaduriformes se podrán observar las levaduras, blastoconidas y en algunos casos pseudofilamentos ^{4, 6}.

Medios de Cultivo

Los medios de cultivo se dividen en 3 grupos: naturales, semisintéticos y sintéticos. Los naturales están elaborados con leche, huevo, granos de cereales levadura de cerveza, frutas y otros compuestos. Los semisintéticos como el Sabouraud aportan una fuente de carbono y nitrógeno. Los sintéticos tienen una composición química bien definida y se usan en investigación; no son de uso diagnóstico ^{6, 15}.

Aspergillus como otros hongos oportunistas no son nutricionalmente exigentes y pueden ser aislados en cualquier medio de cultivo micológico estándar^{6, 15}.

El medio más común para hacerlo es el Agar Sabouraud Dextrosa sin antibiótico, aunque ocasionalmente se recomiendan medios que favorecen el desarrollo de ciertas estructuras para la identificación del hongo, tal es el caso del Agar Papa Dextrosa el cual es utilizado para que el hongo comience a producir conidias y genere pigmentos ^{6, 15}.

Métodos inmunológicos

También es muy importante evaluar con detenimiento la presencia de *Aspergillus* u otros hongos en cultivos, ya que los hongos miceliales son contaminantes habituales de laboratorio y forman parte de la microbiota saprófita del ser humano, lo que disminuye la especificidad de los cultivos ^{32, 33}.

No obstante, antes de descartar un hongo como contaminante o microbiota saprófita se debería tomar en consideración si el enfermo tiene factores de riesgo de micosis y si se han cultivado en al menos dos de tres muestras del paciente ^{32, 33}.

Por ellos se han desarrollado nuevas técnicas para la detección precoz de la aspergillosis, siendo una de ellas la detección de galactomanano, el cual es un componente de la pared celular de *Aspergillus spp.*, aunque está presente en otras especies fúngicas en pequeñas cantidades. La detección de galactomanano se ha comercializado mediante un test de ELISA ^{32, 33}.

Antígeno galactomanano

La cuantificación de galactomanano como técnica de diagnóstico precoz se considera un método de cribado. Por eso, se deben realizar determinaciones seriadas en suero en enfermos con riesgo de infección. Se aconsejan dos a la semana, ya que así se incrementan su sensibilidad y su valor predictivo negativo. La sensibilidad de la técnica supera el 90%, con un valor predictivo positivo del 95% ³²⁻³⁴.

Cuadro 4. Indicaciones y limitaciones diagnósticas de la detección de galactomanano ³⁴

Indicación y grado de evidencia.	<p>Diagnóstico temprano de la aspergilosis invasora:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Enfermos oncohematológicos: AI/All. 2. Otros pacientes con inmunodeficiencia: BII. 3. Pacientes críticos o sin inmunodeficiencias: BII.
Método y sugerencia de uso.	<ul style="list-style-type: none"> • ELISA Sándwich con el anticuerpo monoclonal EBA-2 (platelia <i>Aspergillus</i> EIA, Bio-Rad Laboratories. Francia. • La detección de GM en suero debe realizarse cada 3 o 4 días: en lavado broncoalveolar y líquido cefalorraquídeo, cuando estén disponibles estas muestras clínicas.
Valor diagnóstico y puntos de corte.	<ul style="list-style-type: none"> • Criterio micológico de aspergilosis invasora probable en las definiciones del consenso de EORTC/MSG. • Su detección antecede a otras pruebas diagnósticas de laboratorio. • La combinación con técnicas de diagnóstico de imagen de alta resolución aumenta su utilidad. • Índice positivo único de >0.7 o dos consecutivos de >0.5 en suero (>1 en lavado broncoalveolar; >0.5 en líquido cefalorraquídeo)
Valor pronóstico.	<ul style="list-style-type: none"> • La disminución de la concentración de GM se considera de buen pronóstico. • Índices de GM >1 en suero, iniciado el tratamiento o que no disminuyen después de una semana, son indicadores de fallo terapéutico.
Falsos Negativos (infrecuentes)	<ul style="list-style-type: none"> • Aspergilosis localizadas (osteomielitis o traqueobronquitis) • Dependiente de la especie de <i>Aspergillus</i> (<i>Aspergillus fumigatus</i> tiene menos GM que otras especies) • Profilaxis o tratamiento empírico con antifúngicos activos frente a <i>Aspergillus</i> (como caspofungina e itraconazol)
Falsos positivos.	<ul style="list-style-type: none"> • Reactividad cruzada con otros hongos como <i>Acremonium</i>, <i>Alternaria</i>, <i>Botrytis</i>, <i>Cladosporium</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Paecylomices</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Rhodotorula</i>, <i>Wangiella</i>, etc. • Fármacos derivados de hongos (betalactámicos, sobre todo amoxicilina-ácido clavulánico y piperaciclina-tazobactam), ciclofosfamida, inmunoglobulinas, hemoderivados y soluciones de alimentación parenteral (Plasma-Lyte, Baxter, EE.UU.) • Dietas ricas en proteínas de soja. • Colonización digestiva por <i>Bifidobacterium spp.</i> (en neonatos y niños) • Pacientes con enfermedad crónica de injerto contra huésped.

EORT/MSG: European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group del National Institute of Allergy and Infectious Diseases; GM: galactomanano.

Detección de 1-3-β-D-glucano

En cuanto a otras técnicas alternativas para el diagnóstico de la aspergilosis, también se han visto progresos en los últimos años. La cuantificación de beta D-glucano se considera un criterio diagnóstico de EFI. Es un método de detección panfúngico que, en el caso de la aspergilosis, ha mostrado cifras de sensibilidad por encima del 60%. Hay algunas dudas sobre su utilidad como técnica de diagnóstico precoz en pacientes neutropénicos ³²⁻³⁴.

Cuadro 5. Indicaciones y limitaciones diagnósticas de la detección de 1-3-β-D-glucano. ³⁴

Indicación y grado de evidencia.	Diagnóstico temprano de la micosis invasora (biomarcador panfúngico): <ol style="list-style-type: none">1. Aspergilosis y candidiasis invasoras: AI y BII2. Neumocitosis: BII3. Criptococosis y mucormicosis: BIII
Método y sugerencia de uso.	<ul style="list-style-type: none">• Fungitell (Associates of Cape Inc., EE.UU.)• Wako WB003 (Wako Pure Chemical Industries, Japón)• Fungitec G (Seikagaku Kogyo Corporation, Japón)• B-G Star (Maruha Corporation, Japón)• La detección de BG en suero debería realizarse cada 3 o 4 días.
Valor diagnóstico y puntos de corte. (micosis invasora probable)	<ul style="list-style-type: none">• Criterio micológico de micosis invasora probable e las definiciones del consenso de EORT/MSG.• Su detección antecede a otras pruebas diagnósticas de laboratorio.• La combinación con la detección de GM o CAGTA aumenta su valor diagnóstico en aspergilosis y candidiasis invasoras respectivamente.• <60-80pg/mL (Fungitell) o 7 pg/mL (wako) en suero.
Valor pronóstico.	<ul style="list-style-type: none">• La disminución de la concentración de BG se considera buen pronóstico.
Falsos Negativos (infrecuentes)	<ul style="list-style-type: none">• Sueros hiperpigmentados (bilirrubina y triglicéridos aumentados)• Profilaxis y tratamiento empírico con antifúngicos• Azitromicina y pentamidina intravenosas.
Falsos positivos	<ul style="list-style-type: none">• Contaminación de los materiales de laboratorio.• Bacteremia por cocos grampositivos (<i>Streptococcus</i>) y bacilos gramnegativos (<i>Alcaligenes</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)• Contacto con grasas y esponjas durante procesos quirúrgicos.• Hemodiálisis con membranas o filtros de acetato de celulosa.• Tratamiento intravenoso con albumina, inmunoglobulinas, factores de coagulación y/o proteínas plasmáticas.• Algunos fármacos antineoplásicos (letinano y polisacárido K) y antibacterianos (amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam)

EORT/MSG: European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group del National Institute of Allergy and Infectious Diseases; GM: galactomanano.

Tratamiento.

El aspergiloma se trata con itraconazol y anfotericina B y alguna operación. La forma invasora obliga a la administración rápida de la presentación original a base de lípidos de la anfotericina B o el voriconazol, a menudo complementado con inmunoterapia a base de citosinas (como el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos o el interferón γ). En algunos centros que tratan la leucemia han surgido algunas cepas resistentes a la anfotericina B pertenecientes a las secciones *Terrei*, *Flavi* y *Fumigati* y pudieran ser más eficaces contra nuevos tiazólicos como el posaconazol ^{3,4}.

La enfermedad necrosante crónica y menos grave de pulmones puede tratarse con voriconazol o itraconazol. Las formas alérgicas de la aspergilosis se tratan con corticoesteroides o cromoglicato disódico ^{3,4}.

Cuadro 6. Evidencia científica

<i>Calidad de Evidencia</i>	
I	Evidencia de ≥ 1 ensayo clínico, aleatorizado y controlado.
II	Evidencia de ≥ 1 ensayo clínico o estudio de cohortes, preferiblemente de más de un centro.
III	Recomendación de expertos, basa en experiencia clínica o descripción de casos
<i>Fuerza de Recomendación</i>	
A	Buena evidencia para recomendar su uso
B	Moderada evidencia para recomendar su uso
C	Pobre evidencia para recomendar su uso
D	Moderada evidencia para desaconsejar su uso
E	Buena evidencia para desaconsejar su uso

Cuadro 7. Tratamiento de primera línea en Aspergilosis invasiva en pacientes oncohematológicos

FÁRMACO	IDSA	ECIL	SEIMC
Voriconazol	A-I	A-I	A-I
AmB-L	A-I	B-I	A-I
ABCL		B-II	ND
Caspofungina		C-II	C-II
Micafungina			ND
Itraconazol		C-III	D-III
Posaconazol		ND	ND
Combinación	B-II	D-III	C-III

ABCL:AmB en complejo lipídico; AmB: anfotericina liposomal; ECIL: European Conference on Infections in Leukemia; IDSA: Infectious Diseases Society of America; ND: no datos o datos insuficientes; SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Cuadro 8. Tratamiento de rescate en Aspergilosis invasiva en pacientes oncohematológicos

FARMACO	IDSA	ECIL	SEIMC
AmB-L	A-II	B-III	A-II
ABCL	A-II	B-III	A-II
Posaconazol	B-II	B-II	B-II
Voriconazol		B-II	B-II
Caspofungina	B-II	B-II	B-II
Micafungina	B-II		B-II
Itraconazol	B-II	C-III	B-II
Caspofungina + AmB-L	B-II	C-II	B-III
Caspofungina + Voriconazol	B-II	C-II	B-III
AmB + Azoles	B-II	ND	B-III

ABCL: AmB en complejo lipídico; AmB-L: anfotericina liposomal; ECIL: European Conference on Infections in Leukemia; IDSA: Infectious Diseases Society of America; ND: no datos o datos insuficientes; SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Antifúngicos.

Hasta finales del siglo XX, no existían muchas alternativas terapéuticas para tratar una infección fúngica sistémica. Anfotericina B deoxicolato, fluorocitosina y azoles como miconazol y ketoconazol se empleaban en las micosis sistémicas, mostrando una eficacia reducida ya que su toxicidad limitaba la cantidad de fármaco que podía administrarse a los enfermos ^{3, 35}.

Hasta el año 1990, la anfotericina B convencional era el fármaco de referencia en el tratamiento de las micosis profundas. Comercializado en 1957, su actividad fungicida y su amplio espectro de acción que incluye la mayor parte de las especies patógenas para el ser humano, le convirtió no sólo en la principal, sino única alternativa en el tratamiento de las micosis profundas.

En la primera década del siglo XXI se han comercializado dos nuevos triazoles de uso sistémico, voriconazol y posaconazol, así como tres moléculas pertenecientes a una nueva clase de antifúngicos, las candinas, con un mecanismo de acción novedoso y un buen perfil de seguridad. Las equinocandinas anidalfungina, caspofungina y micafungina son un grupo de agentes antifúngicos sistémicos introducidos recientemente que inhiben la actividad de (1,3)-b-D-glucano sintetasa de *Candida sp* y *Aspergillus sp* ^{35, 36}.

Clasificación de los antifúngicos y agentes físicos.

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales de acuerdo a su: Estructura: polienos, azoles, alilaminas, entre otros. Origen: sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química. Espectro de acción: amplio o restringido. Sitio de acción: membrana celular, pared fúngica, ARN ^{6, 15}.

Agentes físicos ⁶

1. Radiaciones
2. UV (2000 a 1800 A)
3. Rayos X
4. Ultrasonido
5. Temperatura
6. Calor mayor de 40 °C

Agentes químicos ¹²

1. Antiguos
 - 1.1. Sistémicos
 - 1.1.1. Sulfonamidas
 - 1.1.2. Sulfonas
 - 1.1.3. Diaminas aromáticas
 - 1.1.4. Estibamida
 - 1.1.5. Pentamidina
 - 1.1.6. Propamidina
 - 1.1.7. Yoduro de potasio
 - 1.2. Tópicos
 - 1.2.1. Metales pesados (Hg, Ag, Cu, Zn)
 - 1.2.2. Halógenos (I, Cl, Br)
 - 1.2.3. Alcoholes y fenoles.
 - 1.2.4. Hipoclorito de sodio al 20%
 - 1.2.5. Disulfuro de selenio
 - 1.2.6. Derivados del ácido benzoico
 - 1.2.7. Urea
 - 1.2.8. Ungüento de Whitfield
 - 1.2.9. Ácidos grasos
 - 1.2.10. Ácido undecílenico

- 1.2.11. Álcalis
- 1.2.12. Bicarbonato de sodio
- 1.2.13. Colorantes
- 1.2.14. Violeta de genciana
- 1.2.15. Fucsina (tintura de Castellani)
- 1.2.16. Verde brillante (tintura de Milian)
- 1.2.17. Alilaminas
- 1.2.18. Tolnaftato, tolclolato
- 1.2.19. Pirrolnitrina
- 1.2.20. Piritione de zinc

2. Modernos
 - 2.1. 5-Fluorocitosina (sistémico)
 - 2.2. Imidazoles (tópicos y sistémicos)
 - 2.3. Alilaminas (tópicas y sistémicas)

Antibióticos (producidos por microorganismos) ⁶

1. Por hongos
 - 1.1. Griseofulvina
2. Por actinomicetos
 - 2.1. Derivados poliénicos
 - 2.1.1. Anfotericina B
 - 2.1.2. Nistatina
 - 2.1.3. Pimaricina (natamicina)
 - 2.2. Saramicetina (no disponible)
3. Por mixobacterias
 - 3.1. Ambruticina

Mecanismos de acción y parámetros farmacocinéticos de antifúngicos

Cuadro 9. Mecanismos de acción y parámetros farmacocinéticos de antifúngicos ⁶

FARMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	MECANISMOS DE RESISTENCIA FUNGICOS	VIDA MEDIA	ELIMINACIÓN
Azoles, imidazoles.				
Ketoconazol	Inhibición de la 14 α -desmetilasa. Bloqueo en la síntesis de ergosterol con acumulación de 14 α -desmetilasa.	Alteraciones en el gen ERG11. Aumento del flujo de salida del azol. Mayor producción de desmetilasa.	7 a 8 h	Hepático, 13% renal.
Triazoles.				
Itraconazol	Mismo mecanismo de ketoconazol. Además se entorpecen los sistemas de transporte electrolítico.	Alteraciones en el gen ERG11. Aumento del flujo de salida del azol. Mayor producción de desmetilasa.	15 a 30 y hasta 40 h.	De manera bifásica. Principalmente hepática.
Fluconazol	Mismo mecanismo de itraconazol. Además actúa sobre enzimas mitocondriales catalasa, citocromo oxidasa y peroxidasa.		25 a 30 h.	80% a 90% renal.
Posaconazol			24 h (aprox.)	Desconocida
Voriconazol			12 h (aprox.)	Hepática y renal.
Ravuconazol			120 a 140 h.	Estudios en fase II
Pramiconazol			Datos aún no disponibles.	Datos aún no disponibles
Albaconazol			Estudios en fase II	Estudios en fase II
Isavuconazol			Estudios en fase III	Estudios en fase III
Polienos.				
Anfotericina B	Unión al ergosterol de la membrana fúngica, formación de "poros"	Sustitución del ergosterol por otros esteroides precursores	24h puede ser hasta 15 días	Excreción lenta renal y 4 a 5 % en forma activa por orina
Alilaminas				
Terbinafina	Inhibe epoxidación de escualeno	No se conoce	12 h, se extiende hasta 200h en insuficiencia renal	80% renal, 20% hepática
Neumocandinas				
Caspofungina Micafungina Anidulafungina	Inhibe formación de 1-3 β -glucanos en pared celular.	Mutaciones de gen FKS1 que codifica una subunidad de sintetasa de 1-3 β -glucanos	9 a 10 h	Desconocida
Diversos				
Nikkomicina Z	Inhibidor competitivo de sintetasa de quitina de pared celular	Se desconoce		
5-Fluorocitosina	Interfiere en la síntesis de ácidos nucleicos. Se incorpora al DNA fúngico inhibiendo timidilato sintetasa	Pérdida de la permeasa necesaria para transporte de citosina, o menor actividad pirofosforilasa	3 a 6 h se puede extender hasta 100 a 200 h	80 a 90 por vía renal.
Griseofulvina	Inhibe la mitosis del hongo, rompe el huso mitótico al interactuar con los microtúbulos polimerizaxos. Se une a tubulina	Se desconoce peor no es infrecuente la falta de mejoría de las tías	24 h	Renal
Yoduro de potasio	Estimula la quimiotaxis de neutrófilos. Modera la respuesta inflamatoria	Se desconoce		Renal

Resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos

Como con otros microorganismos, la resistencia de los hongos filamentosos frente a los antifúngicos es un concepto amplio que puede clasificarse en resistencia microbiológica y resistencia clínica. La primera se puede subdividir en: ^{37, 38}

1. Resistencia intrínseca o innata. Es aquella que presentan todas las cepas de una misma especie de un hongo y no tiene relación con la exposición al antifúngico.
2. Resistencia primaria. Es la que ocurre en una especie de cepas normalmente sensibles a un antifúngico cuando aparecen de forma espontánea cepas resistentes, sin haber estado en contacto previo con el antifúngico.
3. Resistencia secundaria o adquirida. Es la que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria.

Aunque la resistencia adquirida o secundaria no puede considerarse un problema significativo en los hongos filamentosos, ya se han descrito cepas de la sección *Fumigati* resistentes al itraconazol y, además, se ha comprobado que esta resistencia es cruzada para otros azoles (voriconazol, ravuconazol o posaconazol). La resistencia de *Aspergillus* a los azoles podría estar relacionada con el uso masivo de antifúngicos en tratamientos empíricos y en profilaxis, utilización comprensible si se tiene en cuenta el mal pronóstico de algunas de estas infecciones. Las razones por las cuales la sección *Fumigati*, siendo resistente intrínsecamente al fluconazol, se podría convertir en resistente a otros antifúngicos han empezado a estudiarse ^{5, 35, 38}.

En términos generales, los mecanismos identificados hasta ahora, por los que una célula inicialmente sensible se hace refractaria a agentes citotóxicos son ^{37, 38}:

1. Incapacidad del fármaco para alcanzar la diana dentro de la célula, que puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior.
2. Cambios en la interacción fármaco-diana (aumento del número de copias de la diana o modificaciones debido a mutaciones).
3. Modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas.
4. Alteraciones en el procesamiento intracelular (degradación o modificación) del fármaco. En el caso de los hongos filamentosos sólo se han descrito los tres primeros mecanismos. Asimismo, se sabe que muchos de estos mecanismos pueden coexistir en una misma célula.

Pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos

En las últimas 2 décadas se ha producido un desarrollo significativo en las técnicas para realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos. En primer lugar se desarrollaron métodos estandarizados, reproducibles y con procedimientos para asegurar la calidad de los resultados. Tanto el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) como el Clinical Laboratory Standards Institute estadounidense (CLSI) han publicado procedimientos de referencia para conocer la sensibilidad a los antifúngicos de levaduras y de hongos filamentosos, métodos que se revisan y actualizan periódicamente ^{2, 39}.

Asimismo, se han establecido puntos de corte para interpretar los resultados de los estudios de sensibilidad *in vitro*. Estos puntos de corte sólo son aplicables a las infecciones por *Candida sp.* y sólo para algunos de los antifúngicos disponibles. Para las infecciones por otras especies de levaduras y por hongos filamentosos, aun no se han establecido puntos de corte, aunque se recomienda no tratar con fármacos que sean inactivos *in vitro* frente a la especie causante de la micosis ⁴⁰.

La evaluación de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos es cada vez más común en los laboratorios clínicos. Sin embargo, la realización de estas pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de los aislamientos clínicos tiene varias indicaciones concretas donde los resultados ofrecen una ayuda importante tanto al médico clínico como al epidemiólogo. Estas son: ^{1, 2, 8}

- Predecir el resultado del tratamiento en una infección invasora determinada.
- Optimizar la terapia de los pacientes con micosis invasora en los que se ha producido un fracaso terapéutico, en los que han recibido profilaxis antifúngica o los que han obtenido aislamientos, de muestras clínicas significativas, de especies fúngicas infrecuentes, de las que no se conoce la sensibilidad *in vitro*. Estas situaciones, el estudio de la sensibilidad *in vitro* puede ayudar a elegir la mejor alternativa terapéutica, ofrecer una información útil sobre la dosis adecuada e incluso sugerir una terapia combinada.
- Efectuar estudios para obtener los patrones de sensibilidad en un centro sanitario concreto (tasa de residencia local), región o país.
- Evaluar la actividad de todos aquellos productos antifúngicos nuevos.

Métodos de dilución en caldo.

Constituyen el estándar de oro para determinar la susceptibilidad *in vitro*, tanto de levaduras como de hongos filamentosos y miden Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a distintos fármacos antifúngicos, como anfotericina B, 5-fluocitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y los nuevos triazoles como voriconazol, posaconazol y ravuconazol ^{41, 42}.

En la actualidad se dispone de dos estándares que utilizan el método de microdilución en caldo con este propósito. Uno es el documento M27-A2, de la CLSI, en el cual se han establecido puntos de corte después de una exhaustiva correlación clínica y epidemiológica para definir susceptibilidad *in vitro* a determinados antifúngicos como los azoles. El otro es el estándar europeo EUCAST-AFST, cuya versión definitiva se publicó el año 2007 y que ha establecido puntos de corte clínicos de acuerdo a la especie y la relación entre criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos y la distribución de las CMIs ^{41, 42}.

Las desventajas de las pruebas de susceptibilidad basados en microdilución son:

- Necesitan de un largo tiempo para informar los resultados (24-72 hrs).
- Fallan en discriminar cepas resistentes a anfotericina B (el uso de medio AM3 o de E-test® es mejor).
- Aún falta por establecer puntos de corte a varios hongos y fármacos antifúngicos.
- La interpretación de los azoles y fluocitosina es difícil en cepas con “*trailing*”

Método de difusión en disco.

Es un método simple, desarrollado para levaduras y disponible para fármacos solubles en agua, tales como fluocitosina, fluconazol y voriconazol, estandarizado por el CLSI en el documento M44-P para especies de *Candida*. Se obtiene un halo de inhibición cuya medición correlaciona muy bien con el método de referencia, lo cual ha sido demostrado en estudios multicéntricos que han probado más de 1.000 cepas. La desventaja es que sólo existen puntos de corte para fluconazol y voriconazol. La utilización de azul de metileno disperso en la superficie de la placa parece mejorar los límites de la zona de inhibición y facilitar la lectura ^{2, 41}.

El E-test, es uno de los métodos más utilizados debido a su fácil implementación y lectura. Involucra la inoculación del hongo en la superficie de un agar, seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, lo cual permite determinar la CMI. Luego, la placa se incuba a 37 °C por 24-48 h y se genera una elipse de inhibición que permite obtener la CMI. Se ha utilizado en levaduras y en hongos filamentosos y mide la CMI a la anfotericina B, fluconazol, itraconazol, fluocitosina, voriconazol, posaconazol y caspofungina ^{41, 42}.

Sensititre® YeastOne® (YO8)

El sistema de sensibilidad Sensititre® es un producto de diagnóstico *in vitro* para la realización de pruebas de sensibilidad a levaduras no exigentes como *Candida* y *Cryptococcus*, además de especies de hongos miceliales como *Aspergillus*, es un método de microdilución que ofrece resultados cualitativos y cuantitativos de concentración mínima inhibitoria en formato de placa seca.

Se trata de una prueba colorimétrica, cada placa contiene diversos agentes antifúngico en las diluciones correspondientes y un indicador colorimétrico. Los resultados se leen manualmente observando la concentración antifúngica más baja, que muestra la inhibición del crecimiento (que viene indicada por la ausencia de cambio de color).

Los agentes antifúngicos con los cuales cuenta esta prueba se enlistan a continuación:

Cuadro 10. Listado de antifúngicos

Posición	Antifúngico	Abreviatura	Intervalo de dilución (µm/mL)
A1	Control positivo	+ CONT	
A2 – A12	Posaconazol	PZ	0.008 – 8
B1 – B12	Anfotericina B	AB	0.008 – 16
C1 – C12	Fluconazol	FZ	0.125 – 256
D1 – D12	Itraconazol	IZ	0.008 – 16
E1 – E12	Ketoconazol	KZ	0.008 – 16
F1 – F12	5- Fluorocitosina	FC	0.03 – 64
G1 – G12	Voriconazol	VOR	0.008 – 16
H1 – H12	Caspofungina	CAS	0.008 – 16

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas las infecciones fúngicas se han convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en sujetos inmunocomprometidos^{19, 20}. El principal factor para ello es el aumento de sujetos sometidos a terapias inmunosupresoras cada vez más agresivas. Estas infecciones conllevan un mal pronóstico, probablemente relacionado con la escasez de manifestaciones clínicas hasta que la infección está muy avanzada, las dificultades en el diagnóstico que a menudo retrasan el inicio de un tratamiento antibiótico adecuado y la ausencia de terapéuticas antifúngicas óptimas para ellas^{22, 43}.

El tratamiento de las micosis sistémicas es uno de los principales problemas en el campo de la micología médica. Son enfermedades difíciles de detectar, por lo que el retraso diagnóstico es otra razón de su elevada mortalidad, asimismo los antifúngicos presentan con frecuencia efectos secundario y colaterales, por lo que su margen terapéutico es estrecho, limitando su utilización^{35, 44}.

La aparición de nuevas moléculas con interacciones, efectos tóxicos y perfil de actividad diferentes ha modificado el mundo de la infección fúngica. Cada antifúngico muestra unas características farmacológicas y microbiológicas distintas, que deben tomarse en consideración a la hora de tratar a enfermos con micosis sistémicas, es decir que no todas las micosis deben tratarse de la misma forma y que la identificación de las cepas y los estudios de sensibilidad son fundamentales para la práctica clínica^{35, 44}.

La resistencia antifúngica es otro punto a tomar en consideración ya que continúa creciendo y evolucionando a pesar de la aparición de nuevos fármacos, haciendo más complicado el manejo de los pacientes con infecciones fúngicas. Por lo consiguiente utilizar métodos para determinar la sensibilidad de los hongos a los antifúngicos permite la detección de resistencia asociada a la caracterización de mecanismos de resistencia y mejora la eficacia de la terapia antifúngica^{37, 45}.

Las diferentes formas de aspergilosis son raras en pediatría, siendo el pulmón el órgano más frecuentemente afectado^{24, 25, 28}. En la aspergilosis pulmonar invasiva el principal factor de riesgo es una profunda y prolongada neutropenia (conteo total de neutrófilos $\leq 500/uL$ por ≥ 10 días) esto principalmente en niños que padecen de cáncer o aquellos que han recibido un trasplante de células hematopoyéticas. La incidencia va desde el 4.9-10% en pacientes con leucemia mieloide aguda, leucemia recurrente y trasplantes alogénicos^{24, 25, 46}.

En pacientes no neutropénicos la aspergilosis pulmonar invasiva se puede presentar en pacientes con inmunodeficiencia primaria y también en aquellos con VIH. Dentro las inmunodeficiencias primarias la Enfermedad Granulomatosa Crónica, enfermedad caracterizada por la presencia de neutrófilos no funcionales, la incidencia va de un 25-40% ²⁴⁻²⁶.

La Aspergilosis broncopulmonar alérgica es una reacción de hipersensibilidad a los antígenos de *Aspergillus* que se presenta cuando los pacientes tiene fibrosis quística. Tiene una incidencia del 2-15% y se presenta tanto en niños como en adolescentes ²⁴⁻²⁶.

La importancia de realizar este trabajo radica en que los resultados de los estudios in vitro son únicamente orientadores porque no hay suficientes estudios sólidos que establezcan una correlación clara entre los resultados de la terapia antifúngica y los que han sido obtenidos in vitro o en los modelos de experimentación animal. A este hecho se suma que todavía no hay puntos de corte consensuados para todos los antifúngicos disponibles y que cuando los hay son para aislamientos clínicos de las especies más comunes de *Candida sp.* En este contexto, se debe considerar que aquellas cepas con CIM's más elevadas no responderán al tratamiento con ese fármaco específico (aunque no siempre es así). Sin embargo, la obtención de CMI's bajas no es siempre indicadora de una buena respuesta al tratamiento por que la evolución de las micosis depende sobretodo del estado inmunitario del paciente, de la localización anatómica, del daño orgánico y de la fase de desarrollo en la que se encuentra la micosis, y de la combinación de todos estos parámetros con el tratamiento farmacológico específico que recibe el paciente ^{2, 8, 39}.

De los diferentes métodos de estudio in vitro de la sensibilidad a los antifúngicos que se emplean con más frecuencia y tiene mayor respaldo científico, destacan los publicados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y por *Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing* (AFST) del *European Committee on antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

El más utilizado es el propuesto por el CLSI para evaluar por un método de dilución en caldo (RPMI 1640), que es considerado de referencia para estudiar la sensibilidad de hongos filamentosos en el documento M38-A2, donde ha sido estandarizado para *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii* y la forma micelial del complejo *Sporothrix schenckii* ^{2, 8}.

Todos estos métodos consisten básicamente en comparar el crecimiento del hongo en un medio con o sin un antifúngico (control) y cuantificar la inhibición producida por el efecto del antifúngico.

Los diferentes parámetros existentes, como el medio de cultivo, pH del medio, inóculo, tiempo y temperatura de incubación, etc., deben ajustarse estrictamente a lo recomendado en los documentos, puesto que cualquier variación puede afectar el resultado obtenido. Además se requieren el uso de cepas de control de calidad que permitan establecer si los valores de CMI encontrados para éstas se encuentren en los límites descritos y de esta manera poder considerar válidos los resultados obtenidos con aislamientos clínicos. Son métodos laboriosos, de difícil adaptación para su utilización rutinaria en el laboratorio clínico y han llevado al desarrollo de otros métodos, en su mayoría comerciales, que toman como base los anteriores y son de más sencilla realización, como el método colorimétrico Sensititre YeastOne, el método cualitativo ATB Fungus 3, el método automatizado Vitek 2 o los métodos de difusión Etest, gradientes de antifúngico o tabletas NeoSensitabs. Algunos de estos métodos han demostrado una aceptable correlación con los métodos estandarizados aunque existen importantes variaciones que dependen de la especie y del antifúngico concretos evaluados ^{2, 8}.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la concentración mínima inhibitoria frente a 8 antifúngicos de cepas de *Aspergillus sp* aislados en muestras de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría (INP) de junio de 2004 a julio de 2014.

Objetivos específicos

- Describir la técnica empleada para la obtención de cultivos puros.
- Conocer la frecuencia de las especies de *Aspergillus* aisladas.
- Conocer los diagnósticos de base y secundarios de los pacientes en el estudio.
- Conocer el tratamiento que recibieron los pacientes.
- Conocer los factores clínicos asociados a la aspergilosis en los pacientes.
- Describir el tipo de muestras de las que se aisló el hongo.

MATERIALES Y MÉTODO.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio.

DE 2004 A 2013:

Estudio experimental, retrospectivo y longitudinal

De 2013 a 2014:

Estudio experimental, prospectivo y longitudinal

Población de estudio

Todas las muestras provenientes de lavados bronco-alveolares, lavados bronquiales, aspirados nasofaríngeos, esputos, biopsias de pulmón, abscesos y lesiones que llegaron al Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría de Junio de 2004 a Julio de 2014.

Criterios de inclusión

- Cultivos de pacientes pediátricos de 0 a 18 años.
- Pacientes con aislamientos frecuentes de la misma cepa (por lo menos dos aislamientos).
- Todos los cultivos positivos con hongos filamentosos del género *Aspergillus* sp provenientes de pacientes con probable aspergilosis.

Criterios de exclusión

- Muestras con cultivos mixtos de hongos miceliales.
- Muestras que presenten algún crecimiento de bacterias o levaduras.

Caracterización de variables

VARIABLE	DEFINICION DE VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
Edad	Tiempo transcurrido desde el evento de nacimiento del paciente hasta el momento de la obtención del cultivo.	Cuantitativa continua	<ul style="list-style-type: none"> Días (<1mes) Meses (1 a 11 meses) Años (A partir del año)
Sexo	Variable genética que divide a los seres humanos en hombre o mujer.	Cualitativa nominal dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> Hombre Mujer
Valor clínico de la muestra.	Variable clínica que indica la relevancia que se le dio al resultado.	Cualitativa nominal dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> Patológica (que está causando daño y/o enfermedad y ameritó tratamiento) No patológica (que no está causando daño ni enfermedad)
Microorganismo aislado	Hongo del género <i>Aspergillus</i> obtenido en el cultivo.	Cualitativa nominal	<ul style="list-style-type: none"> Género y especie del hongo aislado
Temperatura de incubación.	Variable que indica los grados centígrados a los que fue sometido el cultivo y la prueba para desarrollar el crecimiento del hongo.	Cuantitativa continua	<ul style="list-style-type: none"> Grados centígrados (°C)
Tiempo de incubación.	Variable que indica las horas que requirió el cultivo y la prueba para desarrollar el crecimiento del hongo	Cuantitativa continua	<ul style="list-style-type: none"> Horas (Hrs)
Antígeno de <i>Aspergillus</i>	Variable que indica el resultado de la prueba de detección de galactomanano en suero.	Cualitativa nominal dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> Se realizó <ul style="list-style-type: none"> Positivo (A partir de un valor de 0.5 de densidad óptica). Negativo No se realizó.

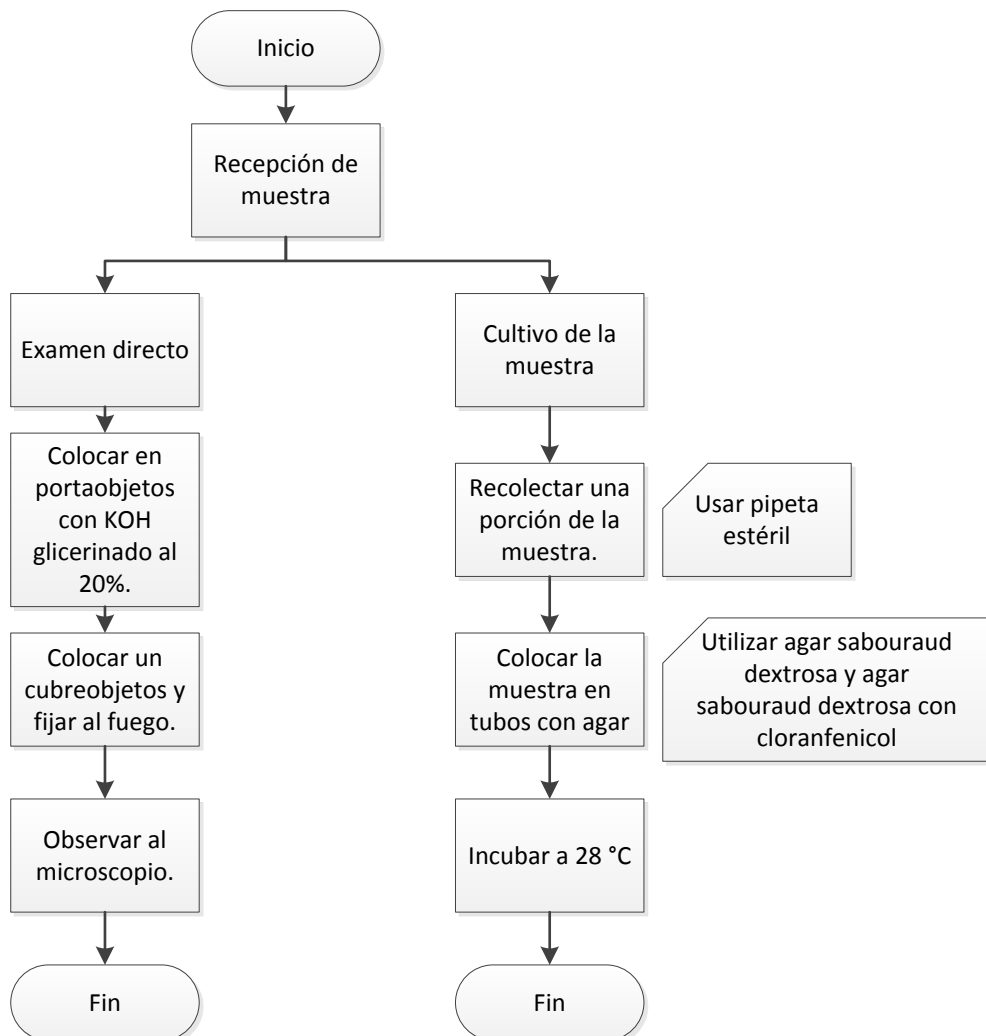
TÉCNICAS

Examen directo

- Recibir la muestra.
- Colocar una porción de la muestra en un portaobjetos y agregar una gota de KOH glicerinado al 20%.
- Poner un cubreobjetos y pasar el portaobjetos por la flama un par de veces evitando que el KOH hierva.
- Observar en el microscopio en busca de filamentos.

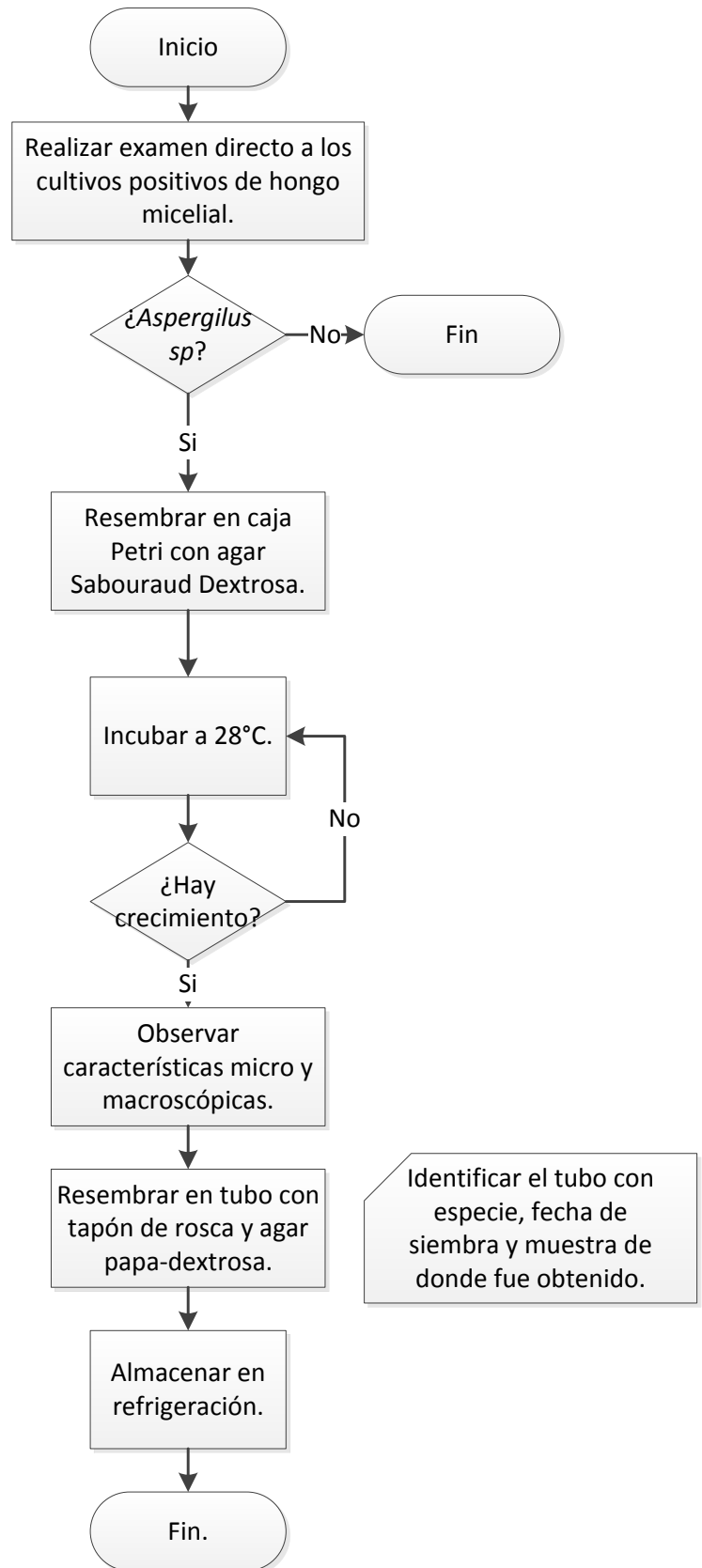
Cultivo de la muestra

- Colocar con una pipeta estéril una porción de la muestra en un tubo con agar Sabouraud Dextrosa y en otro tubo con agar Sabouraud Dextrosa + cloranfenicol.
- Incubar a 28°C hasta que haya crecimiento.



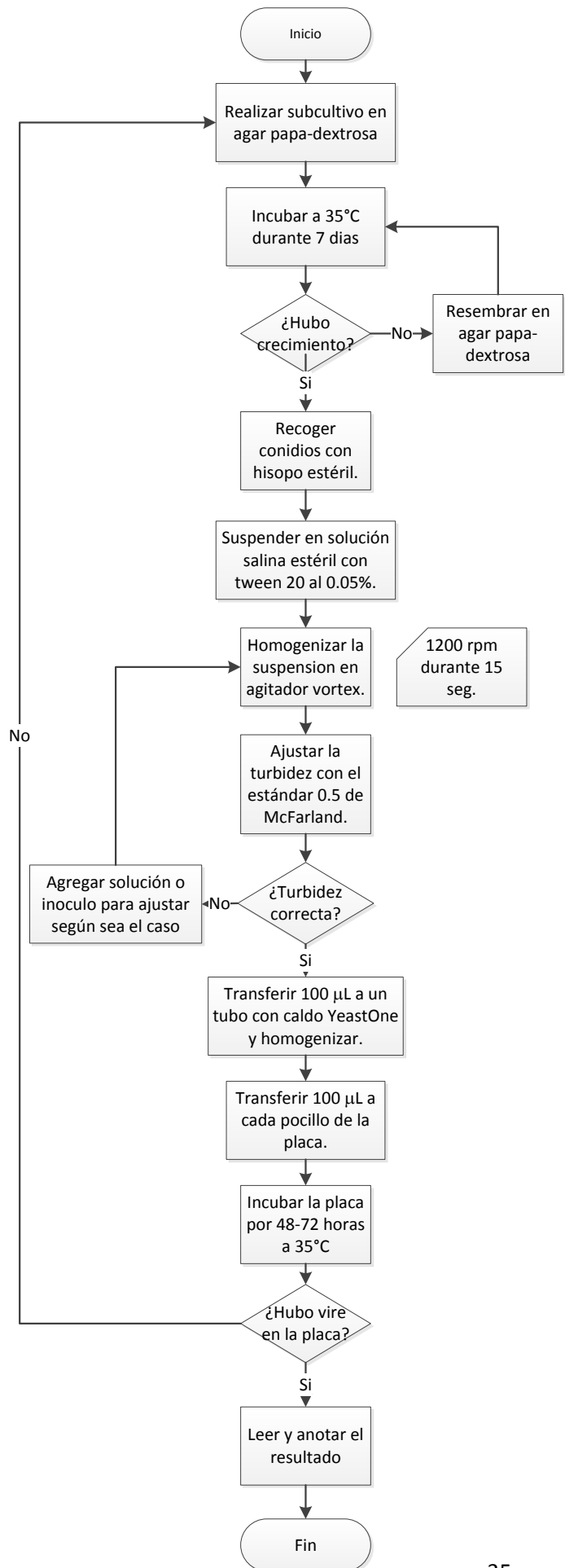
Obtención y almacenamiento de cultivos puros

- Realizar examen directo a los cultivos positivos con hongos miceliales.
- Asegurar por morfología microscopía que se trate de un *Aspergillus sp.*
- Realizar una resiembra en una caja de Petri con Agar Sabouraud-Dextrosa.
- Incubar la caja de Petri a 28°C por 3 días o dependiendo del tiempo que tarde en desarrollarse el cultivo.
- Observar las características macroscópicas de la colonia y hacer examen directo.
- Resembrar la cepa en un tubo con tapón de rosca y Agar Papa-Dextrosa e incubar a 28°C hasta que la colonia tenga un crecimiento favorable.
- Identificar la cepa y fecha de resiembra en el tubo. Cerrar completamente el tapón y sellar con papel parafilm.
- Almacenar las muestras a 4°C por el tiempo que se requiera.



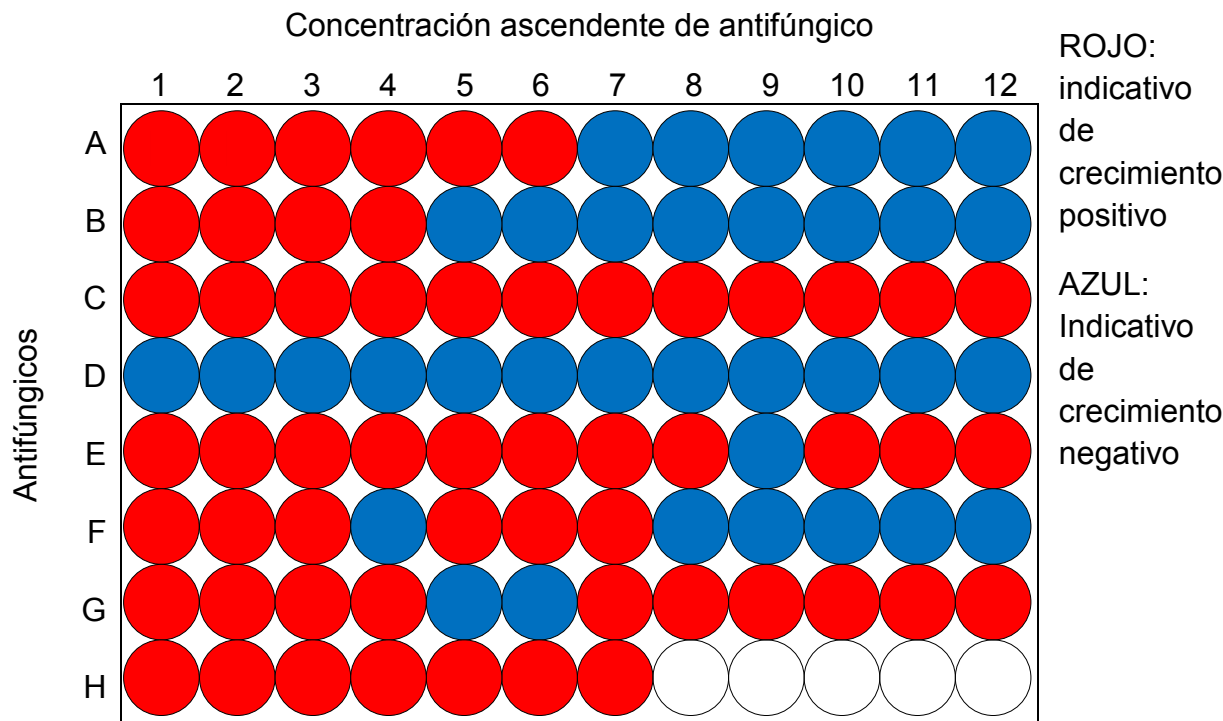
Sensibilidad a los antifúngicos para hongos filamentosos

- Efectuar un subcultivo del hongo en agar Papa Dextrosa. Incubar durante 7 días a 35°C para obtener una esporulación adecuada.
- Recoger conidios con un hisopo estéril y suspenderlos en solución salina estéril con tween 20 al 0.05%.
- Homogenizar la suspensión en vortex.
- Ajustar la turbidez hasta el 0.5 del estándar de McFarland.
- Transferir 100 μL a un tubo con caldo Yeast One.
- Transferir con una pipeta multicanal 100 μL a cada pocillo de la placa.
- Incubar la placa por 48 -72 horas a 35°C.
- Verificar el crecimiento en el pocillo de control positivo.
- Leer y anotar los resultados. (Ver anexo 1: formato de reporte de resultados)



Interpretación de resultados de la placa de sensibilidad

Figura 2. Ilustración e interpretación de los resultado de prueba que pueden aparecer en la placa

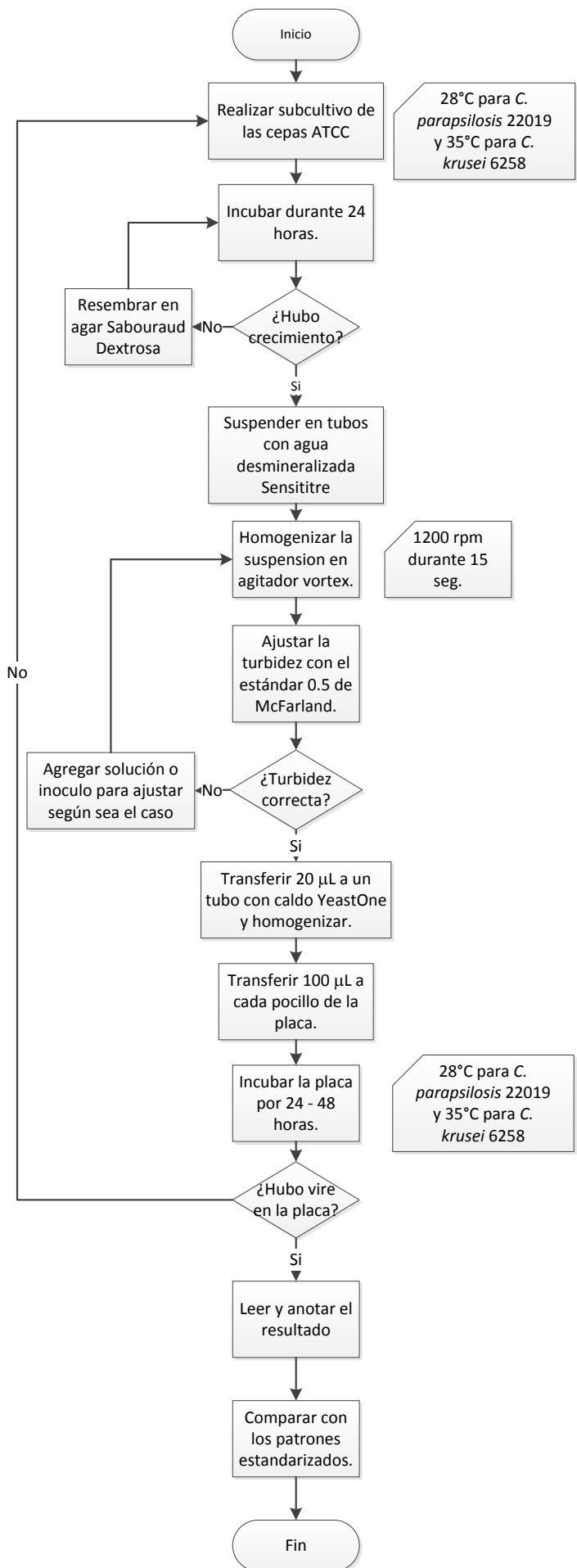


Ver Anexo 2 para conocer las concentraciones de antifúngico en la placa.

- A) 1,A Pocillo de control de crecimiento positivo.
- B) Crecimiento típico, el punto final de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se encuentra en el pocillo número 5.
- C) Crecimiento en todos los pocillos, el punto final de la CMI es mayor a la concentración del último pocillo.
- D) No hay crecimiento en ningún pocillo, el punto final de la CMI es menor a la concentración del primer pocillo.
- E) "Pocillo saltado". En este caso la CMI es mayor que la concentración del último pocillo. Si se produce más de un salto en una columna los resultados de la prueba no serán válidos.
- F) "Pocillo saltado". En este caso la CMI es igual a la concentración del pocillo 8.
- G) "Pocillo saltado". Doble. La prueba debe repetirse.
- H) Error de llenado de la placa. La prueba debe repetirse

Control de calidad con cepas ATCC de *Candida sp.*

- Realizar un subcultivo de las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y de *C. parapsilosis* ATCC 22019. Incubar 24 horas a 35°C para *C. krusei* y a 28°C para *C. parapsilosis*.
- Suspender por separado colonias de cada cepa en los tubos con agua desmineralizada Sensititre.
- Mezclar cada tubo en un agitador vortex durante 15 segundos y asegurar que la suspensión sea uniforme
- Ajustar la turbidez hasta el 0.5 del estándar de McFarland.
- Transferir 20 µL a un tubo con caldo Yeast One.
- Transferir con una pipeta multicanal 100 µL a cada pocillo de la placa.
- Incubar la placa por 24 horas a 35°C para *C. krusei* y a 28°C para *C. parapsilosis*.
- Comparar los resultados con los patrones estandarizados de sensibilidad para las cepas de control de calidad. (ver anexo 3 concentraciones de patrones estándar para cepas ATCC)



Patrones estándar para cepas ATCC de control de calidad.

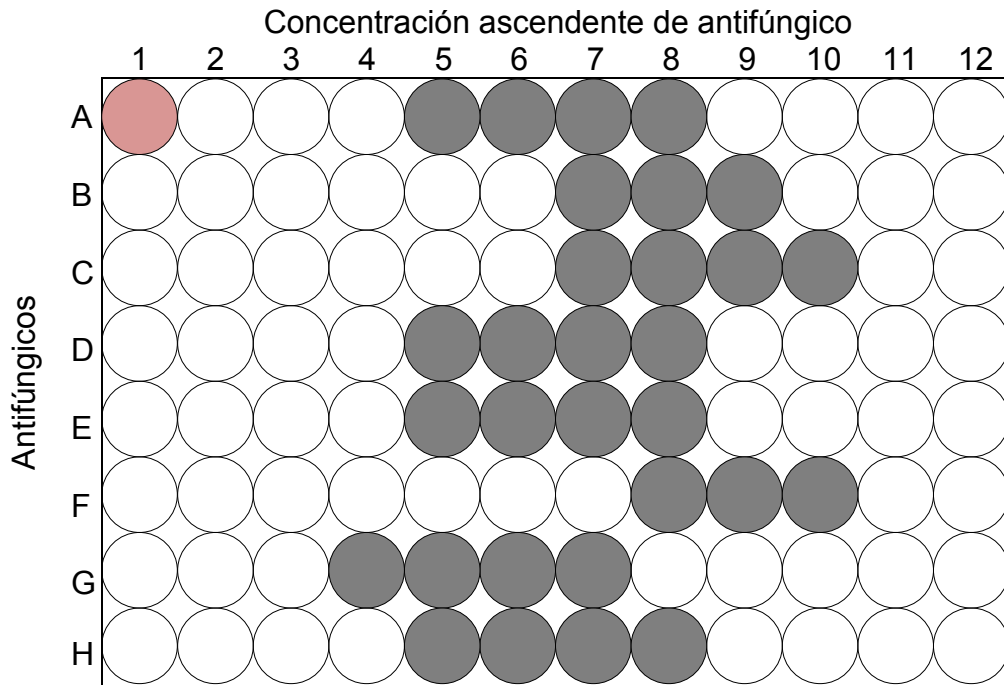


Figura 2.1
Ilustración e interpretación de los patrones estándar para *Candida krusei* ATCC 6258

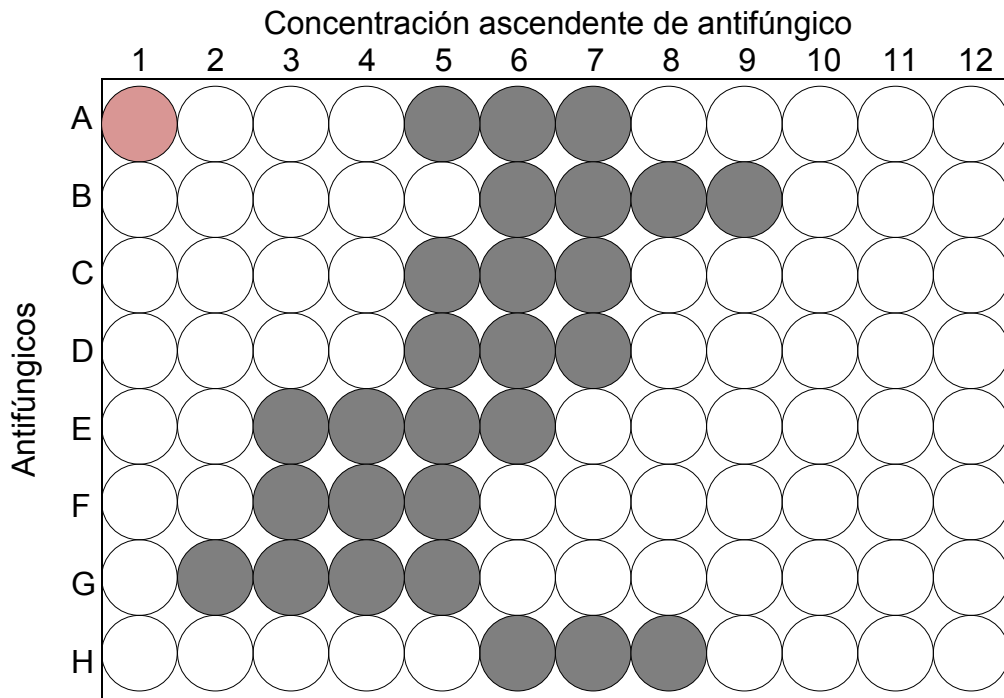


Figura 2.2
Ilustración e interpretación de los patrones estándar para *Candida parapsilosis* ATCC 22019

El punto final de la CMI deberá encontrarse dentro de las zonas en color gris para considerarse válido. El pocillo 1A se trata del control de crecimiento positivo por lo tanto deberá aparecer siempre, de lo contrario la prueba se considera no válida.

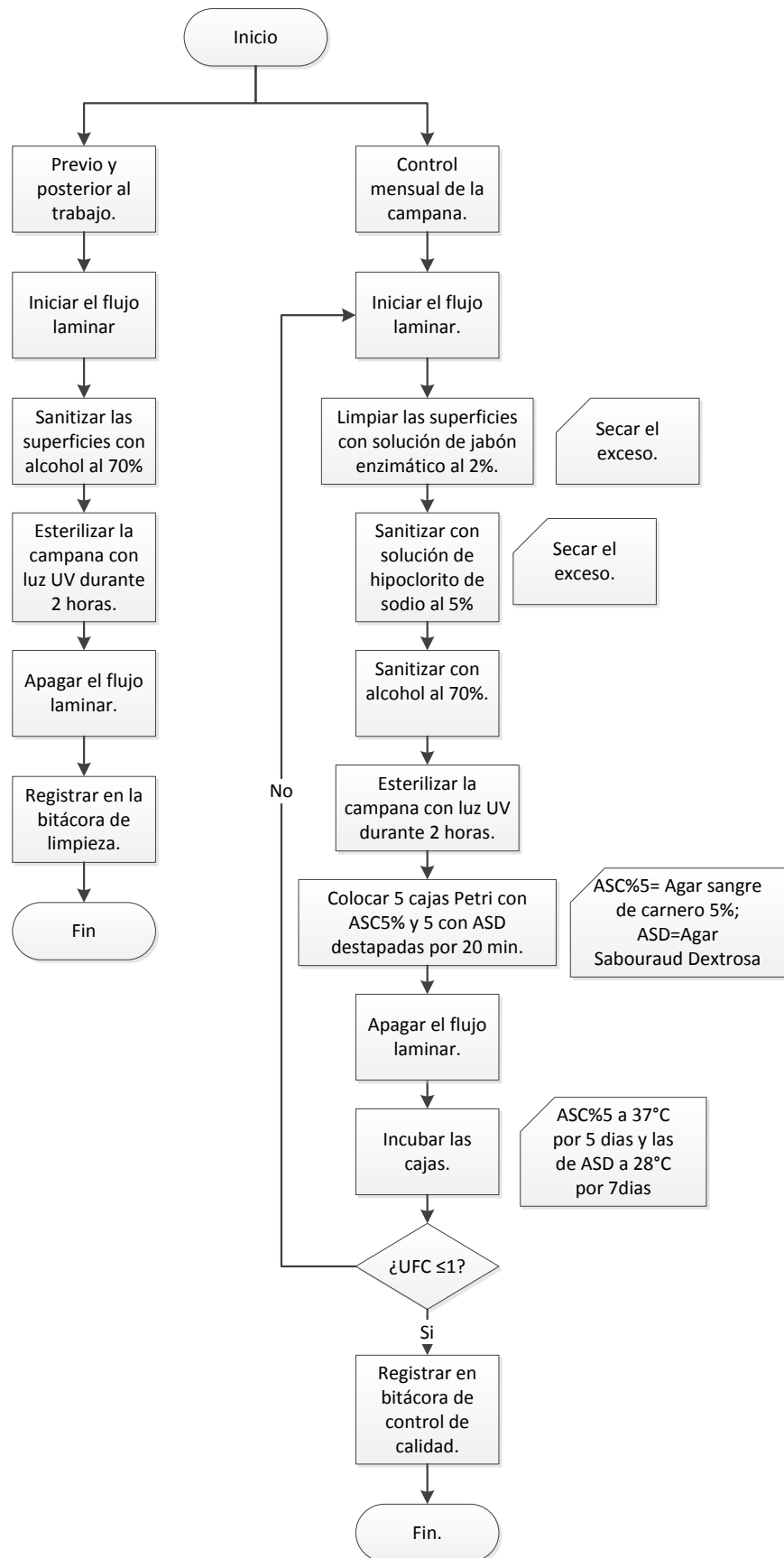
Mantenimiento de la campana de flujo laminar

Previo y después del trabajo

- Encender el flujo laminar.
- Sanitizar la campana con alcohol al 70% y una gasa.
- Esterilizar la campana usando luz Ultravioleta durante 2 horas.

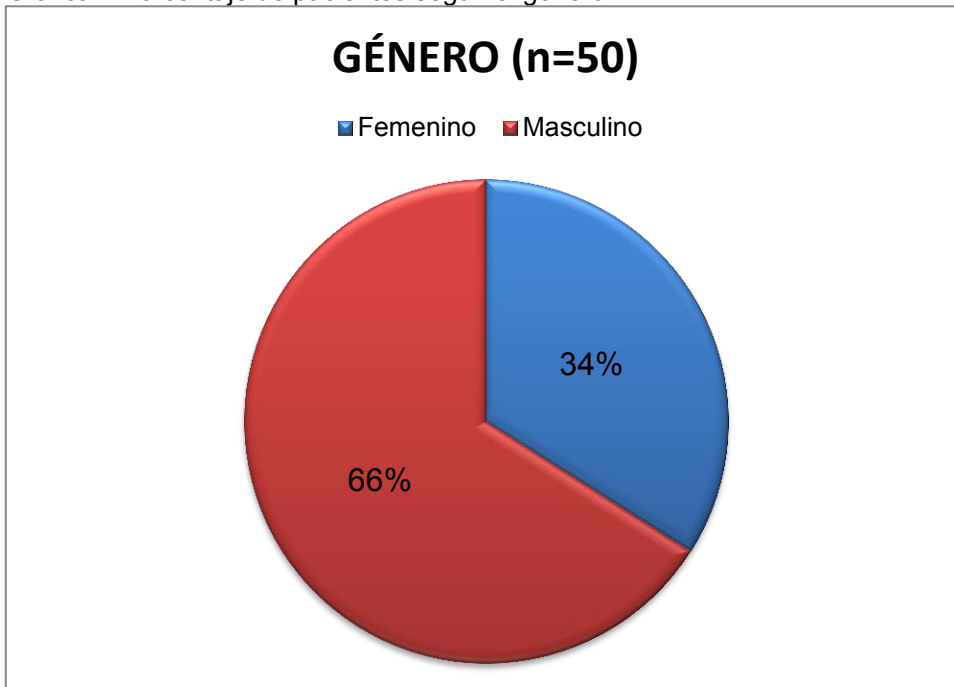
Control mensual de la campana.

- Encender el flujo laminar.
- Limpiar exhaustivamente la campana con una solución de jabón enzimático al 2%.
- Secar el exceso de humedad.
- Limpiar nuevamente con una solución de hipoclorito de sodio al 5%.
- Secar el exceso de humedad.
- Sanitizar la campana utilizando alcohol al 70%.
- Esterilizar la campana con luz Ultravioleta durante 2 horas.
- Colocar 5 cajas Petri con agar Sangre de Carnero al 5% y 5 cajas Petri con agar Sabouraud Dextrosa intercalados en las esquinas, los lados y el centro de la campana.
- Incubar las cajas de ASC5% a 37°C/3 días y el ASD a 28°C/7 días.

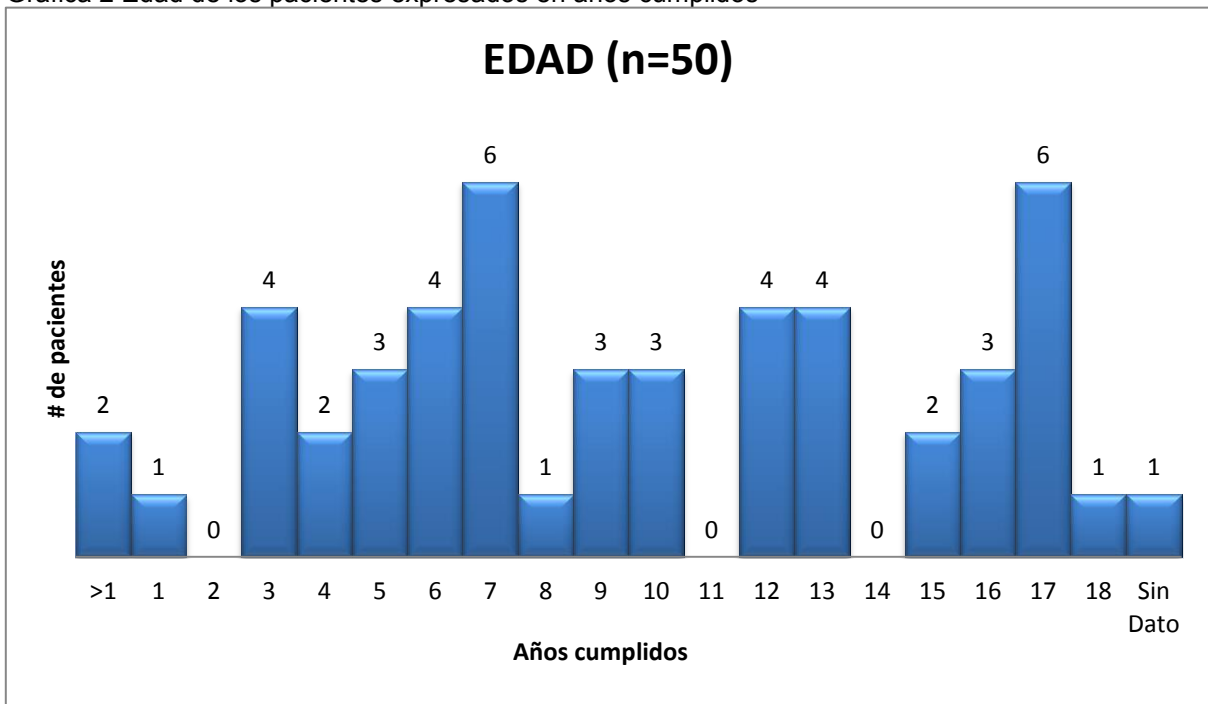


RESULTADOS

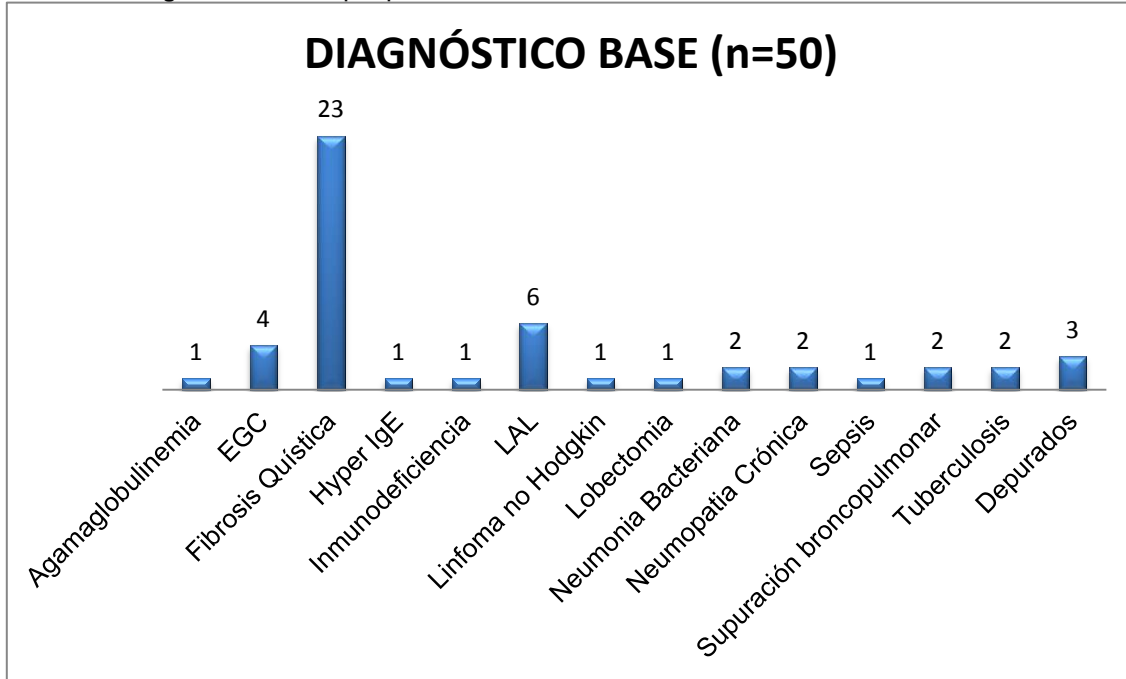
Gráfica 1 Porcentaje de pacientes según el género.



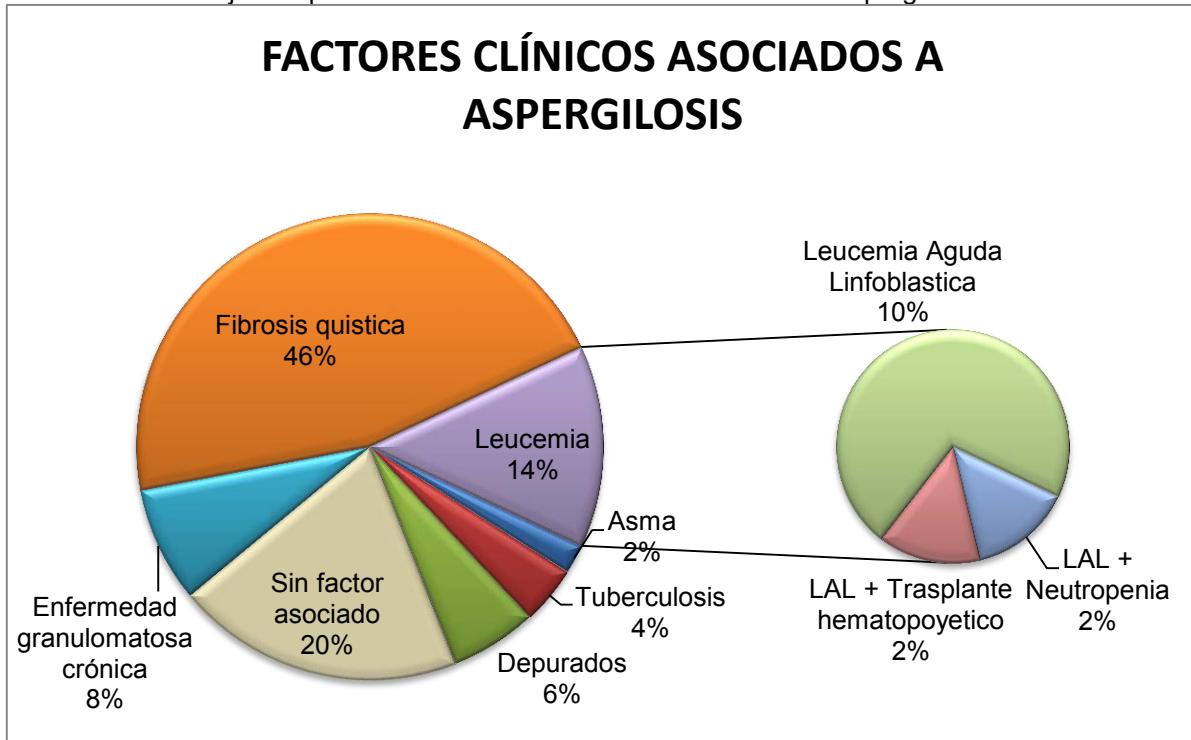
Gráfica 2 Edad de los pacientes expresados en años cumplidos



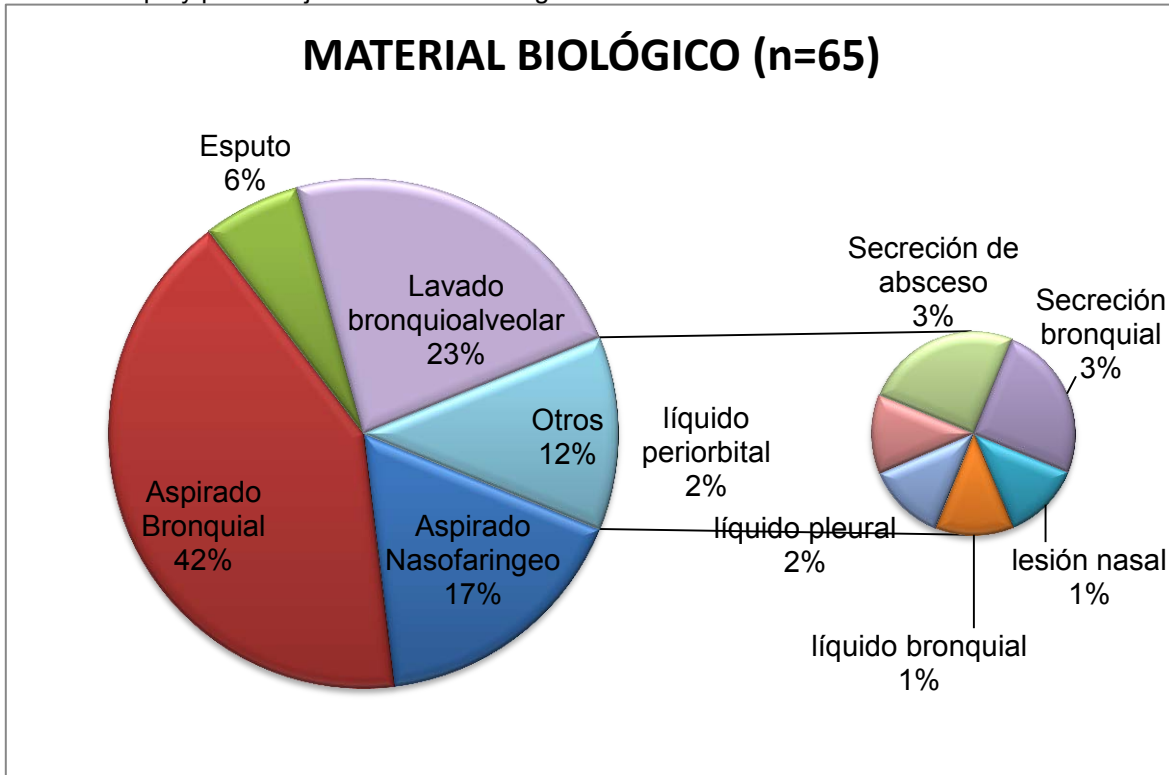
Gráfica 3 Diagnóstico base que presentaban los individuos.



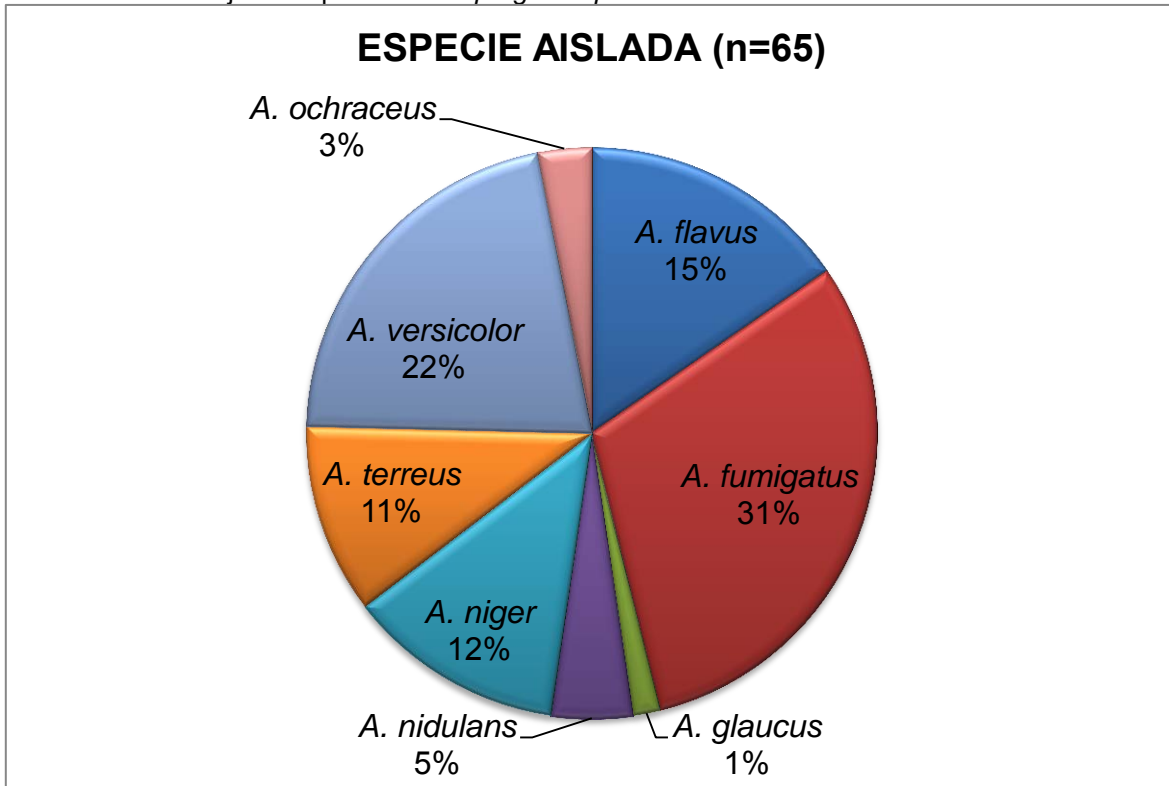
Gráfica 4 Porcentaje de aparición de los factores clínicos asociados a aspergilosis.



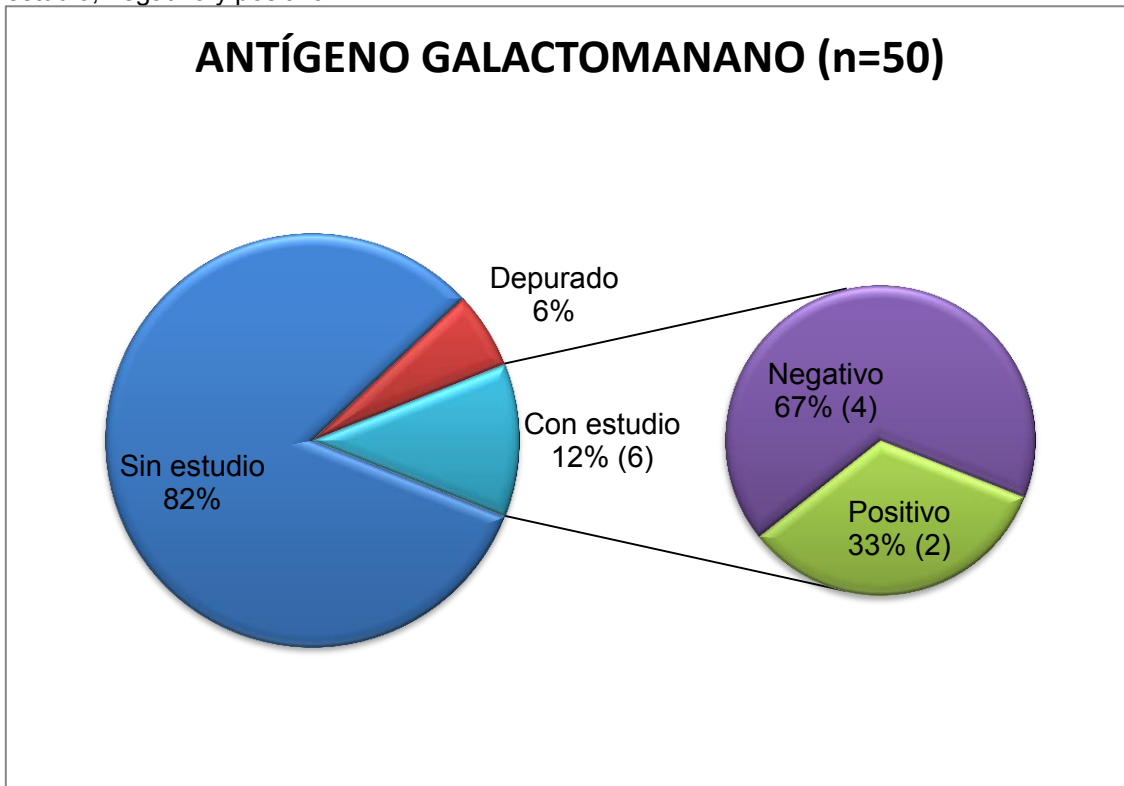
Gráfica 5 Tipo y porcentaje del material biológico estudiado.



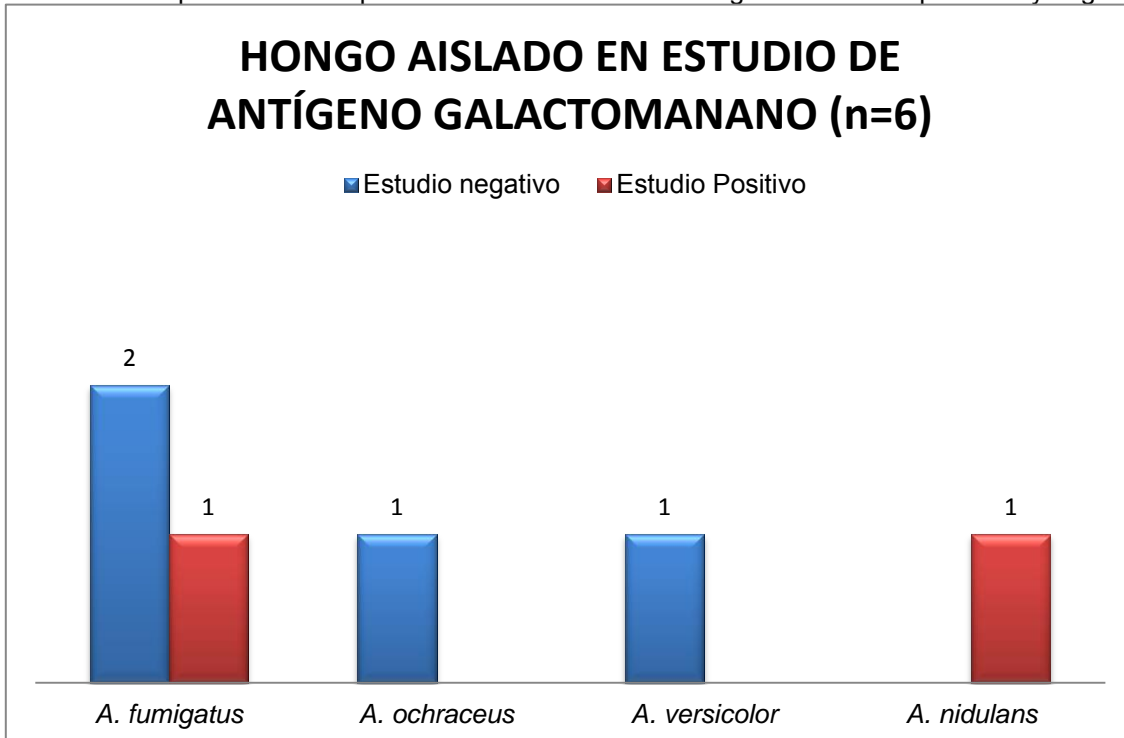
Gráfica 6 Porcentaje de especies de *Aspergillus sp* aisladas en el estudio.



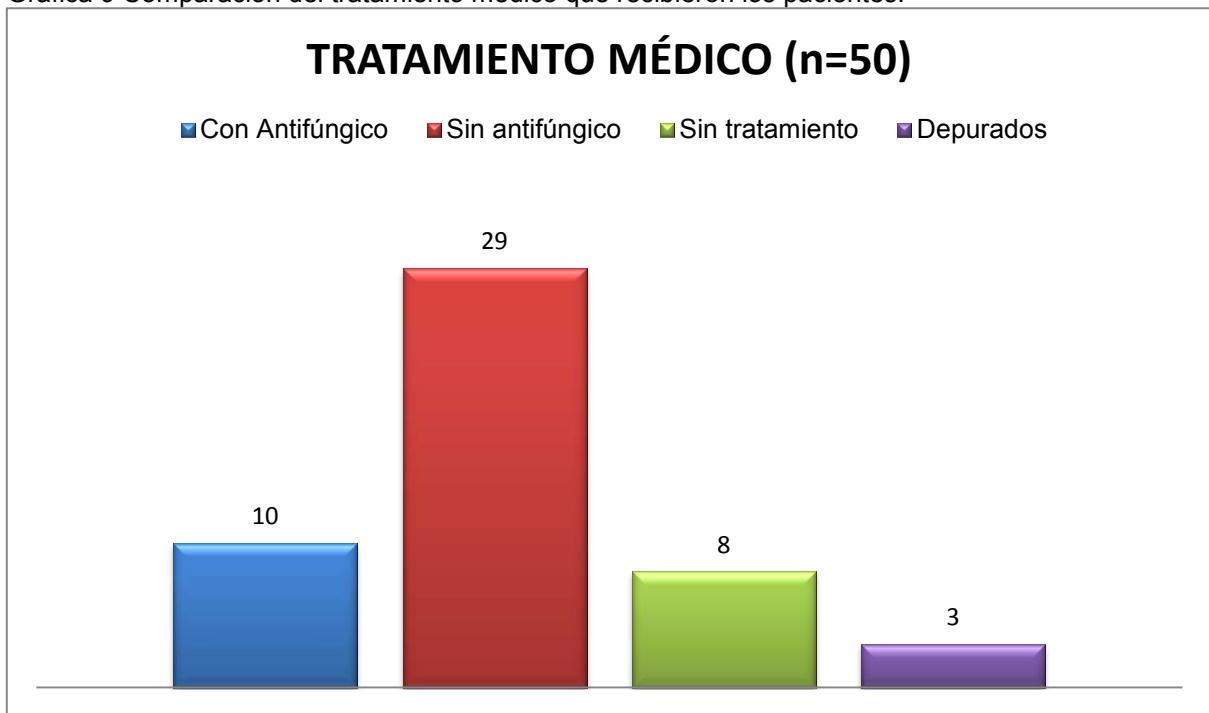
Gráfica 7 Inmunoensayos de antígeno galactomanano divididos por grupos: sin estudio, con estudio; negativo y positivo.



Gráfica 8 Comparación de especies aisladas en estudios de galactomanano positivos y negativos.



Gráfica 9 Comparación del tratamiento médico que recibieron los pacientes.



Cuadro 11. Antifúngicos usados de acuerdo a la especie aislada.

Especie	Antifúngicos	Dosis	Diagnostico	Desenlace	Sensibilidad obtenida							
					PZ	AB	FZ	IZ	KZ	FC	VOR	CAS
<i>A. ochraceus</i>	Anfotericina B	18mg/24h	LAL, Sepsis grave con foco pulmonar	Falla terapéutica y defunción por sangrado de tubo digestivo	0.12	2	> 256	0.06	8	2	0.5	> 16
<i>A. fumigatus</i>	Anfotericina B	90mg/24 h	ONCO, TB, Pielonefritis por <i>C.albicans</i>	Alta por mejoría	0.015	2	> 256	0.03	4	> 64	0.25	> 16
<i>A. fumigatus</i>	Caspofungina	55mg/24h	EGC, Aspergilosis vertebral torácica	Falla terapéutica y defunción del paciente por taquicardia ventricular	0.03	2	> 256	0.06	8	> 64	0.25	> 16
<i>A. fumigatus</i>	Fluconazol	6mg/kg/día	Osteosarcoma, Neumonía bacteriana	Alta por mejoría	< 0.008	2	256	< 0.008	2	> 64	0.12	> 16
<i>A. terreus</i>	Fluconazol	100mg/24h VO	Neumopatía crónica, Síndrome de hiper IgE	Alta por mejoría	0.03	2	> 256	0.03	1	> 64	0.25	> 16
<i>A. niger</i>	Itraconazol	5mg/kg/dia	Fibrosis quística, ABPA	Alta por mejoría	0.03	2	256	0.06	2	64	0.12	> 16
<i>A. fumigatus</i>	Voriconazol	75mg/12h	EGC, Neumonia necrotizante por <i>Actinomyces israelii</i>	Falla terapéutica y defunción del paciente por insuficiencia respiratoria aguda	0.03	2	> 256	0.03	2	> 64	0.5	> 16
<i>A. flavus</i>	Voriconazol + Anfotericina B	270mg/12h / 38mg/7h	LAL, Neumonía por <i>Aspergillus sp</i>	Falla terapéutica y defunción por hemorragia pulmonar	0.06	2	256	0.06	1	16	0.25	> 16
<i>A. nidulans</i>	Voriconazol + Anfotericina B	60mg/12h / 15mg/4h	Linfoma no Hodgkin, Neumonía por <i>Aspergillus sp</i>	Falla terapéutica y defunción por hemorragia pulmonar	0.03	2	> 256	0.03	0.12	> 64	0.12	> 16
<i>A. versicolor</i>	Voriconazol + Anfotericina B + Caspofungina	90mg/12h / 10mg/24h / 50mg/24h	EGC, Aspergilosis pulmonar	Falla terapéutica y defunción por hemorragia pulmonar	0.25	2	> 256	0.25	2	> 64	1	> 16

Cuadro 12.1 Rangos y medias geométricas(MG) de las CMI's obtenidas con posaconazol para las diferentes especies de *Aspergillus sp.*

Especies (n)	Posaconazol	
	CMI (µg/mL)	
	MG	Rango
<i>A. flavus</i> (10)	0.045	0.015 - 0.12
<i>A. fumigatus</i> (20)	0.021	≤0.008 - 0.03
<i>A. glaucus</i> (1)	0.015	0.015
<i>A. nidulans</i> (3)	0.019	0.015 - 0.03
<i>A. niger</i> (8)	0.039	0.03 - 0.06
<i>A. terreus</i> (7)	0.041	0.03 - 0.25
<i>A. versicolor</i> (14)	0.148	0.06 - 1
<i>A. ochraceus</i> (2)	0.173	0.12 - 0.25

Cuadro 12. 2 Rangos y medias geométricas (MG) de las CMI's obtenidas con anfotericina B para las diferentes especies de *Aspergillus sp.*

Especies (n)	Anfotericina B	
	CMI (µg/mL)	
	MG	Rango
<i>A. flavus</i> (10)	2.46	2 - 4
<i>A. fumigatus</i> (20)	1.87	1 - 2
<i>A. glaucus</i> (1)	2.00	2
<i>A. nidulans</i> (3)	2.00	2
<i>A. niger</i> (8)	1.83	1 - 2
<i>A. terreus</i> (7)	2.21	2 - 4
<i>A. versicolor</i> (14)	2.21	1 - 4
<i>A. ochraceus</i> (2)	2.83	2 - 4

Cuadro 12.3 Rangos y medias geométricas (MG) de las CMI's obtenidas con fluconazol para las diferentes especies de *Aspergillus sp.*

Especies (n)	Fluconazol	
	CMI (µg/mL)	
	MG	Rango
<i>A. flavus</i> (10)	256	256 - >256
<i>A. fumigatus</i> (20)	>256	256 - >256
<i>A. glaucus</i> (1)	>256	>256
<i>A. nidulans</i> (3)	203	123 - >256
<i>A. niger</i> (8)	>256	256 - >256
<i>A. terreus</i> (7)	>256	256 - >256
<i>A. versicolor</i> (14)	>256	>256
<i>A. ochraceus</i> (2)	>256	>256

Cuadro 12.4 Rangos y medias geométricas (MG) de las CMI's obtenidas con itraconazol para las diferentes especies de *Aspergillus sp.*

Especies (n)	Itraconazol	
	CMI (µg/mL)	
	MG	Rango
<i>A. flavus</i> (10)	0.056	0.03 - 0.25
<i>A. fumigatus</i> (20)	0.044	≤0.008 - 0.06
<i>A. glaucus</i> (1)	0.060	0.06
<i>A. nidulans</i> (3)	0.024	0.015 - 0.03
<i>A. niger</i> (8)	0.111	0.03 - 0.25
<i>A. terreus</i> (7)	0.033	0.015 - 0.12
<i>A. versicolor</i> (14)	0.587	0.06 - 16
<i>A. ochraceus</i> (2)	0.122	0.06 - 0.25

Cuadro 12.5 Rangos y medias geométricas (MG) del CMI obtenidas con ketoconazol para las diferentes especies de *Aspergillus sp.*

Especies (n)	Ketoconazol	
	CMI (µg/mL)	
	MG	Rango
<i>A. flavus</i> (10)	1.00	0.5 - 2
<i>A. fumigatus</i> (20)	4.14	1 - >16.
<i>A. glaucus</i> (1)	4.00	4
<i>A. nidulans</i> (3)	0.10	0.06 - 0.12
<i>A. niger</i> (8)	4.76	1 - 16
<i>A. terreus</i> (7)	1.81	1 - 8
<i>A. versicolor</i> (14)	1.35	0.5 - 4
<i>A. ochraceus</i> (2)	11.31	8 ->16

Cuadro 12.6 Rangos y medias geométricas (MG) del CMI obtenidas con 5-fluorocitosina para las diferentes especies de *Aspergillus sp.*

Especies (n)	5-Fluorocitosina	
	CMI (µg/mL)	
	MG	Rango
<i>A. flavus</i> (10)	55.7	16 - >64
<i>A. fumigatus</i> (20)	>64	>64
<i>A. glaucus</i> (1)	16.0	16
<i>A. nidulans</i> (3)	>64	>64
<i>A. niger</i> (8)	22.6	8 - >64
<i>A. terreus</i> (7)	35.3	1 - >64
<i>A. versicolor</i> (14)	47.6	16 - >64
<i>A. ochraceus</i> (2)	5.7	2 - 16

Cuadro 12.7 Rangos y medias geométricas (MG) del CMI obtenidas con voriconazol para las diferentes especies de *Aspergillus sp.*

Especies (n)	Voriconazol	
	CMI (µg/mL)	
	MG	Rango
<i>A. flavus</i> (10)	0.41	0.25 - 1
<i>A. fumigatus</i> (20)	0.22	0.12 - 0.5
<i>A. glaucus</i> (1)	1.00	1
<i>A. nidulans</i> (3)	0.08	0.06 - 0.12
<i>A. niger</i> (8)	0.42	0.125 - 2
<i>A. terreus</i> (7)	0.34	0.25 - 0.5
<i>A. versicolor</i> (14)	0.64	0.25 - 2
<i>A. ochraceus</i> (2)	0.71	0.5 - 1

Cuadro 12.8 Rangos y medias geométricas (MG) del CMI obtenidas con caspofungina para las diferentes especies de *Aspergillus sp.*

Especies (n)	Caspofungina	
	CMI (µg/mL)	
	MG	Rango
<i>A. flavus</i> (10)	>16	>16
<i>A. fumigatus</i> (20)	>16	>16
<i>A. glaucus</i> (1)	0.008	0.008
<i>A. nidulans</i> (3)	>16	>16
<i>A. niger</i> (8)	>16	>16
<i>A. terreus</i> (7)	>16	>16
<i>A. versicolor</i> (14)	8.81	0.015 - >16
<i>A. ochraceus</i> (2)	>16	>16

Cuadro 13. Propuesta del cuadro de sensibilidades

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	POS	PZ 0.008	PZ 0.015	PZ 0.03	PZ 0.06	PZ 0.12	PZ 0.25	PZ 0.5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	Posaconazol
B	AB 0.008	AB 0.015	AB 0.03	AB 0.06	AB 0.12	AB 0.25	AB 0.5	AB 1	AB 2	AB 4	AB 8	AB 16	Anfotericina B
C	FZ 0.12	FZ 0.25	FZ 0.5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256	Fluconazol
D	IZ 0.008	IZ 0.015	IZ 0.03	IZ 0.06	IZ 0.12	IZ 0.25	IZ 0.5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	Itraconazol
E	KZ 0.008	KZ 0.015	KZ 0.03	KZ 0.06	KZ 0.12	KZ 0.25	KZ 0.5	KZ 1	KZ 2	KZ 4	KZ 8	KZ 16	Ketoconazol
F	FC 0.03	FC 0.06	FC 0.12	FC 0.25	FC 0.5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	5-Fluorocitocina
G	VOR 0.008	VOR 0.015	VOR 0.03	VOR 0.06	VOR 0.12	VOR 0.25	VOR 0.5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	VOR 16	Voriconazol
H	CAS 0.008	CAS 0.015	CAS 0.03	CAS 0.06	CAS 0.12	CAS 0.25	CAS 0.5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	CAS 16	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL.

	Sensibles		Intermedios		Resistentes
--	-----------	--	-------------	--	-------------

Figura 3.1 Porcentajes de aparición del punto de corte de la CIM para cada especie de *Aspergillus sp* en la placa de sensibilidad

Aspergillus fumigatus (n=20)

5% ≤0.008	100% POS	0.008	40% 0.015	55% 0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	>8	Posaconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	10% 1	90% 2	4	8	16	>16	Anfotericina B
≤0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	5% >256	Fluconazol
5% ≤0.008	0.008	0.015	30% 0.03	65% 0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	Itraconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	5% 1	5% 2	75% 4	10% 8	16	5% >16	Ketoconazol
≤0.03	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	100% >64	5-Fluorocitocina
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	20% 0.12	75% 0.25	5% 0.5	1	2	4	8	16	>16	Voriconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	100% >16	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL

	Rango de la CIM		Crecimiento positivo		Crecimiento negativo
--	-----------------	--	----------------------	--	----------------------

Figura 3.2 Porcentajes de aparición del punto de corte de la CIM para cada especie de *Aspergillus sp* en la placa de sensibilidad

Aspergillus versicolor (n=14)

≤0.008	100% POS	0.008	0.015	0.03	21.5% 006	50% 0.12	14.3% 0.25	7.1% 0.5	7.1% 1	2	4	8	>8	Posaconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	14.3% 1	57.1% 2	28.6% 4	8	16	>16	Anfotericina B
≤0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	100% >256	Fluconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	7% 006	43% 0.12	21.5% 0.25	7% 0.5	1	2	4	8	16	21.5% >16	Itraconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	006	0.12	0.25	21.4% 0.5	35.7% 1	21.4% 2	21.4% 4	8	16	>16	Ketoconazol
≤0.03	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	14.3% 16	14.3% 32	14.3% 64	57.1% >64	5-Fluorocitocina
≤0.008	0.008	0.015	0.03	006	0.12	14.3% 0.25	42.9% 0.5	35.7% 1	7.1% 2	4	8	16	>16	Voriconazol
≤0.008	0.008	7.1% 0.015	0.03	006	0.12	0.25	0.5	1	2	7.1% 4	8	7.1% 16	78.7% >16	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL

	Rango de la CIM		Crecimiento positivo		Crecimiento negativo
--	-----------------	--	----------------------	--	----------------------

Figura 3.4 Porcentajes de aparición del punto de corte de la CIM para cada especie de *Aspergillus sp* en la placa de sensibilidad

Aspergillus niger (n=8)

≤0.008	100% POS	0.008	0.015	62.5% 0.03	37.5% 0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	>8	Posaconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	12.5% 1	87.5% 2	4	8	16	>16	Anfotericina B
≤0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	12.5% 256	87.5% >256	Fluconazol
≤0.008	0.008	0.015	12.5% 0.03	12.5% 0.06	50% 0.12	25% 0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	Itraconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	12.5% 1	12.5% 2	37.5% 4	12.5% 8	25% 16	>16	Ketoconazol
≤0.03	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	25% 8	37.5% 16	25% 32	12.5% 64	>64	5-Fluorocitocina
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	12.5% 0.12	37.5% 0.25	25% 0.5	12.5% 1	12.5% 2	4	8	16	>16	Voriconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	100% Caspofungina

Concentraciones en µg/mL

	Rango de la CIM		Crecimiento positivo		Crecimiento negativo
--	-----------------	--	----------------------	--	----------------------

Figura 3.5 Porcentajes de aparición del punto de corte de la CIM para cada especie de *Aspergillus sp* en la placa de sensibilidad

Aspergillus terreus (n=7)

≤0.008	100% POS	0.008	0.015	85.7% 0.03	0.06	0.12	14.3% 0.25	0.5	1	2	4	8	>8	Posaconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	85.7% 2	14.3% 4	8	16	>16	Anfotericina B
≤0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	85.7% >256	Fluconazol
≤0.008	0.008	14.3% 0.015	71.4% 0.03	0.06	14.3% 0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	Itraconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	42.9% 1	42.9% 2	4	14.2% 8	16	>16	Ketoconazol
≤0.03	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	14.3% 1	2	4	8	16	32	64	85.7% >64	5-Fluorocitocina
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	57.1% 0.25	42.9% 0.5	1	2	4	8	16	>16	Voriconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	100% >16	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL

	Rango de la CIM		Crecimiento positivo		Crecimiento negativo
--	-----------------	--	----------------------	--	----------------------

Figura 3.6 Porcentajes de aparición del punto de corte de la CIM para cada especie de *Aspergillus sp* en la placa de sensibilidad

Aspergillus nidulans (n=3)

≤0.008	100% POS	0.008	67%	33%	0.006	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	>8	Posaconazol	
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	100%	1	2	4	8	16	>16	Anfotericina B
≤0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	33%	128	256	67%	Fluconazol
≤0.008	0.008	33%	67%	0.006	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	Itraconazol	
≤0.008	0.008	0.015	0.03	33%	67%	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	Ketoconazol
≤0.03	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	100%	>64	5-Fluorocitocina
≤0.008	0.008	0.015	0.03	67%	33%	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	Voriconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.006	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	100%	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL

	Rango de la CIM		Crecimiento positivo		Crecimiento negativo
--	-----------------	--	----------------------	--	----------------------

Figura 3.7 Porcentajes de aparición del punto de corte de la CIM para cada especie de *Aspergillus sp* en la placa de sensibilidad

Aspergillus ochraceus (n=2)

≤0.008	100% POS	0.008	0.015	0.03	0.06	50% 0.12	50% 0.25	0.5	1	2	4	8	>8	Posaconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	50% 2	50% 4	8	16	>16	Anfotericina B
≤0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	100% >256	Fluconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	50% 0.06	0.12	50% 0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	Itraconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	50% 8	16	50% >16	Ketoconazol
≤0.03	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	50% 2	4	8	50% 16	32	64	>64	5-Fluorocitocina
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	50% 0.5	50% 1	2	4	8	16	>16	Voriconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	100% >16	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL

	Rango de la CIM		Crecimiento positivo		Crecimiento negativo
--	-----------------	--	----------------------	--	----------------------

Figura 3.8 Porcentajes de aparición del punto de corte de la CIM para cada especie de *Aspergillus sp* en la placa de sensibilidad

Aspergillus glaucus (n=1)

≤0.008	100% POS	0.008	100% 0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	>8	Posaconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	100% 2	4	8	16	>16	Anfotericina B
≤0.12	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	100% >256	Fluconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	100% 0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	Itraconazol
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	100% 4	8	16	>16	Ketoconazol
≤0.03	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	100% 16	32	64	>64	5-Fluorocitocina
≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	100% 1	2	4	8	16	>16	Voriconazol
100% ≤0.008	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL

	Rango de la CIM		Crecimiento positivo		Crecimiento negativo
--	-----------------	--	----------------------	--	----------------------

Figura 4.1 Porcentaje de aparición del punto de corte en el patrón estándar de control de calidad

Candida parapsilosis ATCC 22019 (n=9)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	100				100	0	0						Posaconazol
B						11	57	22	0				Anfotericina B
C				11	89	0	0						Fluconazol
D					100	0	0						Itraconazol
E			0	56	33	11							Ketoconazol
F			11	22	44								5-Fluorocitocina
G		67	22	11	0								Voxiconazol
H						0	67	22	11				Caspofungina

Figura 4.2 Porcentaje de aparición del punto de corte en el patrón estándar de control de calidad

Candida krusei ATCC 6258 (n=9)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	100				0	100	0	0					Posaconazol
B							89	0	11				Anfotericina B
C							0	22	78	0			Fluconazol
D					56	44	0	0					Itraconazol
E					11	78	11	0					Ketoconazol
F								44	56	0			5-Fluorocitocina
G				0	67	33	0						Voxiconazol
H					0	56	44	0					Caspofungina

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En los resultados de la gráfica 1 se puede observar que de 50 pacientes estudiados el 66% (n=33) de estos son del género masculino mientras que el porcentaje restante 34% (n=17) son del género femenino, en la gráfica 2 que corresponde a la edad se puede observar una amplia distribución que va desde los menores de un año hasta los 18 años, abarcando así las etapas de la vida que va desde la infancia hasta la juventud.

Sin embargo estos datos no son representativos de que la enfermedad aparezca con una inclinación hacia el género o la edad, esto debido a que ningún autor ha mencionado el género como un factor de riesgo o factor predisponente para contraer la enfermedad. En cuanto a la edad, no hay una distribución que muestra que en determinada etapa puede o es más común contraer la enfermedad.

Todo lo anterior se debe a que la infección por *Aspergillus sp* dependerá del estado del paciente, es decir que un paciente clínicamente sano tendrá menos factores de riesgo para contraer la enfermedad que un paciente con un estado inmunológico comprometido o que esté cursando con una enfermedad que disminuya el estado inmunológico del paciente.

Precisamente en la gráfica 3 se muestra el diagnóstico base de los pacientes, en la cual se puede observar que el mayor porcentaje 46% (n=23) corresponde a fibrosis quística que está asociada a la aspergilosis broncopulmonar alérgica y que a su vez, conforme a la literatura, es una afectación que va del 6 al 25% de los pacientes que cursan con un cuadro de fibrosis quística. El resto de los diagnósticos son variados e incluyen algunas enfermedades en las que es relativamente fácil adquirir una aspergilosis secundaria al diagnóstico base. Entre ellas se encuentran la enfermedad granulomatosa crónica, inmunodeficiencia, leucemia, tuberculosis, entre otras.

También se puede observar en la gráfica número 4 algunos de los distintos factores clínicos asociados a aspergilosis que se pudieron recabar del estudio de los expedientes. En este caso, algunos de los factores, son la enfermedad misma del diagnóstico base, por ejemplo la fibrosis quística vuelve a ocupar el sitio con mayor porcentaje 46% (n=23) y aparecen una vez más enfermedad granulomatosa crónica y leucemias, también observamos un 20% (n=10) que no posee algún factor asociado, esto quiere decir, que probablemente no desarrolle alguna enfermedad por *Aspergillus sp*, y por la técnica de toma de muestra se

puede decir que las conidias de *Aspergillus sp* están en su organismo en un estado inocuo.

En la gráfica 5 referente al material biológico, se observa que de un total de 65 muestras el 42% (n=27) corresponden a aspirados bronquiales (AB), en segundo lugar por los lavados bronquioalveolares (LBA) con un 23% (n=15), ambas técnicas son de gran importancia al momento de obtener información acerca de los constituyentes celulares y bioquímicos de la superficie del tracto respiratorio inferior así como de infiltrados pulmonares, la técnica consiste en la introducción por goteo y posterior extracción de solución fisiológica llevando con ella las secreciones pulmonares.

La importancia del uso de estas dos técnicas radica en que se disminuye la incertidumbre de una contaminación al momento de la toma, ya que extraen de manera estéril el contenido de los pulmones.

Continuando con el material biológico los aspirados nasofaríngeos (ANF) ocupan un 17% (n=11) mientras que los esputos 6%(n=4) y otras secreciones 12% (n=8).

Los resultados demostrados la gráfica 6 indican los porcentajes de las especies de *Aspergillus sp* aislados en las muestras biológicas, en dicha grafica se puede observar que el mayor porcentaje lo ocupa *A. fumigatus* con un 31%(n=20) del total, que precisamente corresponde a los datos encontrados en otros estudios donde se ha demostrado que *A. fumigatus* es la principal especie aislada, el 40% de los cultivos se obtuvieron a partir de AB, mientras que el 25% eran provenientes de LBA, el 35% restante se trataba de líquidos varios. El segundo porcentaje más alto es obtenido por *A. versicolor* 22% (n=14), que si bien puede causar infecciones pulmonares es poco común que llegue a lograrlo, por ello este resultado es muy importante ya que se trata de una especie emergente y que no ha sido reportada con tanta frecuencia en otros estudios, el 43% de cultivos de este género fueron obtenidos de muestras de LBA, el 29% en AB y un 7% de ANF.

La siguiente especie en frecuencia es *A. flavus*, el cual ocupa un 15% (n=10), varios autores reportan esta especie como la segunda más frecuente sin embargo en este estudio se encontró que fue desplazada. Las muestras de las que se aisló esta especie son 70% en AB y el otro 30% de ANF y una lesión nasal lo que corresponde con la literatura²⁰ ya que es común encontrarlo en pulmón y en la zona nasal. *A. niger* fue aislado en un 12%(n=8) de la totalidad de muestras, los cultivos provenían en un 25% de LBA, 15.5 de AB, 25% de ANF y 37.5% de esputo. *A. terreus* conto con un 11% (n=7) siendo un 71% encontrados en AB y el restante 29% de ANF.

A. nidulans ocupó el 6° lugar con un 5% (n=3) y fue aislado en 2 muestras de LBA y una de AB. *A. ochraceus* se aisló en 3%(n=2) de las muestras, un ANF y un AB, y *A. glaucus* 1%(n=1) solo fue aislado en un ANF.

En cuanto a las técnicas inmunológicas para la detección de *Aspergillus sp* únicamente el laboratorio cuenta con la técnica de antígeno galactomanano la cual como se observa en la gráfica número 7 al 82% (n=41) de los pacientes no se les realizó el estudio, el 6% no tiene dicha información puesto que sus expedientes habían sido depurados y solo el 12% (n=6) de los casos tiene estudios para la detección de galactomanano. De ese 12 %, el 67%(n=4) de los estudios corresponden a un resultado negativo, mientras que el 33%(n=2) son resultados positivos (dos detecciones >0.5 en suero).

Las especies aisladas aparecen en la gráfica 8, como se puede observar, en los estudios con antígeno galactomanano negativo se recuperaron cepas de *A. fumigatus* en 2 ocasiones, *A. ochraceus* y *A. versicolor* en una ocasión, mientras que para los resultados positivos las especies aisladas fueron *A. fumigatus* y *A. nidulans*.

En solo uno de los casos negativos se puede sospechar de un falso negativo ya que el paciente tenía un tratamiento profiláctico donde se usaba voriconazol anfotericina b y caspofungina, este último, cotejando con la literatura³⁴, puede ocasionar una interferencia con el estudio y dar un falso negativo.

Hablando del tratamiento que se les dio a los pacientes(grafica 9), después de la revisión de una muestra de 50 expedientes, 29 no recibieron un tratamiento antifúngico, 8 no recibieron tratamiento de ningún tipo y 3 expedientes estaban depurados, los 10 restantes corresponden a los pacientes que si recibieron tratamiento con antifúngico, la función de esta búsqueda de tratamientos fue la de observar cuantas cepas de las que se aislaron tenían un tratamiento previo con antifúngico, ya que dicho tratamiento puede afectar la prueba de sensibilidad y resultar en un patrón de sensibilidad alterado. Dentro de los pacientes que recibieron terapia antifungica (grafica 10), cabe destacar que 4 pacientes tuvieron un tratamiento que incluía caspofungia y/o fluconazol, antifúngicos a los cuales el punto de corte de la CMI resulto mayor al intervalo establecido por la placa de sensibilidad.

Por lo anterior mencionado se puede apreciar que solo 6 cepas estuvieron en contacto con algún antifúngico que modificara su patrón de sensibilidad, sin embargo al revisar los resultados se observa que no hay variación entre los resultados de esas cepas con las demás de su mismo género en cuanto al antifúngico que recibió. En el caso de *Aspergillus ochraceus*, no se puede hacer

dicha comparación dado que solo se aisló una cepa y el paciente fue tratado con anfotericina B. Las cepas aisladas en las cuales se trató al paciente se pueden apreciar en la tabla 7 así como los antifúngicos con los cuales fueron tratados.

Lo importante de este trabajo recae en dar a conocer los rangos de las CMI's de cada especie de *Aspergillus sp* aislada para cada antifúngico que se usó.

Las pruebas realizadas dieron como resultado los datos que se encuentran en los cuadros 9.1 a 9.8 en las cuales se registraron por antifúngico los rangos que se obtuvieron para cada especie de *Aspergillus sp* así como la media geométrica de cada uno.

En el cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos de las sensibilidades de las cepas de los pacientes que recibieron terapia antifúngica, en color rojo se demuestran los casos mortales, en color amarillo el antifúngico al cual resulto sensible la cepa y en verde el tratamiento que había recibido el paciente. Para todos los casos, de manera *In-vitro* se encontró que los antifúngicos a los cuales eran sensibles las cepas fueron el Posaconazol e itraconazol ya que son los que necesitan una concentración menor para alcanzar la inhibición del crecimiento.

Para el caso del fluconazol en el 70% de los casos las CMI fueron mayores del punto máximo de 256 µg/mL en la placa, sin embargo en las dos ocasiones en que se utilizó este antifúngico el desenlace de los pacientes fue favorable, esto puede ser por que el cuadro clínico que presentaban era de origen bacteriano y quizás el hongo aislado únicamente se encontraba como comensal, es por esto que a pesar de que se presentó una marcada resistencia a este antifúngico la evolución del paciente fue adecuada.

Los cinco pacientes en quienes se utilizó anfotericina B fueron resistentes a esta, con una CIM de 2 µg/mL, uno de ellos tuvo una evolución satisfactoria con resolución del proceso infeccioso, quien clínicamente tenía una pielonefritis por *Candida sp*. los otros cuatro paciente fallecieron, dos de estos recibieron también voriconazol con sensibilidad de 0.12 y 0.25 µg/mL. El otro paciente contaba con un tiple esquema con anfotericina B + voriconazol + caspofungina, siendo resistente a los 3 antifúngicos, hubo un paciente con aspergilosis vertebral torácica que recibió monoterapia con caspofungina a la que era resistente el cual tuvo un desenlace mortal.

Uno de los pacientes recibió monoterapia con voriconazol y a pesar de que se trató con el antifúngico al cual el hongo presento una mejor sensibilidad, falleció debido a un cuadro de neumonía necrotizante por *Actinomyces israelii*.

Otro paciente más el cual tenía diagnóstico confirmado de fibrosis quística y ABPA fue tratado con itraconazol, sin embargo en éste el hongo se encontró únicamente como comensal, por lo que la evolución del paciente fue favorable.

Posaconazol.

Los rangos obtenidos para este antifúngico difieren considerablemente entre especies y estos a su vez con los reportados por otros autores, para *A. fumigatus*, el rango obtenido fue de $\leq 0.008 - 0.03 \mu\text{g/mL}$ y los reportados por varios autores abarcan $0.03 - 2 \mu\text{g/mL}$ siendo el rango obtenido menor al reportado. En relación *A. versicolor*, muy pocos estudios han reportado su aparición, por lo cual es menos común contar con sus rangos de sensibilidad, es aquí entonces de gran importancia conocer el rango de este y todos los antifúngicos con los cuales se trabajó, el rango encontrado fue de $0.06 - 1 \mu\text{g/mL}$ mientras que un autor reporta^{51, 52} $0.25 - 1 \mu\text{g/mL}$, en el cual ambos coinciden en el límite superior. En *A. flavus* resultó un rango $0.015 - 0.12 \mu\text{g/mL}$ mientras los autores reportan $0.12 - 1 \mu\text{g/mL}$ ^{51, 52} aquí se observa que el rango obtenido es menor al reportado, caso similar para con *A. niger* cuyo rango fue de $0.03 - 0.06 \mu\text{g/mL}$ y el encontrado por otros autores es de $0.25 - 1 \mu\text{g/mL}$ ^{51, 52}. El rango *A. terreus* fue de $0.03 - 0.25 \mu\text{g/mL}$ el cual es muy similar por el reportado por los autores de $0.06 - 0.25 \mu\text{g/mL}$ ^{51, 52}. Para las especies de *A. nidulans*, *A. ochraceus* y *A. glaucus* no se hallaron valores reportados en la bibliografía, sin embargo en el presente trabajo se reportan valores de $0.015 - 0.03 \mu\text{g/mL}$, $0.12 - 0.25 \mu\text{g/mL}$ y $0.015 \mu\text{g/mL}$, en el caso de *A. glaucus* al contar únicamente con un aislamiento se reporta el punto de corte obtenido.

Anfotericina B.

En este antifúngico, el rango para *A. fumigatus* obtenido fue de $1 - 2 \mu\text{g/mL}$ que se encuentra dentro del rango reportado por algunos autores que es de $0.06 - 8 \mu\text{g/mL}$ ^{51, 52} donde el 90% de los puntos de corte aparecieron en la concentración de $2 \mu\text{g/mL}$. *A. versicolor* presentó un rango de $1 - 4 \mu\text{g/mL}$ con una CMI de $2 \mu\text{g/mL}$ en el 57% de los casos, el autor menciona un rango de $1 - 2 \mu\text{g/mL}$ ^{51, 52}.

A. flavus con CMI de $2 \mu\text{g/mL}$ en un 70% resultó en un rango de $2 - 4 \mu\text{g/mL}$ mientras que el reportado es va desde $0.06 - 2 \mu\text{g/mL}$ ^{51, 52}. Por su parte *A. niger* cuyo rango obtenido fue de $1 - 2 \mu\text{g/mL}$ el cual difiere con los autores ya que estos manejan un rango que va de $0.12 - 1 \mu\text{g/mL}$ ^{51, 52}, cabe destacar que el 87.5% de las CMI's se encuentran en la concentración de $2 \mu\text{g/mL}$. *A. terreus* presenta un rango de $2 - 4 \mu\text{g/mL}$ con un 85.7% de las CMI's en $2 \mu\text{g/mL}$, en la bibliografía presenta un rango de $1 - 4 \mu\text{g/mL}$ ^{51, 52}. Para *A. glaucus*, el resultado fue de $2 \mu\text{g/mL}$, el cual es mucho mayor al reportado de $0.06 - 0.12 \mu\text{g/mL}$.

A. nidulans y *A. ochraceus* no cuentan con algún rango reportado en otros estudios, no obstante se hallaron como resultado de esta investigación que *A. nidulans* en el 100% de los aislamientos tuvo un resultado de 2 µg/mL y *A. ochraceus* 2 – 4 µg/mL.

En general se podría hablar de resistencia de estos hongos a la anfotericina B porque estudios han reportado que aislamientos con una CMI ≥ 2 µg/mL son asociados con fracaso en el tratamiento de aspergilosis invasiva^{51, 52}.

Fluconazol

En cuanto a este antifúngico se trata, en la presente investigación, no se encontraron datos sobre los rangos de la CMI reportados por otros autores, por lo cual solo se presentan los obtenidos durante la realización de este trabajo. *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. terreus* obtuvieron un rango de 256 – >256 µg/mL, con un 95%, 87.5% y 85.7% respectivamente, para el punto de corte de la CMI que se encuentra en concentraciones >256 µg/mL.

Para el caso *A. versicolor*, *A. glaucus* y *A. ochraceus* el 100% de las determinaciones de la CMI resultaron ser >256 µg/mL, mientras que *A. flavus* resultó en un rango de 256 – >256 µg/mL y 60% de las CMI en 256 µg/mL. El resultado para *A. nidulans* va de 123 – >256 µg/mL donde el 67% de la CMI se puede encontrar en >256 µg/mL.

Por los resultados de este estudio se observa que hay una resistencia a este antifúngico por parte de todas las especies de *Aspergillus* involucradas, ya que las concentraciones en donde aparecen las CMI se encuentran en el extremo más alto del intervalo para este antifúngico.

Itraconazol

A. fumigatus el resultado fue $\leq 0.008 - 0.06$ µg/mL con una aparición del 65% en la concentración del límite superior de 0.06 µg/mL mientras que el valor reportado es de $\leq 0.03 - 0.25$ µg/mL donde es mayor al que resultó en el estudio. Para *A. versicolor* el rango mencionado por el autor de 0.12 – 2 µg/mL, que, comparado con el resultado obtenido de 0.06 – 16 µg/mL, se observa una gran diferencia ya que el rango es muy amplio, sin embargo en 0.12 µg/mL es la concentración en donde apareció el mayor porcentaje, 43%, de los puntos de corte. En cuanto a *A. flavus* nos encontramos con que los rangos reportados y el resultante de este trabajo, son muy similares ya que el resultado fue 0.03 – 0.25 µg/mL y el reportado por otros autores fue $\leq 0.03 - 0.25$ µg/mL. El mayor porcentaje en el cual se encuentra la CMI es de 0.06 µg/mL el cual corresponde al 60% de las determinaciones, un caso similar ocurre con *A. niger* en el cual al comparar el

resultado de 0.03 – 0.25 µg/mL con el de la literatura de ≤0.03 – 0.25 µg/mL nos damos cuenta que son en extremo similares, cabe mencionar que en esta cepa, la CMI se obtuvo a la concentración de 0.12 µg/mL en un 50% de las muestras.

En cuanto a *A. terreus* el valor hallado en la investigación corresponde al rango de 0.015 – 0.12 µg/mL el cual es menor al valor de la bibliografía de 0.25 – 1 µg/mL, siendo además que en esta especie, el mayor porcentaje en cuanto al punto de corte se encuentra en los 0.03 µg/mL.

En el caso particular de *A. nidulans* y *A. ochraceus* no hay valores reportados sobre el intervalo en el que se presenta la CMI, los resultados obtenidos corresponden a intervalos bajos en el patrón de sensibilidad, 0.015 – 0.03 µg/mL y 0.06 – 0.25 µg/mL con un 67% de la CMI en 0.03 µg/mL para *A. nidulans* y 50% en los pocillos de 0.06 y 0.25 µg/mL para *A. ochraceus*.

A. glaucus, cuyo único valor es de 0.06 µg/mL el cual entra en el rango publicado en la literatura que es de ≤0.03 – 0.25 µg/mL.

Ketoconazol

Este antifúngico del grupo de los azólicos no cuenta con datos reportados en la bibliografía, por lo cual es de vital importancia dar a conocer los rangos obtenidos, que en el caso de *A. fumigatus* se encontró que va de 1 – >16 µg/mL en el cual el 75% de las CMI se encontró en la concentración de 4 µg/mL. En el rango de *A. flavus* de 0.5 – 2 µg/mL se encontró que el porcentaje de las CMI fue más o menos constante en las tres concentraciones que ocupa el rango, de la misma manera se presentaron los porcentajes de la CMI para *A. versicolor* cuyo rango es de 0.5 – 4 µg/mL.

A. niger presentó un rango muy amplio de 1 – 16 µg/mL el cual abarca la mayor parte de la zona con mayor concentración de antifúngico, en este caso el 37.5% fue mayor porcentaje de la CMI que se presentó en el pocillo de 4 µg/mL.

Por su parte, *A. terreus* demostró también tener un rango entre las concentraciones más altas de antifúngico, 1 – 8 µg/mL, sin embargo en estas determinaciones la CMI se encontró con igual porcentaje de 42.9% en dos pocillos que corresponden a 1 y 2 µg/mL.

A. nidulans fue el que presentó el menor rango en cuanto a concentraciones se trata, 0.06 – 0.12 µg/mL, con el 67% de las CMI's en 0.12 µg/mL, comparativamente *A. ochraceus* fue la especie con el rango de concentraciones más alto, el cual es de 8 – >16 µg/mL, aunque cabe mencionar que solo se realizaron dos determinaciones y el resultado fueron los límites del rango. Nuevamente para *A. glaucus* solo se encontró el único punto de corte de la CMI en 4 µg/mL.

5–Fluorocitosina

De igual manera que en caso anterior no se hallaron valores de referencia en cuanto a los rangos de sensibilidad para *Aspergillus sp*, así que se presentan los datos recabados de estas determinaciones. Cabe mencionar que para este antifúngico la mayoría de las especies estudiadas dieron un rango que se encontraba en la parte de mayor concentración del antifúngico, es así que los rangos de *A. fumigatus* y *A. nidulans* están fuera de la escala ya que el 100% de estas determinaciones dieron como resultado un valor >64 µg/mL.

En el caso de *A. flavus*, y *A. versicolor*, se encontró que ambos presentaron un rango de 16 – >64 µg/mL, y la CMI de estas se podrá encontrar en concentraciones >64 µg/mL, ya que respectivamente en 80% y 57% de las determinaciones el punto de corte se encuentra fuera de la escala.

A. niger muestra un rango de 8 – >64 µg/mL que si bien es alto, solo el 12.5% de los datos salen de la escala, mientras que el 37.5 % que es el mayor porcentaje obtenido en las determinaciones tiene un valor para la CMI de 16 µg/mL.

Propiamente *A. terreus* al igual que las especies anteriores presenta un rango que sale de la escala ya que este es 1 – >64 de igual forma, el mayor porcentaje de las determinaciones de sensibilidad, 85.7%, indican que el punto de corte de la CMI se encuentra por encima de los 64 µg/mL.

En el caso de *A. ochraceus* el rango de las concentraciones obtenidas es amplio, 2 – 16 µg/mL, sin embargo, al tener únicamente 2 aislamientos los puntos que representan los límites del rango son las únicas concentraciones en las cuales se obtuvo la CIM. De igual manera para *A. ochraceus* el único punto de corte es de 16 µg/mL.

Voriconazol

Con este azólico se encontró que los rangos de casi todas las especies estudiadas se encuentran en un punto medio de las concentraciones y parecidos entre las especies.

A. fumigatus posee un rango de 0.12 – 0.5 µg/mL el cual es menor, en su valor superior, al reportado de ≤0.03 – 4 µg/mL, para esta especie el 75% de la CMI aparece en el pocillo correspondiente a 0.25 µg/mL. Para las cepas de *A. versicolor* en las cuales se reporta un rango de 0.06 – 2 µg/mL el resultado obtenido en este trabajo es de 0.25 – 2 µg/mL, en este caso se observa que ambos coinciden en cuanto al valor superior del rango, el valor de la CMI de 0.5 µg/mL se halló en 42.9 % de las determinaciones el cual fue el mayor porcentaje en el rango.

A. flavus es otra especie que coincidió con el valor superior del rango ya que el valor que se halló es de 0.25 – 1 µg/mL y el de autores es de ≤0.008 – 1 µg/mL, el mayor porcentaje para la CMI de esta cepa es del 50% en 0.25 µg/mL.

En cuanto a *A. niger*, el rango es muy amplio el cual es 0.125 – 2 µg/mL, cabe destacar que los porcentajes están distribuidos muy similarmente, 37.5% de la CMI el cual fue el valor más alto, se localiza en el pocillo que corresponde a 0.25 µg/mL. Continuando con las especies tenemos a *A. terreus*, el cual posee un rango de 0.25 – 0.5 µg/mL y una CIM con 57% de las determinaciones en 0.25 µg/mL, este rango es muy similar al reportado por otros autores de 0.06 – 0.25 µg/mL.

Nuevamente para *A. nidulans* y *A. ochraceus* no se cuenta con datos bibliográficos sobre los rangos en los que se encuentra la CMI para este antifúngico. Los rangos hallados son 0.06 – 0.12 µg/mL y 0.5 – 1 µg/mL respectivamente, con una CIM que aparece el 67% de las determinaciones en 0.06 µg/mL para *A. nidulans*. El punto de corte de *A. glaucus* de 1 µg/mL se encuentra muy por fuera del rango propuesto por la bibliografía de 0.06 – 0.12 µg/mL^{51, 52}.

Caspofungina

Cabe mencionar que para éste antifúngico la literatura consultada muestra valores de Concentración Mínima Efectiva (CME) la que indica la concentración en donde se alcanza un estado fungistático, además que el manual de la técnica indica que no ha sido completamente establecida la correlación entre los valores de la CMI frente a la caspofungina, esto queda perfectamente claro en los resultados para este antifúngico, ya que en 6 de 8 cepas el 100% de punto de corte de la CMI es mayor a 16 µg/mL y en *A. versicolor* ocurre lo mismo con el 78.7%, hay que mencionar que el rango que se obtuvo de esta especie es muy amplio debido a que 1 resultado de las determinaciones fue inconsistente con los demás por la gran separación que hay entre este y el grupo.

La única especie que obtuvo el menor valor de CMI se trata de *A. glaucus*, cuyo único valor es ≤ 0.008 , sin embargo solo se tiene una determinación de esta especie pues solamente se aisló en una ocasión.

Control de calidad.

Los resultados en las figuras 3.1 y 3.2 muestran el control de calidad que se realizó con las dos cepas ATCC que establece el manual de la técnica. Los resultados muestran que para *C. parapsilosis* únicamente en dos ocasiones hubo un valor fuera del patrón estándar, mientras que para *C. krusei* todos los valores en todas las ocasiones se hallaron dentro del patrón, cabe mencionar que ambas cepas se procesaban conjuntamente para validar el control de calidad en caso de que un valor de alguna de ellas estuviera no conforme al patrón.

Se puede observar en el presente trabajo la importancia de llevar a cabo este tipo de estudios como parte de un diagnóstico integral, ya que se logró obtener el patrón de sensibilidad de varias especies de *Aspergillus* frente a determinados antifúngicos que no han sido reportadas por la literatura como para el caso de posaconazol las cepas de *A.nidulans*, *A.ochraceus* y *A. glaucus*, de los antifungicos itraconazol, voriconazol y anfotericina B con cepas de *A.nidulans* y *A. ochraceus*. De igual manera para el caso de fluconazol, ketoconazol y 5-fluorocitocina cuyos patrones de sensibilidad no han sido descritos en la literatura para ninguna de las especies de *Aspergillus* con las que se realizó el presente trabajo.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron satisfactoriamente los patrones de sensibilidad de antifúngicos para 7 de las 8 especies de *Aspergillus sp* con las que se trabajó.
- Se necesitan más muestras de *Aspergillus glaucus* para determinar correctamente su patrón de sensibilidad.
- Los datos obtenidos son valiosos ya que fueron obtenidos a partir de muestras de pacientes pediátricos.
- Los factores predisponentes son de vital importancia en este padecimiento, sobretodo la inmunodeficiencia y enfermedades concomitantes, ya que exponen al paciente a contraer cualquiera de las aspergilosis.
- Para tener un diagnóstico integral de aspergilosis es necesario completar un seriado de 3 muestras para cultivos y acompañarlo de igual manera con la detección de antígeno galactomanano.
- En cuanto a la caspofungina, es necesario evaluar la CME a la par de la CMI.
- *Aspergillus fumigatus*, fue el agente etiológico aislado con mayor frecuencia.
- Se determinaron patrones de sensibilidad de *A.nidulans*, *A.ochraceus* y *A. glaucus* frente al posaconazol y de *A.nidulans* y *A. ochraceus* frente a itraconazol, voriconazol y anfotericina B que no están descritos en la literatura.
- Se determinaron los patrones de sensibilidad para todas las especies de *Aspergillus* que fueron aisladas frente a los antifúngicos fluconazol, ketoconazol y 5-fluorocitocina.
- Los controles de calidad con cepas ATCC son necesarios para asegurar la calidad y la confiabilidad con la que se realizó el trabajo.
- Debido al comportamiento de las cepas y las concentraciones con las que cuenta la placa se propone que para los antifúngicos Posaconazol anfotericina b, itraconazol, ketoconazol voriconazol y caspofungina se consideren sensibles aquellas cepas cuya CMI sea $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$ y sean resistentes cuando la CMI sea $\geq 2 \mu\text{g/mL}$. Para el caso de fluconazol serán sensibles cuando la CMI $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ y resistentes cuando la CMI sea $\geq 32 \mu\text{g/mL}$. En el caso de 5-fluorocitosina serán sensibles cuando la CMI sea $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ y resistente cuando sea $\geq 8 \mu\text{g/mL}$.
- Se evidenció que el 92% de las cepas fueron resistentes a la Anfotericina B, ya que el 78% obtuvieron CMI de $2 \mu\text{g/mL}$, el 14% en concentraciones de $4 \mu\text{g/mL}$ y solo el 8% tuvieron una CMI de $1 \mu\text{g/mL}$ que corresponde a una sensibilidad intermedia.
- La Anfotericina B es uno de los medicamentos más usados ya que de los 10 pacientes que recibieron terapia antifúngica se utilizó en un 50% de las ocasiones, ya sea solo o en esquemas de uno o dos antifúngicos.

- De los 10 pacientes que recibieron terapia antifúngica el 60% de estos falleció, en el 83% de éstos pacientes el antifúngico con mejor sensibilidad fue diferente al utilizado, por lo cual estas pruebas son importantes para la selección del antifúngico al cual es sensible el hongo.
- Para la población de estudio se encontró que el itraconazol, en el 92% de las veces presentó una mejor sensibilidad que el Voriconazol, frente a varias especies de *Aspergillus sp.*
- El 85% de las cepas fueron resistentes al fluconazol con una CMI mayor a 256 µg/mL que es la mayor concentración de la placa.
- El 77% de las cepas fueron sensibles a posaconazol (CMI ≤0.06 µg/mL), y el 23% restante tiene una sensibilidad intermedia al antifúngico (0.12 µg/mL a 0.5 µg/mL). Para el itraconazol el 66% fueron sensibles (CMI ≤0.06 µg/mL), el 29% tuvieron sensibilidad intermedia (0.12 µg/mL a 0.5 µg/mL) y solo el 5% resultaron resistentes (CMI ≥ 2 µg/mL).
- Se deberá considerar a posaconazol e itraconazol en el tratamiento inicial empírico en los pacientes atendidos en el INP.
- El 97% de las cepas fueron resistentes a 5-fluorocitosina.
- Solo el 3% de las cepas fueron sensibles a voriconazol.

ANEXOS Anexo 1: Reporte de resultados de pruebas a antifúngicos.

FECHA				MICEIAL		LEVADURAS	
N° MICROLOGICO	SERVICIO				CAMA		
PACIENTE							
EDAD	SEXO				#WINLAB		
MUESTRA					# REGISTRO		
DIAGNOSTICO							
TIPIFICACION							

	N° DE LOTE	CADUCIDAD
AGUA		
MEDIO		
PLACA		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	POS	PZ 0.008	PZ 0.015	PZ 0.03	PZ 0.06	PZ 0.12	PZ 0.25	PZ 0.5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8
B	AB 0.008	AB 0.015	AB 0.03	AB 0.06	AB 0.12	AB 0.25	AB 0.5	AB 1	AB 2	AB 4	AB 8	AB 16
C	FZ 0.12	FZ 0.25	FZ 0.5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256
D	IZ 0.008	IZ 0.015	IZ 0.03	IZ 0.06	IZ 0.12	IZ 0.25	IZ 0.5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16
E	KZ 0.008	KZ 0.015	KZ 0.03	KZ 0.06	KZ 0.12	KZ 0.25	KZ 0.5	KZ 1	KZ 2	KZ 4	KZ 8	KZ 16
F	FC 0.03	FC 0.06	FC 0.12	FC 0.25	FC 0.5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64
G	VOR 0.008	VOR 0.015	VOR 0.03	VOR 0.06	VOR 0.12	VOR 0.25	VOR 0.5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	VOR 16
H	CAS 0.008	CAS 0.015	CAS 0.03	CAS 0.06	CAS 0.12	CAS 0.25	CAS 0.5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	CAS 16

Concentraciones en µg/mL.

- POS: Control positivo _____
- PZ: Posaconazol _____
- AB: Anfotericina B _____
- FZ: Fluconazol _____
- IZ: Itraconazol _____
- KZ: Ketoconazol _____
- FC: 5-Fluorocitosina _____
- VOR: Voriconazol _____
- CAS: Caspofungina _____

24 Hrs. 48 Hrs. 72 Hrs.

Anexo 2: Concentraciones de antifúngico en la placa de sensibilidad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	POS	PZ 0.008	PZ 0.015	PZ 0.03	PZ 0.06	PZ 0.12	PZ 0.25	PZ 0.5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	Posaconazol
B	AB 0.008	AB 0.015	AB 0.03	AB 0.06	AB 0.12	AB 0.25	AB 0.5	AB 1	AB 2	AB 4	AB 8	AB 16	Anfotericina B
C	FZ 0.12	FZ 0.25	FZ 0.5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256	Fluconazol
D	IZ 0.008	IZ 0.015	IZ 0.03	IZ 0.06	IZ 0.12	IZ 0.25	IZ 0.5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	Itraconazol
E	KZ 0.008	KZ 0.015	KZ 0.03	KZ 0.06	KZ 0.12	KZ 0.25	KZ 0.5	KZ 1	KZ 2	KZ 4	KZ 8	KZ 16	Ketoconazol
F	FC 0.03	FC 0.06	FC 0.12	FC 0.25	FC 0.5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	5-Fluorocitocina
G	VOR 0.008	VOR 0.015	VOR 0.03	VOR 0.06	VOR 0.12	VOR 0.25	VOR 0.5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	VOR 16	Voriconazol
H	CAS 0.008	CAS 0.015	CAS 0.03	CAS 0.06	CAS 0.12	CAS 0.25	CAS 0.5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	CAS 16	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL.

Anexo 3: Concentraciones de patrones estándar para cepas ATCC

Candida krusei ATCC 6258

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	POS	PZ 0.008	PZ 0.015	PZ 0.03	PZ 0.06	PZ 0.12	PZ 0.25	PZ 0.5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	Posaconazol
B	AB 0.008	AB 0.015	AB 0.03	AB 0.06	AB 0.12	AB 0.25	AB 0.5	AB 1	AB 2	AB 4	AB 8	AB 16	Anfotericina B
C	FZ 0.12	FZ 0.25	FZ 0.5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256	Fluconazol
D	IZ 0.008	IZ 0.015	IZ 0.03	IZ 0.06	IZ 0.12	IZ 0.25	IZ 0.5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	Itraconazol
E	KZ 0.008	KZ 0.015	KZ 0.03	KZ 0.06	KZ 0.12	KZ 0.25	KZ 0.5	KZ 1	KZ 2	KZ 4	KZ 8	KZ 16	Ketoconazol
F	FC 0.03	FC 0.06	FC 0.12	FC 0.25	FC 0.5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	5- Fluorocitocina
G	VOR 0.008	VOR 0.015	VOR 0.03	VOR 0.06	VOR 0.12	VOR 0.25	VOR 0.5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	VOR 16	Voriconazol
H	CAS 0.008	CAS 0.015	CAS 0.03	CAS 0.06	CAS 0.12	CAS 0.25	CAS 0.5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	CAS 16	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL.

Candida parapsilosis ATCC 22019

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	POS	PZ 0.008	PZ 0.015	PZ 0.03	PZ 0.06	PZ 0.12	PZ 0.25	PZ 0.5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	Posaconazol
B	AB 0.008	AB 0.015	AB 0.03	AB 0.06	AB 0.12	AB 0.25	AB 0.5	AB 1	AB 2	AB 4	AB 8	AB 16	Anfotericina B
C	FZ 0.12	FZ 0.25	FZ 0.5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256	Fluconazol
D	IZ 0.008	IZ 0.015	IZ 0.03	IZ 0.06	IZ 0.12	IZ 0.25	IZ 0.5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	Itraconazol
E	KZ 0.008	KZ 0.015	KZ 0.03	KZ 0.06	KZ 0.12	KZ 0.25	KZ 0.5	KZ 1	KZ 2	KZ 4	KZ 8	KZ 16	Ketoconazol
F	FC 0.03	FC 0.06	FC 0.12	FC 0.25	FC 0.5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	5- Fluorocitocina
G	VOR 0.008	VOR 0.015	VOR 0.03	VOR 0.06	VOR 0.12	VOR 0.25	VOR 0.5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	VOR 16	Voriconazol
H	CAS 0.008	CAS 0.015	CAS 0.03	CAS 0.06	CAS 0.12	CAS 0.25	CAS 0.5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	CAS 16	Caspofungina

Concentraciones en µg/mL.

REFERENCIAS.

- 1) De Anda P. Pruebas de susceptibilidad *in vitro* de hongos filamentosos aislados de otomicosis contra Eberconazol y comparación con: Anfotericina B, Clotrimazol, Itraconazol y Ketoconazol por el método de microdilución en caldo CLSI M38-A. México: 2009.
- 2) Canton E, Martin E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A) Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8.
- 3) Mitchell T. Micología Médica. En: Brooks GF, Carrol KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick y Adelberg microbiología médica. 25ª edición. México: McGraw Hill; 2011. P.625-664
- 4) Bonifaz A. Micología Médica Básica. 4ª edición. México: McGraw Hill; 2012. p.381-398
- 5) Abasolo C. Frecuencia de micosis en pacientes pediátricos diagnosticados en un hospital de tercer nivel. Mexico: 2009.
- 6) Arenas R. Micología médica ilustrada 4a edición. México:McGraw-Hill; 2011. P.368,391.
- 7) Richardson M. Hope W. *Aspergillus* en Anaissie E. McGinnins M. Pfaller M. Clinical Mycology. 2nd Edition. Philadelphia: Elsevier science; 2009. p. 271-296.
- 8) Pontón J. Quindos G. Micosis invasoras en pacientes oncohematológicos. 1ª edición. Bilbao: Asociación Española de Micología; 2009. P.15-28
- 9) Agustí C. Micosis pulmonares. En: Álvarez-Sala JL. Cassan P. Rodríguez de Castro F. Rodríguez JL. Villena V. Neumología Clínica 1ª edición. México: Elsevier; 2010. p. 350-357.
- 10) Cermeño J. Torrez-Rodríguez J. Sensibilidad de hongos miceliares dematiáceos a diez antifúngicos empleando un método de difusión en agar. Rev Iberoam Micol 2001;18:113-117
- 11) Soto JG. del Castillo D. Micosis pulmonares. Medicine 2010; 10: 4597-4604.
- 12) Buarque M. Bussamra M. Rodrigues(sic) J. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in paediatric cyst fibrosis patients. Paediatric Respiratory Reviews 2006;7:67-72
- 13) deHoog G. Guarro J. Gené J. Figueras M. Hyphomycetes. Genus: *Aspergillus* en deHoog G. Guarro J. Gené J. Figueras M. Atlas of clinical fungi. 2nd edition. Software versión 2011.

- 14)Stevens D. Moss R. Kurup V. Knutsen A. Greenberger P. Judson M. et al. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis—State of the Art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clinical Infectious Diseases* 2003;37(Suppl 3):225–264
- 15)Larone D. Medically important fungi. A guide to identification. 5th edition. ASM PRESS. Washington DC. 2011. P. 281-293.
- 16)Houbraken J. de Vries R. Samson R. Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. En Sariaslani S. Gadd G. *Advances in Applied Microbiology Volumen 86*. 2014. Pages 199 -249.
- 17)Samson R. Visagie C. Houbraken J. Hong S. Hubka V. Klaassen C. et al Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus* *Studies in Mycology* 2014;(78)141–173
- 18)Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(1):33-39
- 19)Samson R. Hong S. Peterson S. Frisvad J. Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya* *Studies in Mycology* 2007;(59)147–203.
- 20)Pemán J. Salavert M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(5):328-341
- 21)Pemán J. Salavert M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(2):90-98
- 22)García-Vidal C. Salavert M. Inmunopatología de las micosis invasivas por hongos filamentosos. *Rev Iberoam Micol*. 2014;XXX(XX):XXX-XXX In Press, Uncorrected Proof
- 23)Marr K. Carter R. Boeckh M. Martin P. Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002;100(13): 4358-4366.
- 24)Warris A. The biology of pulmonary *Aspergillus* infections. *Journal of Infections* 2014;69(supplement 1):S36-S41.
- 25)Castagnola E. Farci M. Fioredda F. Amoroso L. Risso F. Franceschi et al. Invasive mould infections in newborns and children. *Early Human Development* 2011;87(Supplement):S67–S69
- 26)Nania J. Wright P. The Mycoses En: Wilmott R. Boat T. Bush A. Chernick V. Deterding R. Ratjen F. Kendig & Chernick's Disorders of the Respiratory Tract in Children. 8th Edition. United States of America: Elsevier;2012. p. 531-544.
- 27)Wark P. Pathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis and an evidence-based review of azoles in treatment. *Respiratory Medicine* 2004;98(10):915-923.

- 28) Rojas-Restrepo J. Álvarez-Álvarez J. Montoya-Grinaldo J. Trujillo-Vargas C. Validación de la técnica de dihidrorodamina 123 para el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica en Colombia. *Inmunología* 2014;33(3):71-80
- 29) Pérez-Arandas V. Mancebo E. Talayero P. Gonzalez-Granado L. Allende L. Diagnóstico prenatal y nueva mutación en enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X. *An Pediatr* 2011;74(4):261-265.
- 30) Thia L. Balfour I. Diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory reviews* 2009;10(1):37-42.
- 31) Muda Z. Ibrahim H. Abdulrahman E. Menon B. Zahari Z. Zaleha A. Talib A. Invasive Aspergillosis in Paediatric Oncology Patients 2008;63(5):415-416.
- 32) Cuenca-Estrella M. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(5):257-264.
- 33) Dornbusch H. Groll A. Walsh T. Diagnosis of invasive fungal infections in immunocompromised children. *Clinical Microbiology and Infection.* 2010;16(9):1328-1334.
- 34) Quindós G. Eraso E. López-Soria L. Ezpeleta G. Enfermedad fúngica invasora: ¿Diagnóstico Micológico convencional o molecular?. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(9):560-571.
- 35) Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter* 2010;23(4): 169-176
- 36) Pfaller MA. Boyken L. Hollis J. Kroeger J. Messer SA. Tendolkar S. Diekema DJ. *In Vitro* Susceptibility of Clinical Isolates of *Aspergillus* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: a Head-to-Head Comparison Using the CLSI M38-A2 Broth Microdilution Method. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(10):3323-3325
- 37) Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20(10):523-30
- 38) Srinivasan A. Lopez-Ribot J. Ramasubramanian A. Overcoming antifungal resistance. *Drug Discovery Today: Technologies, Drug resistance.* Vol 11, 2014.
- 39) Cuenca-Estrella M. Alastruey-Izquierdo A. Gómez-López A. Monzón A. Estudios de sensibilidad en levaduras. Actualización y novedades. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl 1):53-58
- 40) Ayats J. Martín-Mazuelos E. Pemán J. Quindós G. Sánchez F. García-Rodríguez J. et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(1):39e1-39e15.

- 41) Cecilia V, Tapia P. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Rev Chil Infect 2009; 26 (2): 144-150
- 42) Zapata-González F. Cardona-Castro N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. Rev CES Med 2012;26(1):71-83
- 43) Herrero J. Hernández A. García E. Gómez J. Infecciones por hongos en pacientes inmunocomprometidos. Medicine. 2014;11(58):3435-3443
- 44) Ruiz-Camps I. Cuenca-Estrella M. Antifúngicos para uso sistémico. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(6):353-362
- 45) Pfaller MA. Antifúngicos y resistencia. Rev Chilena Infectol 2012;29(3):357
- 46) Mor M. Gilad G. Kornreich L. Fisher S. Yaniv I. Levy I. Invasive Fungal Infections in Pediatric Oncology. 2011;56(7):1092–1097.
- 47) Rubilar L. Maggiolo M Gonzalez R. Girardi G. Mendoza C. Vildosola C. Aspergilosis pulmonar crónica asociada a papilomatosis múltiple de la vía aérea. A propósito de un caso y revisión de la literatura. Rev Chil Pediatr 2006;77(4):382-387
- 48) Castaños C, Rentería F. Consenso Nacional de Fibrosis Quística Arch.Argent Pediatr 2008; (Supl) 106(5):e01-52.
- 49) Escribano A. Moreno A. Técnicas fibrobroncoscópicas especiales: Lavado bronquioalveolar, biopsia bronquial y biopsia transbronquial. An Pediatr (Barc) 2005;62(4):352-66
- 50) Flandes J. El lavado broncoalveolar: un procedimiento sencillo que aporta mucha información. Revista de Patología Respiratoria. 2011;14(2):41-42
- 51) Shi J. Xu Y. Shi Y. Lü H. Liu Y, Zhao W. et al. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus spp.* against voriconazole, itraconazole, posaconazole, amphotericin B and caspofungin. Chin Med J 2010;123(19):2706-2709
- 52) Serrano M, Vlaverde-Conde A. Chávez M. Bernal S. Claro R. Pemán J. et al. In vitro activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *Aspergillus spp.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2003;(45)131–135
- 53) Diekema D. Messer S. Hollis R. Pfaller J. Pfaller M. Activities of Caspofungin, Itraconazole, Posaconazole, Ravuconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi.