



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

“Resistencia a azoles en aislados de *Aspergillus fumigatus* recuperados de pacientes del INCMNSZ y análisis molecular del gen *cyp51A* en aquellos que resulten resistentes”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VIRIDIANA PIÑÓN HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ROSA ARELI MARTÍNEZ GAMBOA

ASESOR DE TESIS:

Q.F.B. CAROLINAJIMÉNEZ LÓPEZ



Ciudad de México 2021



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.

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solo un técnico, también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas”.

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por la oportunidad de desarrollar este proyecto dentro de sus instalaciones, así como brindarme el acceso a sus recursos.



A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haberme dado la oportunidad de estudiar en sus aulas y laboratorios. Además de tener a tan excelentes profesores.

A los profesores Ma. Isabel Garduño P., César Octavio J. Pierre y Víctor H. Becerra porque además de ser unos excelentes profesores, se convirtieron en grandes y queridos amigos.

Al profesor Gabriel A. Romero D. por su notable dedicación en las aulas y la paciencia con la que me escuchó en las clases de alemán, por orientar mi camino para el servicio social.

A la profesora Carolina Jiménez L. por hacer tan agradable mi estancia en la clínica, por enseñarme con paciencia como trabajar en el laboratorio para ayudar al paciente.

A la profesora Ma. de las Mercedes Zamudio D. por compartir conmigo su conocimiento y anécdotas durante el laboratorio de Inmunología, haciendo que las dificultades del mismo fueran más llevaderas, por su completo apoyo como sinodal.

A la profesora Claudia Martínez C. por su participación para que este proyecto se pudiera llevar a cabo.

A la Dra. Areli Martínez G. por haberme recibido en el proyecto, por compartir conmigo el conocimiento que tiene, enseñarme con paciencia y aclarar las dudas que me surgían en el paso a paso del proyecto, por haber compartido conmigo momentos personales y por haberme dado la oportunidad de conocernos mejor, por la confianza y responsabilidad que puso en mí.

A todos los compañeros del INCMNSZ Miguel, Tomy, Barbarita, Paty, Nancy, Paco, Norma, Axel, por el cariño que me brindaron, por las enseñanzas laborales y de vida, por las risas, por la confianza, por las comidas juntos, por su amistad.

DEDICATORIA

A mi papá por apoyarme incondicionalmente en todas mis decisiones, por todo el esfuerzo y tantos sacrificios, por enseñarme a ser independiente, por despertar en mí la curiosidad de querer saber más, por motivarme a seguir adelante con nuevas metas, por tantos juegos, por tantas bromas, por tu complicidad, por ser mi modelo a seguir.

A mi mamá por guiarme en la vida, por educarme para ser honesta, por mostrarme como luchar contra las adversidades, por enseñarme que siempre puedo mejorar, por todos los peinados, los miles de desayunos preparados, los uniformes arreglados, por las ocasiones que tuviste que ir a dar la cara por mí en la escuela, por todos tus cuidados cuando enfermé, por hacer de mí una persona de bien. Este logro también es de ustedes.

A mi Yeya por siempre estar para mí, porque, aunque no estaba en tus planes ser hermana mayor nunca me diste la espalda, por todos los juegos, las risas, las bobadas, por todo el cariño y lealtad que me has brindado. De una vez a Chuy, Vico y Matis porque me han enseñado mil cosas, aunque ustedes no lo crean, porque me he reído con ustedes y me llena de orgullo verlos crecer.

A Omar por todos los años que hemos compartido nuestros caminos, por motivarme a no tirar la toalla cuando estaba por hacerlo, por crecer conmigo, por hacerme reír hasta en los peores momentos, por las aventuras, por ayudarme a ser mejor persona, por comprar un ticket hacia el mismo viaje.

A ustedes, mi familia, infinitas **GRACIAS**.

Contenido

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES	2
2.1 <i>Aspergillus spp.</i>	2
2.2 Factores predisponentes de infecciones por <i>Aspergillus</i> :	3
2.3 Principales tipos de infecciones ocasionadas por <i>Aspergillus</i> :	4
2.4 Métodos para el diagnóstico de aspergilosis	5
2.4.1 Métodos convencionales.....	5
2.4.2 Pruebas serológicas	6
2.4.3 Identificación molecular.....	8
2.5 Tratamiento de las aspergilosis.....	9
2.5.1 AZOLES.....	9
2.5.2 EQUINOCANDINAS	10
2.5.3 POLIENOS	10
2.6 Uso de azoles en la agricultura:	12
2.7 Mecanismos de resistencia a azoles descritos en <i>A. fumigatus</i>	14
2.7.1 Resistencia a azoles por alteraciones en el <i>cyp51A</i> de <i>A.fumigatus</i>	15
2.8 Epidemiología de <i>Aspergillus</i> resistentes a azoles	18
2.9 Tratamiento de casos de aspergilosis con aislados resistentes a azoles	20
2.9.1 Pruebas de susceptibilidad.....	21
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4.- JUSTIFICACIÓN.....	23
5.- HIPÓTESIS	24
6.- OBJETIVO	24
7.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
7.1 Aspectos éticos.....	24
7.2 Población en estudio.....	24
7.3 Prueba de cribado	24
7.3.1 Preparación del medio RPMI.....	24
7.3.2 Preparación de los aislados de <i>Aspergillus</i> para la prueba de cribado	25
7.3.3 Preparación del Inoculo.....	25
7.3.4 Inoculación	26
7.4 Manejo de resultados preliminares.....	26
7.4.1 Extracción de DNA.....	26

7.4.2 Amplificación del gen <i>Cyp51A</i>	27
7.4.3 Purificación de los productos de amplificación.....	28
7.4.4 Secuenciación de los productos amplificados	28
7.4.5 Análisis de las secuencias	29
8.- RESULTADOS.....	29
9.- DISCUSIÓN.....	32
10.- CONCLUSIÓN.....	34
11.- BIBLIOGRAFÍA.....	34

1.- INTRODUCCIÓN

La aspergilosis es una micosis de animales y seres humanos, causada por hongos oportunistas del género *Aspergillus*, en especial, *Aspergillus fumigatus* (*A.fumigatus*), *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, los cuales son causantes del 95% de dichas infecciones.

Estas especies pueden producir enfermedad alérgica o invasiva, aspergiloma, diseminarse al sistema nervioso central (SNC) u otros órganos, o localizarse en otomicosis, onicomycosis, queratitis y micetoma. En pacientes con inmunodeficiencia, la infección generalmente es sistémica y mortal (1).

La aspergilosis es una enfermedad cosmopolita que se ha reportado en prácticamente todas las partes del mundo. Se considera la segunda micosis oportunista mundial, sólo después de la candidosis (2).

La aspergilosis se presenta en igual proporción en ambos sexos; se ha visto en todas las edades, pero la frecuencia en cada grupo etario puede variar de acuerdo con la forma clínica. La ocupación, también, desempeña una función específica en la adquisición de la enfermedad; por ejemplo, las personas que manejan granos (maíz, centeno, trigo, alimentos de aves, etc.) están sujetas a inhalar grandes cantidades de esporas o conidios, ya que las especies de *Aspergillus* se encuentran en estos productos (2).

2.- ANTECEDENTES

2.1 *Aspergillus spp.*

Aspergillus es un hongo filamentoso, hialino, saprófito, perteneciente al reino Fungi, dominio Eurotiomycetes, orden Eurotiales, familia Trichocomaceae, filo Ascomycota, género *Aspergillus*.

Aspergillus crece en cualquier tipo de sustrato, especialmente en suelos y materia en descomposición, y es un contaminante habitual de los conductos de climatización-ventilación. Se caracteriza por formar hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (teleomorfa) con formación de ascosporas en el interior de ascas; y asexual (anamorfa), con formación de conidios. Las diferentes especies se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura y color de la colonia (3).

Actualmente, el género *Aspergillus* incluye 379 especies reconocidas que pertenecen a 26 secciones. Más de 50 especies ya han sido reportadas en muestras de humanos (4). Las especies más comunes en infección en humanos son *A.fumigatus*, *A.flavus*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.versicolor*, *A.nidulans*, *A.glaucus*, *A.clavatus*, *A.cervinus*, *A.candidus*, *A.flavipes* y *A.ustus*. Estas especies se diferencian por sus características como tamaño y cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas (5). Hasta hace poco, la identificación se basaba únicamente en las diferencias de las características macro y microscópicas.

Las especies oportunistas de *Aspergillus* son ubicuas, ocupan el primer o segundo lugar dentro de los hongos contaminantes del ambiente. Muchos brotes nosocomiales de aspergilosis están asociados a obras de construcción y reconstrucción hospitalaria y a ductos contaminados (2).

2.2 Factores predisponentes de infecciones por *Aspergillus*:

La mayoría de las veces la aspergilosis está ligada a diversos factores, entre los que sobresalen, desnutrición, tuberculosis, absceso hepático amebiano, alcoholismo crónico, carcinomas pulmonares, pacientes inmunocomprometidos por linfomas, leucemia, trasplante de órganos, VIH-SIDA y corticoterapia. A pesar del aumento del número de casos de VIH-SIDA, pocos se asocian con cuadros de aspergilosis, y cuando lo hacen, se presentan en forma diseminada. La escasa cantidad de casos en estos pacientes, se ha explicado porque la aspergilosis se produce en pacientes con neutropenia y no con linfopenia (2). De tal manera que las infecciones por *Aspergillus* están ocurriendo con mayor frecuencia en pacientes receptores de trasplantes y en pacientes con cánceres hematológicos. El número de pacientes sometidos a trasplante ha aumentado exponencialmente en los últimos años, se estima que anualmente se realizan 15,000 alotrasplantes y 25,000 autotrasplantes de células madre, en todo el mundo. Los receptores de trasplantes se encuentran entre los subgrupos más importantes de pacientes inmunosuprimidos con riesgo de aspergilosis invasiva (AI). Estas infecciones se han reportado en 2 a 26% de los receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas, y en 1 a 15% de los receptores de trasplantes de órganos en Estados Unidos de Norte América.

La tasa de mortalidad en los receptores de trasplante y AI oscila entre 74 y 92%. De 9.3 al 16.9% de todas las muertes que ocurren en el primer año entre pacientes receptores de trasplantes, se atribuyen a AI en los Estados Unidos de Norte América. Estas infecciones pueden ocurrir tan temprano como a los 17 días después del trasplante sólido (6). El manejo de la AI sigue siendo un desafío, y la tasa de mortalidad, a pesar del uso de los agentes antifúngicos más nuevos, sigue siendo inaceptablemente alta (6).

Entre los factores de riesgo para desarrollar AI en pacientes postrasplantados, se pueden incluir variables del hospedador (edad, enfermedad subyacente), variables del trasplante (fuente células madre), complicaciones tardías (enfermedad de injerto contra hospedero [EICH], aguda y crónica), tratamiento con

corticosteroides, neutropenia secundaria, enfermedad por citomegalovirus (CMV) e infección por virus respiratorio (7).

2.3 Principales tipos de infecciones ocasionadas por *Aspergillus*:

Las variedades o formas clínicas son las siguientes:

- Aspergilosis pulmonar.
- Aspergilosis alérgica.
- Saprofitación pulmonar (aspergiloma).
- Infección pulmonar invasiva.
- Aspergilosis diseminada.
- Aspergilosis cutánea.
- Úlceras necróticas.
- Onicomycosis.
- Micetoma.
- Saprofitación en pacientes quemados.
- Otomicosis.
- Queratitis micótica (úlceras corneales).
- Rinosinusitis (bolas fúngicas).
- Miscelánea (2).

Dentro de estas patologías, la más importante es la aspergilosis invasiva; se presenta en especial en pacientes severamente inmunosuprimidos por leucemia, linfomas, corticoterapia y trasplante de órganos. Con menos frecuencia, la aspergilosis invasiva ocurre en personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cuidados intensivos médicos, trastornos autoinmunes (como el lupus eritematoso sistémico), cirrosis hepática, quemaduras graves. Sin embargo, como algunas de estas enfermedades son más frecuentes que el cáncer hematológico y los pacientes trasplantados, el número de individuos con aspergilosis invasiva es mucho mayor. El diagnóstico precoz y el tratamiento rápido, a menudo son exitosos, sin embargo, desafortunadamente el diagnóstico es tardío y los pacientes pueden morir. El estado de la enfermedad subyacente es importante en

la recuperación, ya que la inmunodeficiencia continua es problemática. Sin tratamiento, la tasa de mortalidad supera el 99%. Los mejores resultados son en pacientes con leucemia (30%), pero los resultados son peores en otras neoplasias malignas e inmunodeficiencias sanguíneas. De forma global, se reporta que más de 30 millones de personas corren el riesgo de aspergilosis invasiva cada año debido al uso de corticosteroides u otras terapias, y más de 300,000 pacientes lo desarrollan anualmente. La aspergilosis invasiva es responsable de 100,000 muertes cada año, mientras que la aspergilosis pulmonar cobra la vida de 450,000 personas en el mismo lapso (8).

Es una entidad subdiagnosticada, y se calcula que, en cerca del 30% de los casos no se confirma. El cuadro se inicia por la aspiración constante de los conidios; después se forman lesiones pulmonares crónicas. La sintomatología es muy marcada, con tos constante, expectoración mucopurulenta, hemoptisis, fiebre moderada, disnea, astenia y adinamia. Si el proceso avanza, se genera trombosis de los vasos y necrosis localizada; por lo tanto, la infección se llega a diseminar hacia diversos órganos como bazo, corazón, hígado, riñón, intestino y sistema nervioso central (SNC) (2).

La infección se produce principalmente por medio de las esporas o conidios que se encuentran presentes en el ambiente en forma de bioaerosoles y penetran al organismo por vía respiratoria. También es posible la infección por contaminación de heridas o mucosas. *Aspergillus* es responsable de enfermedades nosocomiales y no se produce transmisión de persona a persona (3).

2.4 Métodos para el diagnóstico de aspergilosis

2.4.1 Métodos convencionales

El abordaje puede ser desde la búsqueda de estructuras fúngicas mediante observaciones en fresco o tinciones de las muestras clínicas.

La observación de las estructuras micóticas (como hifas y conidios) directamente en las muestras de los pacientes, así como, el aislamiento del hongo por cultivo continúa siendo el estándar de referencia en el diagnóstico micológico, a pesar de su limitada sensibilidad y especificidad. El diagnóstico micológico por medios convencionales, no es fácil, ya que depende del hospedero, la calidad de la muestra, el microorganismo y la experiencia de quien hace el diagnóstico (9).

Se puede realizar una evaluación microscópica directa de muestras biológicas, esta permite la observación de estructuras micóticas que sugieren una infección. Las preparaciones directas en fresco, se realizan en un portaobjetos mediante la mezcla de una pequeña cantidad de muestra con hidróxido de potasio al 10%, aunque se requiere de mucha experiencia por parte del observador para llevar a cabo una evaluación confiable.

También se utilizan tinciones como la de tinta china, metenamina de plata y Giemsa. El rendimiento de estas técnicas es variable y depende de la concentración de los elementos fúngicos en la muestra, pudiéndose obtener un aumento de la sensibilidad utilizando fluorocromos y anticuerpos. Principales limitaciones de las técnicas microscópicas es su baja sensibilidad, su incapacidad para identificar el hongo a nivel de especie y la imposibilidad de realizar estudios de susceptibilidad a los antifúngicos (10).

En una observación microscópica, las hifas se encuentran como estructuras alargadas, ramificadas o no ramificadas, con presencia de abundantes septos (septadas) o con septos esporádicos (no septadas), hialinas o dematiáceas (oscuras), según el tipo de hongo. Por ejemplo, la observación de hifas septadas, delgadas con ramificaciones dicotómicas en ángulo de 45° sugiere una infección por *Aspergillus spp* (9).

2.4.2 Pruebas serológicas

La prueba del galactomanano y el β -D-3-glucano permiten la detección tanto de antígenos fúngicos, como de anticuerpos producidos en respuesta a la infección.

La detección de antígenos fúngicos puede permitir un diagnóstico temprano de las micosis invasivas, ya que no requiere de la inducción de la respuesta inmune, además que la detección no se ve influenciada por el estado inmunológico del paciente.(10)

Detección de antígeno de galactomanano (GM).

El galactomanano es un polisacárido constituyente de la pared celular de algunos hongos y que se libera durante el crecimiento de las hifas, es el método diagnóstico usado con mayor frecuencia (11). En una revisión sistemática y un metanálisis reciente se involucraban 783 pacientes con neoplasias hematológicas para estimar la precisión general del GM en líquido de lavado broncoalveolar (LBA) para el diagnóstico de AI, se estimó una sensibilidad y especificidad para AI probada/probable del 82% y 92%. Una limitante del GM es que la sensibilidad de la prueba es variable, dependiendo del huésped (40-90%) y del punto de corte empleado para la interpretación de la prueba (60% a 93%) (11, 12).

Se ha observado que la prueba puede presentar resultados falsos positivos debido a reactividad cruzada. En adultos se ha observado una tasa del 2.5% de resultados falsos positivos, mientras que en pacientes pediátricos es aproximadamente del 10%, observándose las tasas más altas en neonatos (83%), aunque el número de estudios realizados en este grupo de pacientes es muy limitado (13-15).

De igual forma se han informado casos de reactividad en suero de pacientes que reciben tratamiento con antibióticos β -lactámicos. Se ha demostrado que la piperacilina/tazobactam, la amoxicilina/ácido clavulánico, la ampicilina y la fetoximetilpenicilina comúnmente pueden dar resultados falsos positivos en la prueba de Platelia *Aspergillus* (16-22).

Sin lugar a dudas, el cultivo de la muestra, es el método estándar para el diagnóstico de aspergilosis, ya que, una vez aislado el hongo, puede realizarse la identificación a nivel de especie, así como, los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos (10).

Tradicionalmente, la identificación del hongo se realiza mediante la determinación de las características macroscópicas de las colonias en el cultivo (color en el

anverso y reverso, forma y textura), y microscópica, la cual se obtiene al realizar una impronta del cultivo, que posteriormente se somete a la tinción de azul de lactofenol, para evidenciar las estructuras fúngicas y poder hacer un reconocimiento a nivel de género o incluso a especie (9). Sin embargo, la identificación basada en la morfología macro y microscópica, en algunas ocasiones, presenta un importante grado de dificultad dado que muchas veces es prácticamente imposible diferenciar entre especies cercanas, lo cual es importante ya que existen especies crípticas que son intrínsecamente resistentes a los antifúngicos más comúnmente utilizados.

2.4.3 Identificación molecular

Recientemente, se han logrado avances importantes en la identificación molecular de muchos de los hongos de importancia médica (23). Por un lado, la utilidad de equipos como el MALDI-TOF (del inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-of-Flight) para la identificación de hongos de importancia clínica sigue siendo un reto, dado que las bibliotecas disponibles en estos equipos no cuentan con el número de espectros necesarios para lograr una identificación correcta a nivel de especie en muchos aislados (9).

Recientemente, Imbert S. et al. 2019 (24), se analizaron 5108 aislados de *Aspergillus* spp. mediante MALDI-TOF de Bruker y la biblioteca gratuita en línea MSI (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/welcome>). Esta biblioteca cuenta con espectros de 1913 cepas de levaduras y hongos filamentosos procedentes de 28 países. En este estudio el 99.6% de los aislados fueron correctamente identificados a nivel de sección, sin embargo, la identificación a nivel de especie se logró solo en un 66.1%. Los autores concluyen que estas deficiencias en la identificación a nivel de especie pueden deberse a los recientes cambios en la taxonomía de los hongos. Además, algunos de los aislados utilizados para generar los espectros de referencia se encontraban erróneamente identificados. Los autores consideran que a pesar del

aparentemente bajo porcentaje de identificación a nivel de especie, la base MSI, es útil debido a que cuenta con mayor número de espectros que las bases proporcionadas por el fabricante o comercialmente disponibles. Los hallazgos de esta investigación soportan la hipótesis de que la identificación a nivel de especie puede mejorar significativamente si se actualiza la base de datos MSI con la información actualmente disponible (24).

Por otro lado, entre las técnicas moleculares más utilizadas para la identificación de hongos, se encuentra la amplificación de blancos moleculares acoplada a la secuenciación. Esto ha permitido la identificación más precisa a partir de cultivos, e incluso a partir de muestras clínicas directamente. Los blancos más utilizados con este propósito corresponden a secuencias de genes que codifican para la actina, calmodulina, β -tubulina, factor de elongación I- α ; y las regiones no codificantes del ADN ribosomal, ITS1 e ITS2 (del inglés Internal Transcribed Spacer). Para la identificación de las especies de *Aspergillus*, se ha utilizado la secuenciación de la región ITS, y de una región parcial del gen β -tubulina o calmodulina, siendo el gen β -tubulina el que tiene mejor capacidad de discriminación entre estas especies (25).

2.5 Tratamiento de las aspergilosis

En general, el tratamiento está basado en el uso de tres clases de antifúngicos principales.

2.5.1 AZOLES

(fluconazol, Itraconazol, voriconazol, y posaconazol): Son antifúngicos que existen desde los 90's. Actúan a nivel de membrana plasmática (26).

Los azoles se unen a través de su átomo de nitrógeno al grupo Hem del sitio activo de la lanosterol 14 α -desmetilasa. La inhibición de esta enzima, conduce a la formación de esteroides aberrantes, que no complementan la función del ergosterol en la membrana plasmática, generando un efecto citotóxico y fungistático (27).

El ergosterol es un componente esencial que garantiza la permeabilidad y la fluidez de la membrana celular (28).

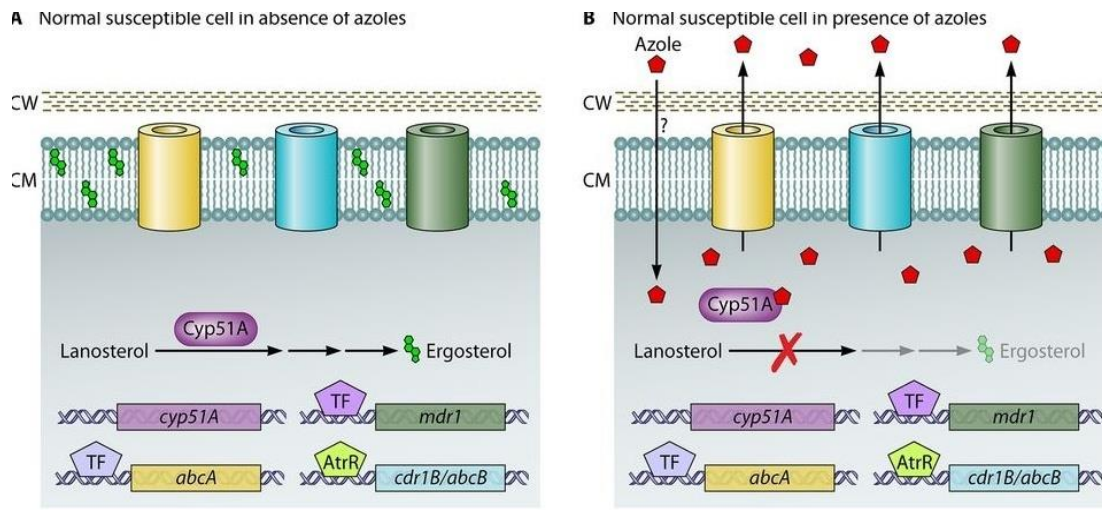


Figura 1. A. Célula susceptible en ausencia de azoles. B. Célula susceptible en presencia de azoles.(27)

2.5.2 EQUINOCANDINAS (caspofungina, micafungina, anidulafungina): Son antifúngicos que existen desde inicios del 2000. Las equinocandinas son lipopéptidos, que se unen a la β -1,3-D-glucano sintetasa (Fks1p), responsable de la síntesis del β -1,3-D-glucano de la pared celular, ocasionando daño irreparable en esta, teniendo así un efecto fungicida para *Candida* y fungistática para *Aspergillus* (29). Inicialmente solo se utilizaba la caspofungina, y aunque tiene un buen efecto sobre las infecciones por hongos filamentosos, no tiene buen alcance a líquido cefalorraquídeo (LCR). La Sociedad Americana de Enfermedades infecciosas (IDSA) recomienda caspofungina como tratamiento de segunda línea (rescate) de aspergilosis invasiva (30). Posteriormente, se introdujeron las nuevas equinocandinas, micafungina y anidulafungina, siendo esta última la más utilizada para infecciones por *Aspergillus spp* (26).

2.5.3 POLIENOS (Anfotericina B): Es un antifúngico que existe desde 1956. Se unen al ergosterol de la membrana de la célula fúngica, causando inestabilidad osmótica y pérdida de la integridad de la misma. La anfotericina B se encuentra en

4 diferentes formulaciones, incluida la anfotericina B desoxicolato, que, por su gran toxicidad, ha dado lugar al uso de derivados lipídicos como, la anfotericina liposomal, el complejo lipídico y la dispersión coloidal. Estas formulaciones generan menor toxicidad y permiten elevar las dosis, sin embargo, el problema es su elevado costo (5).

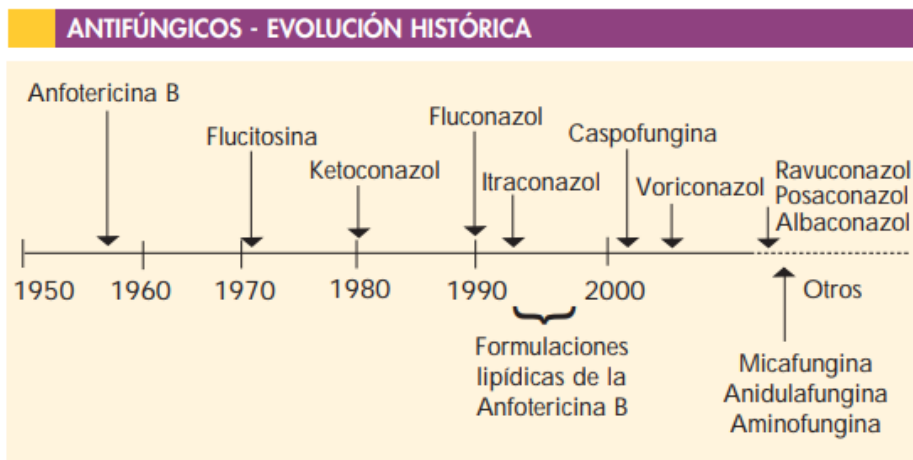


Figura 2. Evolución histórica de los antifúngicos (31).

Existe un amplio consenso para considerar al voriconazol como el tratamiento de elección para la AI, esto en consecuencia con un estudio que mostró superioridad sobre la anfotericina B convencional (32).

El itraconazol es otro fármaco activo que puede administrarse como tratamiento de primera línea o como tratamiento de consolidación tras la administración inicial de anfotericina B (5).

Por su parte, la caspofungina muestra una eficacia inferior a la deseada cuando se usa como tratamiento de primera línea en la AI, siendo considerada eficaz y segura, únicamente en los casos microbiológicamente confirmados (32).

2.6 Uso de azoles en la agricultura:

La industria agrícola ha utilizado pesticidas para optimizar la producción de alimentos para la creciente población humana. Un problema importante para los cultivos, son los fitopatógenos fúngicos, los cuales se combatieron con fungicidas naturales hasta mediados del siglo XX cuando se introdujeron los fungicidas sintéticos (33, 34). De estos, existen diversos compuestos disponibles en el mercado, sin embargo, los azoles son los preferidos debido a su eficiencia ante una gran variedad de hongos (28). Estos se introdujeron en la década de los 70's, siendo los triazoles los más utilizados (34, 35). Se usan ampliamente para controlar los hongos en los granos, frutas, vegetales y plantas ornamentales, cereales, bayas, enredaderas y tomates, entre otros. Es más, se sabe que más de un tercio de las ventas totales de fungicidas son azoles (en su mayoría, triazoles). Se ha comprobado que los azoles persisten activamente durante varios meses en muchos nichos ecológicos, como los suelos agrícolas y los ambientes acuáticos(36).

La introducción de estos compuestos en la agricultura, ha dado lugar a la aparición de cepas de *A. fumigatus* resistente a azoles. El riesgo de desarrollo de resistencia, depende ampliamente de la clase de fungicida utilizado (37).

Año de introducción	Nombre de los antifúngicos utilizados en la agricultura	Tratamiento
1973	Triadimefon, imazalil (imidazol) [alto]	Amplio espectro
1977	Triadimenol, procloraz (imidazol) [alto]	Fungicida para cereales postcosecha y semillas,
1979	Propioconazol, bitertanol [alto]	Amplio espectro
1982	Triflumizol [alto]	Amplio espectro
1983	Flutriafol, diniconazol, flusilazol. [alto]	Amplio espectro
1986	Hexaconazol, ciproconazol, tebuconazol [alto]	Amplio espectro, follaje y semillas
1988	Tetraconazol, difenoconazol [alto]	Amplio espectro, follaje y semillas
1990	Epoxiconazol [alto]	Amplio espectro y cereales
1992	Metconazol, fluquinconazol, triticonazol [alto]	Amplio espectro a follaje y semillas
2002	Protioconazol [alto]	Amplio espectro

Cuadro 1. Uso de antifúngicos a través del tiempo (34).

[] Hace referencia al riesgo de resistencia que existe para cada compuesto(38):

*Protioconazol, epoxiconazol y tebuconazol, son los más usados en Reino Unido, Países Bajos y Dinamarca.

2.7 Mecanismos de resistencia a azoles descritos en *A. fumigatus*.

Los mecanismos básicos de resistencia a los fármacos en las células microbianas son:

- A. Reducción de la afinidad para la interacción de las proteínas blanco con la droga.
- B. Sobreexpresión de la proteína blanco.
- C. Disminución de la concentración del fármaco por el sistema de salida impulsado por bombas de flujo
- D. Degradación intra o extra celular de las drogas.
- E. Caminos alternativos que pasan por alto los efectos de las drogas.

En el caso de *A. fumigatus*, se han descrito los siguientes mecanismos:

- A) Presencia de mutaciones que causan modificaciones estructurales en la enzima Cyp51A, lo que conduce a una afinidad reducida al azol.
- B) B) Sobreexpresión del gen *Cyp51A*, debido a una inserción de 34pb en la región promotora combinada con una sustitución en el codón 98 originando el cambio de una leucina por una histidina (TL₃₄/L98H), causando un aumento en el nivel intracelular de Cyp51A.
- C) C) Sobreexpresión de los genes que codifican para bombas de flujo que se encargan de extraer el azol que penetra a la célula, causando una disminución en la acumulación intracelular (39). Cabe mencionar que estos mecanismos pueden coexistir en una misma célula (40).

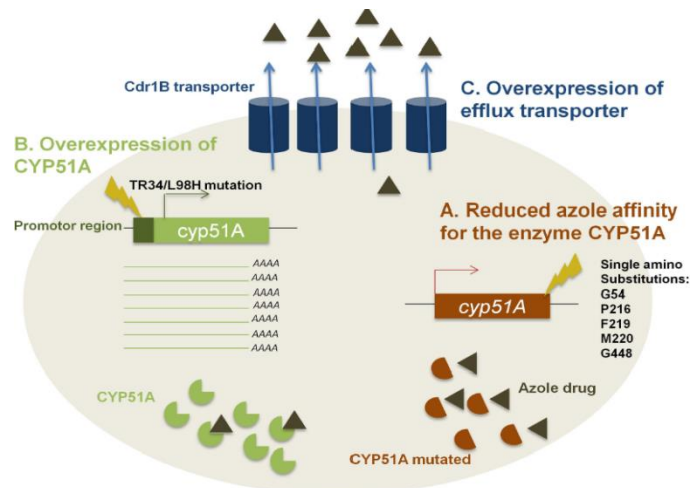


Figura 3. Mecanismos de resistencia a los azoles en *A. fumigatus* (39).

2.7.1 Resistencia a azoles por alteraciones en el *cyp51A* de *A.fumigatus*

Se ha descrito que del 50-80% de la resistencia a azoles en *A. fumigatus* se da por la mutación *Cyp51A*. Se ha observado que estas alteraciones se pueden dar por dos vías, por un lado, en pacientes con aspergilosis crónica, la resistencia se da por mutaciones puntuales en el gen *Cyp51A* después de tratamientos prolongados con azoles, mientras que, por otro lado, se encuentran los pacientes con aspergilosis aguda, los cuales nunca han recibido tratamiento con azoles y que se infectan con aislados de *A. fumigatus* resistentes adquiridos desde el medio ambiente (32).

Las alteraciones encontradas en el gen *Cyp51A*, en el caso de la resistencia generada por tratamientos prolongados con azoles son: mutaciones en el codón que codifica para el aminoácido G54, M220, P216, F219 y G448 (41). Sin embargo, la mutación G54E es la que ha sido descrita y probada (42), mientras que las alteraciones relacionadas con larga exposición de *Aspergillus* a los azoles en la agricultura son la introducción de secuencias de tanda repetidas (TR) de 34, 46 o 53 y 120 pb en la región promotora (43) así como, a mutaciones no sinónimas en la región codificadora, que da lugar a cambios en ciertos aminoácidos (44).

Las principales combinaciones encontradas son TR₃₄/L98H, TR₄₆/Y121F/T289A, TR₄₆/Y121F/M172I/T289A/G448S, TR₅₃ y la recientemente descrita por Rasmus K. Harey col. TR₁₂₀.

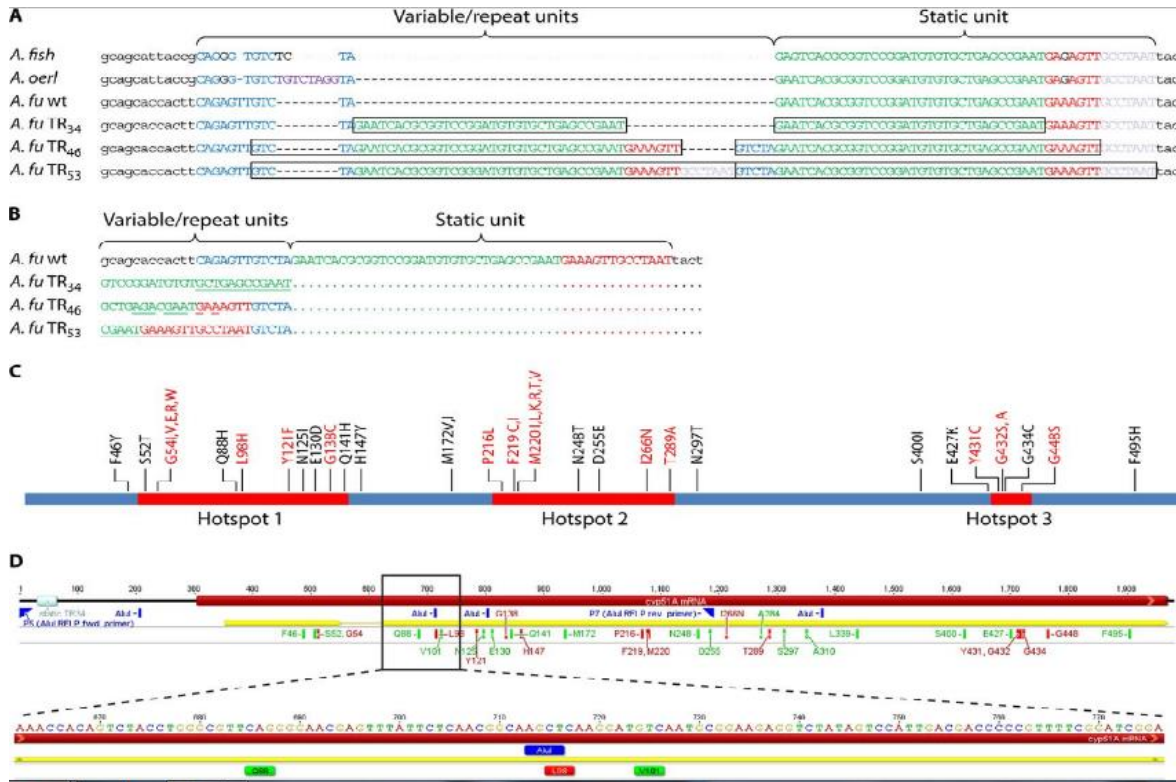


Figura 4. Alteraciones en el gen *Cyp51A* de *A. fumigatus*.(27)

Todos los aislados de *A. fumigatus* con las mutaciones TR₃₄/L98H, han demostrado resistencia cruzada no solo a los triazoles de uso médicos, sino también a los cinco fungicidas triazol extensamente usados en la agricultura (propiconazol, tebuconazol, bromuconazol, epoxiconazol y difenoconazol) (45, 46). Los casos de infecciones con cepas de *Aspergillus* con resistencia adquirida en el ambiente quedó demostrado desde el 2008, cuando se realizó un estudio en más de 1200 pacientes con aspergilosis, entre los que se encontraron 32 que nunca habían recibido tratamiento con azoles y sus aislados presentaron resistencia; análisis moleculares demostraron relación genética entre estos aislados y los recuperados del ambiente hospitalario que también eran resistentes (47).

Desde entonces, han surgido varios estudios en los que se ha demostrado la infección de paciente con cepas de *Aspergillus* resistente a azoles provenientes del ambiente. Recientemente, se describieron otros casos donde se demostró relación filogenética entre aislados clínicos y ambientales resistentes a azoles con una mutación TR₄₆/Y121F/T289A en el mismo gen *cyp51A* (48, 49).

Otro mecanismo asociado con resistencia son las bombas de eflujo, incluidos los transportadores de casete de unión a ATP (ABC) y los de la superfamilia facilitadora principal (MFS), estos son necesarios en los organismos eucariontes para eliminar las toxinas de la célula (50).

En *A. fumigatus* se encargan de expulsar el azol de la célula, por lo tanto, la sobreexpresión de estos genes conduce a resistencia al azol a medida que disminuye la concentración intracelular del fungicida. *Aspergillus fumigatus* contiene al menos 49 genes que codifican los transportadores ABC. Entre ellos, se ha demostrado que 12 presentan una alta homología con las proteínas PDR5 y PDR15 de *Saccharomyces cerevisiae* que también están involucradas en la resistencia a los azoles. Se demostró que el transportador de flujo de salida *Cdr1B*, un miembro de la subfamilia PDR, está sobre expresado en aislados resistentes a azol. La eliminación del gen *Cdr1B* en una cepa resistente da como resultado una mayor sensibilidad al itraconazol. Esto significa que *Cdr1B* es primordial para la resistencia al azol en *A. fumigatus* (51). Recientemente, se ha demostrado que los mutantes, por delección, de otros dos transportadores ABC distintos (*AtrF*, *AtrI*) y un transportador de la superfamilia facilitadora principal (*MdrA*), también muestran sensibilidad a los azoles (52).

2.8 Epidemiología de *Aspergillus* resistentes a azoles

El primer informe de aislados de *A.fumigatus* resistente a azoles ocurrió en 1997 en California, E.U. (53); a partir de esa fecha, se han detectado aislados resistentes con una incidencia creciente en todo el mundo.

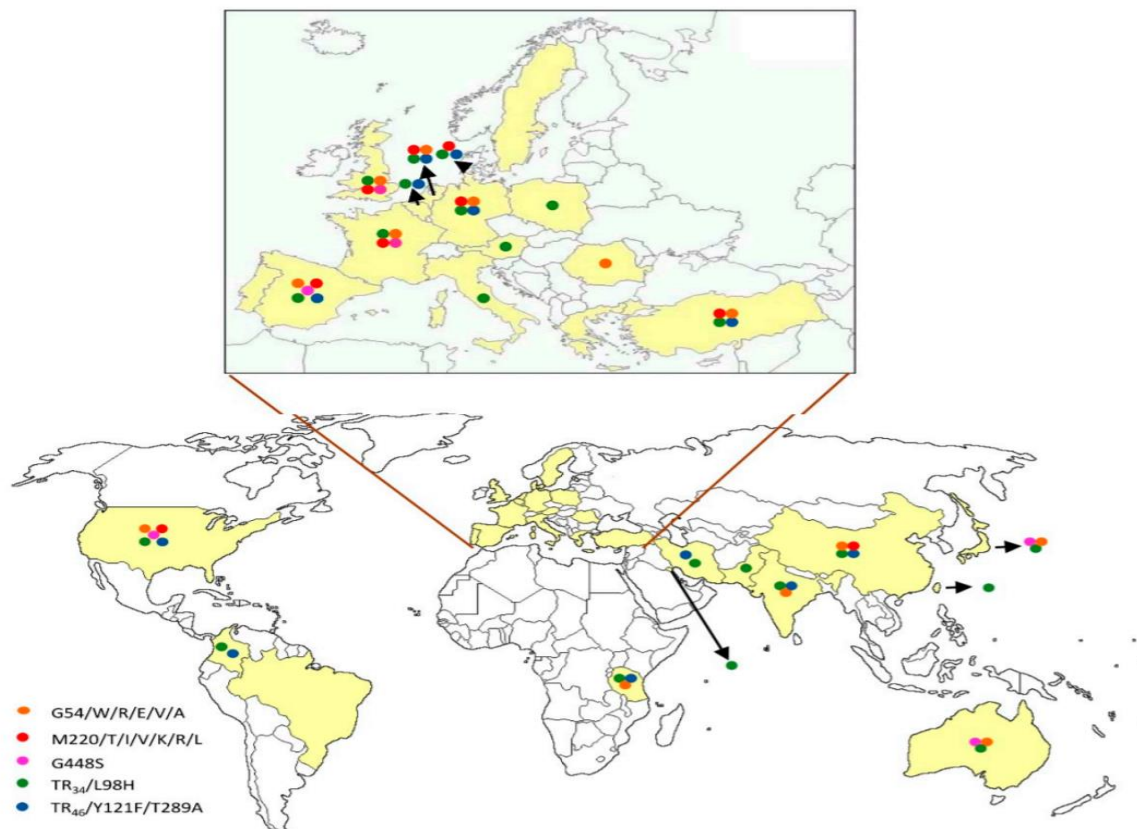


Figure 1. Worldwide distribution of azole resistance in *A. fumigatus* by mechanisms.

Figura 5. Distribución mundial de *A.fumigatus* resistente a azoles. (54)

Después del primer reporte, un grupo de investigadores de los países bajos, realizó un análisis de los aislados recuperados entre 1994-2007 y encontraron que la resistencia incrementó del 1.7 al 6% (55). Otro grupo del Reino Unido, analizó más de 500 aislados y reportó una resistencia del 5% en el 2004 (56), incrementando hasta el 14% en 2008 y al 20% en 2009 (57). A partir de entonces se han reportado altas tasas de resistencia en otros países del continente Europeo (36).

La red de vigilancia global para detección de *Aspergillus* resistente, ARTEMIS, reveló que 5.8% de los *A.fumigatus* tienen MICs elevados para uno o más triazoles (58). Por otro lado, un estudio realizado en 22 países Europeos, mostró una resistencia que va de 0 a 26% (59).

Para América Latina existen pocos estudios. Recientemente, Le Pape y col (60) evaluaron 60 muestras de suelos de invernaderos en Bogotá, Colombia. A partir de estas muestras, recuperaron 20 aislados de *A. fumigatus*, principalmente de áreas donde existe un alto uso de tebuconazol y difeconazol. Diecinueve de los 20 aislados mostraron cambios en el gen *Cyp51A*, 17 presentaron una TR₄₆/Y121F/T289A, otro presentó una TR₃₄/L98H y el último presentó una TR₅₃.

Van der Linden y col. (61) organizó una red de vigilancia multicéntrica a nivel internacional (22 centros médicos en 19 países) para determinar la prevalencia de la resistencia a azoles en aislados clínicos de *Aspergillus*. En este estudio analizaron 64 aislados recuperados de 57 pacientes de Brasil, sin embargo, en ninguno de ellos se encontró resistencia.

Por otro lado, en 2017 Leonardelli y col. (62) describieron el primer reporte, en América del Sur, de un aislado clínico de *A. fumigatus* con la sustitución G54E en *cyp51A* asociada con la resistencia a itraconazol en un paciente argentino con queratitis micótica.(63)

En un estudio realizado en Perú, analizaron 207 aislados clínicos de *Aspergillus*, y mediante marcadores moleculares identificaron 143 *A. fumigatus sensu stricto*. Estos aislados se sometieron a análisis de susceptibilidad, y a los resistentes se les realizó la secuenciación del gen *cyp51A* en la búsqueda de las mutaciones previamente descritas. Tres aislados (2%) mostraron resistencia a itraconazol con diferentes mutaciones en *Cyp51A*, un aislado presentó la mutación M220K, otro la G54, mientras que el tercer aislado, recuperado de un paciente sin tratamiento con azoles, presentó una TR₃₄ con una sustitución L98H (64).

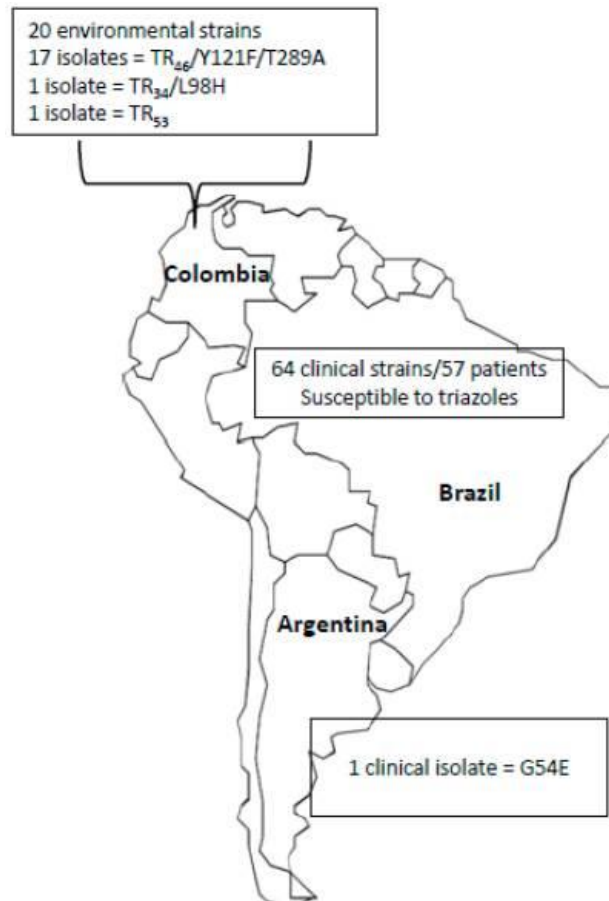


Figura 6. Epidemiología de la resistencia de *A.fumigatus* a los azoles en América Latina (63).

2.9 Tratamiento de casos de aspergilosis con aislados resistentes a azoles

Desde 1990 los triazoles han sido el pilar para el tratamiento de la aspergilosis(41).

La mortalidad en las infecciones causadas por *Aspergillus* resistentes a los azoles, supera la observada en ensayos clínicos recientes (88-100% versus 29%).

Las infecciones por aislados con resistencia a los azoles, representan una amenaza potencial para la salud pública ya que la probabilidad de fracaso del tratamiento y resultado fatal cuando se administra monoterapia con voriconazol es alta (56).

Van der Linden y col. reportaron que en un estudio que realizaron, siete de ocho (87,5%) de los pacientes con AI con aislados resistentes murieron dentro de los tres meses (65) y cuatro de cuatro pacientes que recibieron monoterapia con voriconazol murieron a las 12 semanas, mientras que en otro reporte, el mismo autor informó que tres de cada cuatro que recibieron L-AmB sobrevivieron (66).

Con respecto a la terapia antifúngica empírica, un panel de expertos sugirió que esta se debe basar en la prevalencia local de resistencia a los azoles (67) en contraste con las recomendaciones de la IDSA de la monoterapia universal con voriconazol (68). El panel de expertos estableció un límite de 10% de prevalencia para definir "alto nivel de resistencia", y sugirió que, en estas regiones, la terapia empírica debe consistir en una combinación de voriconazol más una equinocandina o una monoterapia con anfotericina B liposomal (L-AmB). Los expertos acordaron que las regiones con tasas de resistencia <5% deben seguir las pautas internacionales que apoyan la monoterapia con voriconazol. Sin embargo, la recomendación para lugares con una tasa de resistencia del 5-10% sigue siendo controvertida, ya que algunos expertos abogan por la terapia combinada o L-AmB, mientras que otros apoyan la monoterapia con voriconazol (69, 70).

2.9.1 Pruebas de susceptibilidad

Recientes investigaciones indican que existe correlación entre la resistencia *in vitro* y el fallo terapéutico, pero no entre la sensibilidad y curación clínica (40).

Dado las altas tasas de resistencia a azoles observadas en Europa, un grupo de expertos que se reunieron en 2015 recomendó que todos los aislados de *Aspergillus* recuperados de muestras clínicas se identificaran a nivel de especies y se sometieran a pruebas de resistencia a azoles (67) mientras que las pautas de IDSA 2016, establecen que las pruebas de susceptibilidad contra azoles deben reservarse principalmente para pacientes que no responden a la terapia o con fines epidemiológicos (68).

EUCAST y CLSI cuentan con un protocolo estandarizado para la determinación de susceptibilidad de *Aspergillus* mediante microdilución en caldo, sin embargo, son pruebas muy laboriosas, costosas y requiere de personal entrenado para realizarlas, de tal manera que solo en algunos laboratorios de referencia se pueden realizar (71, 72).

Recientemente, se describió una prueba de *screening* o cribado con el fin de detectar la resistencia en *A. fumigatus* de una manera más sencilla y rápida. Este método que se basa en el uso de una placa con agar RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 4µg/mL de itraconazol, otra placa con agar RPMI suplementada con 2µg/mL de voriconazol (concentraciones de antifúngicos que separan los aislados silvestres de los mutantes) y una última placa con agar RPMI sin azoles (control de crecimiento) (73).

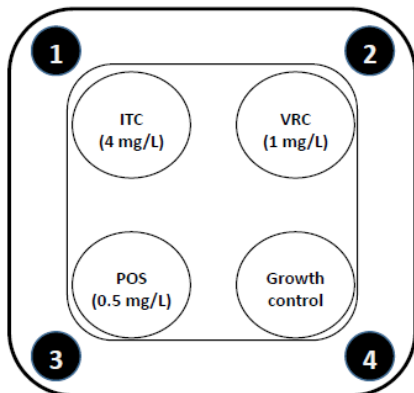


Figura 7. Sugerencia de uso de placa para pruebas de susceptibilidad (73).

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aspergillus es un organismo ubicuo, se encuentra prácticamente en todas partes, desafortunadamente, con el aumento de enfermedades o tratamientos inmunosupresores (enfermedades hematológicas, trasplante de células hematopoyéticas, cáncer, uso de esteroides, entre otros) *Aspergillus* ha ocupado un papel muy importante dentro de las enfermedades infecciosas. La aspergilosis

invasiva es responsable de 200,000 casos cada año y cerca de 100,000 muertes en el mismo lapso. Recientemente se ha reportado la aparición de aislados de *A.fumigatus* resistentes a azoles, tratamiento de primera línea en los casos de aspergilosis. La adquisición de resistencia puede ser ambiental, por uso de azoles en la industria agrícola, o bien por tratamiento prolongado con azoles en pacientes con aspergilosis crónica; y cada una de ellas se ha relacionado con cambios específicos en el gen *cyp51A*. La mortalidad en pacientes con aspergilosis resistentes a azoles alcanza el 88-100%. La prevalencia de aspergillus resistentes a azoles va de 20 a 50%, esto para Europa donde se han realizado más investigaciones al respecto. Dado que las pruebas de susceptibilidad no se realizan de manera rutinaria para los aislados de *Aspergillus*, los datos de resistencia son desconocidos en la mayoría de los países. En el caso de América son pocos los casos reportados, USA ha reportado solo algunos casos clínicos, Colombia reportó 20 casos ambientales, y recientemente, Argentina realizó el reporte de un aislado clínico, mientras que para nuestro país estos datos no se conocen.

4.- JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de primera línea de los casos de aspergilosis es el voriconazol, sin embargo, las tasas de mortalidad en los casos resistentes a azoles va del 88-100%. Lo que ha llevado al planteamiento de cambio en las recomendaciones de tratamiento. En los países con una prevalencia alta de resistencia ($\geq 10\%$) el tratamiento debe consistir en el uso de voriconazol en combinación con una equinocandina, mientras que si la prevalencia es $< 5\%$, el tratamiento debe continuar siendo uniterapia con voriconazol. Por lo antes mencionado es importante conocer cuál es la prevalencia de resistencia en nuestro país, lo que permitirá establecer tratamientos que puedan llevar a mejores desenlaces en los pacientes con estos padecimientos.

5.- HIPÓTESIS

Entre los *A.fumigatus* recuperados de pacientes del INCMNSZ, encontraremos aislados resistentes, y entre ellos, hallaremos la mutación TR₃₄/L98H en el gen *cyp51A*.

6.- OBJETIVO

Buscar, mediante una prueba de cribado, resistencia a azoles en aislados de *A.fumigatus* recuperados de pacientes del INCMNSZ, y realizar el análisis de la secuencia del gen *cyp51A* de aquellos aislados que resulten resistentes.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Aspectos éticos

El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación del INCMNSZ.

7.2 Población en estudio

Se analizaron 58 aislados de *A.fumigatus* recuperados de pacientes del INCMNSZ.

7.3 Prueba de cribado

La prueba de cribado se realizó de acuerdo a lo descrito por EUCAST(73).

En breve:

7.3.1 Preparación del medio RPMI

- En un frasco se pesaron 10.4 g de medio RPMI con L-glutamina, indicador de pH, sin bicarbonato suplementado con glucosa con concentración final de 2% (20 g), 34.53 g de MOPS sal de sodio (con una concentración final

de 0.165 mol/L) para una concentración final de 0.165 mol/L, y 20 g de Bacto agar.

- Se agregaron 990 mL de agua para disolver.
- Se ajustó el pH a 7.0 con ayuda de NaOH 10 N.
- El volumen se ajustó a un volumen final de 1000 mL.
- Antes de esterilizar, y con ayuda de agitación se vació el agar preparado y ajustado en tres frascos.
- El medio se esterilizó a 121°C por 15 minutos.
- Los medios se dejaron enfriar a aproximadamente a 45°C.
- A uno de los frascos con medio RPMI se le añadió itraconazol para alcanzar una concentración final de 4 mg/L, a otro de los frascos se le agregó voriconazol para que quedara a una concentración final de 2 mg/L, mientras que al último frasco no se le agregó antifúngico (control de crecimiento).
- El medio se vertió en cajas Petri de 3 mL y se dejó solidificar
- Se realizó control de esterilidad mediante incubación a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h.

7.3.2 Preparación de los aislados de *Aspergillus* para la prueba de cribado

- Los aislados de *Aspergillus* fueron recuperados del cepario del laboratorio, se sembraron en agar dextrosa Sabouraud y se incubaron a 30°C por 24-48 h. Antes de realizar la prueba de cribado, se realizó una segunda resiembra en las condiciones antes mencionadas.

7.3.3 Preparación del Inoculo

-A partir del sub cultivo de entre 24-48 horas, se cosecharon las conidias en solución salina estéril y se ajustó a una concentración del 0.5 en la escala de McFarland.

7.3.4 Inoculación

-Cada una de las placas (RPMI con itraconazol, RPMI con voriconazol y RPMI sin antifúngico), fueron inoculadas con 25 μ L de la solución al 0.5 de McFarland

-Las placas se incubaron a 35-37°C por 48 horas.

En cada corrida se incluyó un control susceptible (*A. fumigatus* ATCC MYA 3626) y uno resistente (*C. glabrata*, aislado resistente a azoles, probado en nuestro laboratorio mediante Vitek2 ASTYS07 con una MIC para fluconazol >64 μ g/mL y voriconazol de 4 μ g/mL).

7.4 Manejo de resultados preliminares

En primer lugar, se revisaron los controles de crecimiento. La prueba se interpretó como positiva cuando se observó desarrollo en la placa de RPMI con itraconazol y/o voriconazol, así como en la de RPMI sin antifúngico (control de crecimiento); mientras que se consideraba una prueba negativa cuando solo se observaba desarrollo en la placa con agar RPMI sin antifúngico.

Los aislados de *Aspergillus* con una prueba de cribado positiva, se separaron para el análisis de la secuencia nucleotídica del gen *Cyp51A*.

7.4.1 Extracción de DNA

Se realizó un subcultivo en medio caldo Sabouraud, el cual se incubó a temperatura ambiente en movimiento rotatorio por 24 horas.

El hongo se concentró y se lavó con agua milliQ para proceder con la extracción del DNA mediante ruptura mecánica de la membrana celular, con el uso del equipo Precyllys (Bertin Instruments. Bertin Technologies SAS Parcd'activités du

Pas du Lac.10 bis, avenue Ampère.78 180 Montigny-le-Bretonneux. France), para esto, se usaron perlas de cerámica “Grindingmatrixforlysing kits (esferas de cerámica recubierta con óxido de zirconio [6,35 mm])” y microtubos de 2 mL, se aplicó un programa de 6500 rpm con ciclos de 6x25 con pausas de 30 s. Posteriormente se continuó con la extracción de DNA con el kit Fungal DNA Isolation kit (Omega Bio-TekInc, Norcross, GA, USA) según las recomendaciones del fabricante.

7.4.2 Amplificación del gen *Cyp51A*

Para la amplificación de la región promotora, se utilizaron los siguientes oligonucleotidos:

- PA7 (F): 5´-TCA TAT GTT GCT CAG CGG-3´.
- PA5 (R): 5´-TCT CTG CAC GCA AAG AAG AAC-3´.

Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron:

1 mM de MgCl₂, 100 µM de dNTP´s, 0.5 pmol de cada oligonucleotido, 1.5 U de Taq polimerasa (invitrogen[5 U/µL) y ≈200 ng de DNA. Usando el siguiente programa para la amplificación: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 45 s, 72°C por 1 minuto; con una extensión final de 72°C por 7 minutos. Producto de amplificación esperado de ≈700 pb.

Para la amplificación de la región codificadora se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- P450A1 (F): 5´-ATG GTG CCG ATG CTA TGG-3´
- P450A2 (R): 5´-CTG TCT CAC TTG GAT GTG-3´

Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron:

1 mM de $MgCl_2$, 100 μM de dNTP's, 0.5 pmol de cada oligonucleótido, 2 U de Taq polimerasa (Invitrogen, 5 U/ μL) y \approx 200 ng de DNA. Usando el siguiente programa para la amplificación: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos: 94°C por 30 s, 58°C por 45 s, 72°C por 2 minutos; con una extensión final de 72°C por 7 minutos. Producto de amplificación esperado de aproximadamente 1500 pb.

Los productos de amplificación fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5%, usando el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen "Trackit" 100pb DNA ladder [0.1 $\mu g/\mu L$])

7.4.3 Purificación de los productos de amplificación

Cuando se realizaba la electroforesis y se obtenían los resultados deseados, se procedía a purificar los productos de amplificación, para después secuenciarlos.

El proceso de purificación de los productos de amplificación se realizaba con kit de purificación de QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit (250)), siguiendo el procedimiento del proveedor.

7.4.4 Secuenciación de los productos amplificados

La secuenciación se llevó a cabo con un secuenciador 3130XL GeneticAnalyzer de la marca AppliedBiosystems. (AppliedBiosystems. Hitachi, San Francisco, USA), mediante protocolo estándar.

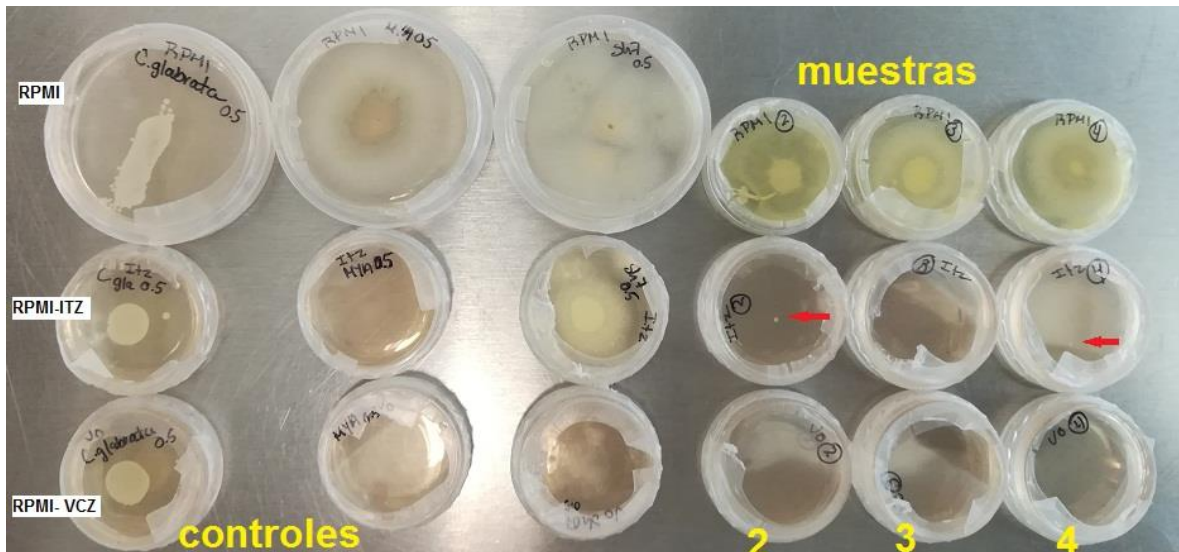
7.4.5 Análisis de las secuencias

Para detectar las mutaciones en *Cyp51A*, la secuencia de los productos se alineó con la secuencia *Cyp51A* de *A. fumigatus* disponible en https://github.com/oliverbader/Aspergillus_fumigatus_cyp51A, usando la alineación múltiple Clustal IW.

8.- RESULTADOS

Se realizó el análisis de cribado en 58 aislados clínicos de *Aspergillus fumigatus*, correspondientes a 49 pacientes. Los 58 aislados fueron previamente identificados por características macroscópicas, microscópicas y mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF (BrukerDaltonics). Siete (12%) de los aislados presentaron una prueba de cribado positiva. Estos aislados fueron sometidos al análisis de secuenciación nucleotídica del gen *Cyp51A* y se encontró que tres de ellos (correspondientes a dos pacientes) presentaron la mutación TR₃₄/L98H.

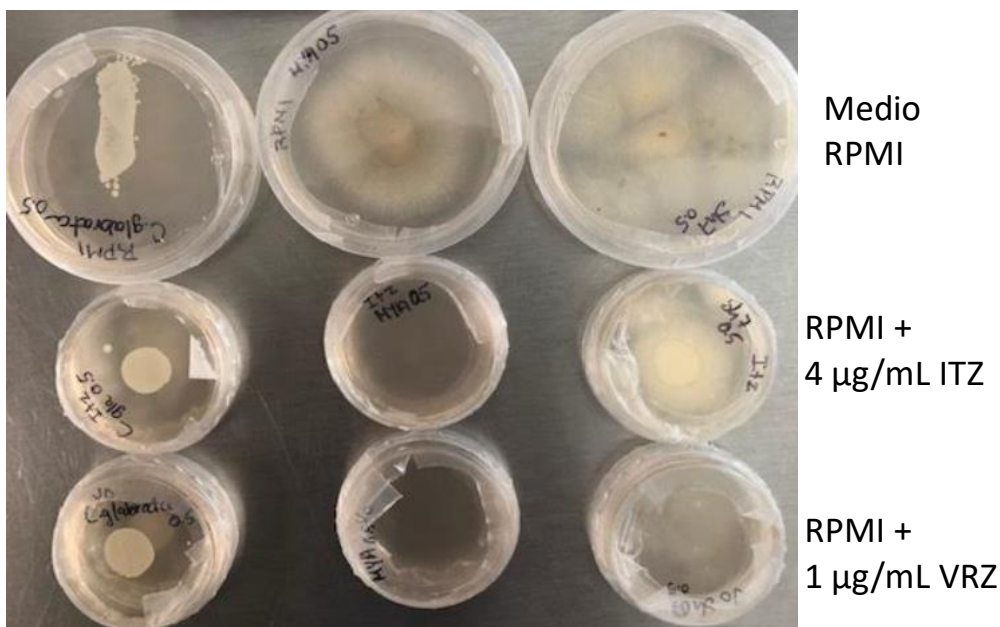
En las siguientes imágenes se muestran algunos de los resultados con la prueba de cribado.



Fotografía 1. Prueba de cribado en medio RPMI.

*RPMI, RPMI/ITC, y RPMI/VCZ.

Se puede observar la flecha para la muestra 2 y la 4 la cuales fueron positivas a la prueba.



Control R

Control S

Aislado problema

Fotografía 2. Controles utilizados en el cribado.

Productos de amplificación por PCR.



Figura 8. Muestra algunos ejemplos de amplificación de aislados clínicos de *Aspergillus*. Gel de agarosa al 1.5%. PA: amplificación de la región promotora; P450: amplificación de la región codificadora. PM: Marcador de Peso Molecular de 100 pb; 1-5: productos de amplificación de aislados clínicos de *Aspergillus*; C-: control negativo.

Análisis de la secuencia nucleotídica de la región promotora del gen *cyp51A*

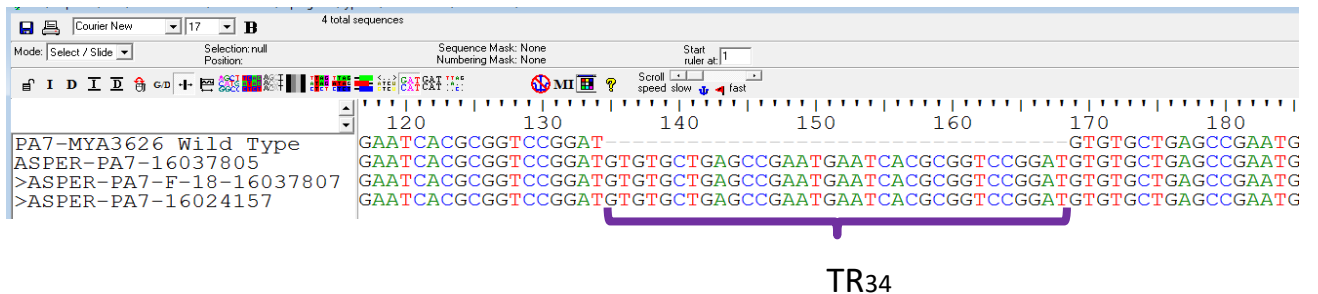


Figura 9. Análisis de la secuencia de la región promotora del gen *Cyp51A*. PA7-MYA3626 Wild Type: secuencia de referencia con región promotora intacta. Asper PA7-16037805, 16037807 Y 16024157: secuencias de los tres aislados que presentaron la inserción de la tanda repetida de 34 pb.

Análisis de la secuencia nucleotídica de la región codificadora del gen *Cyp51A*

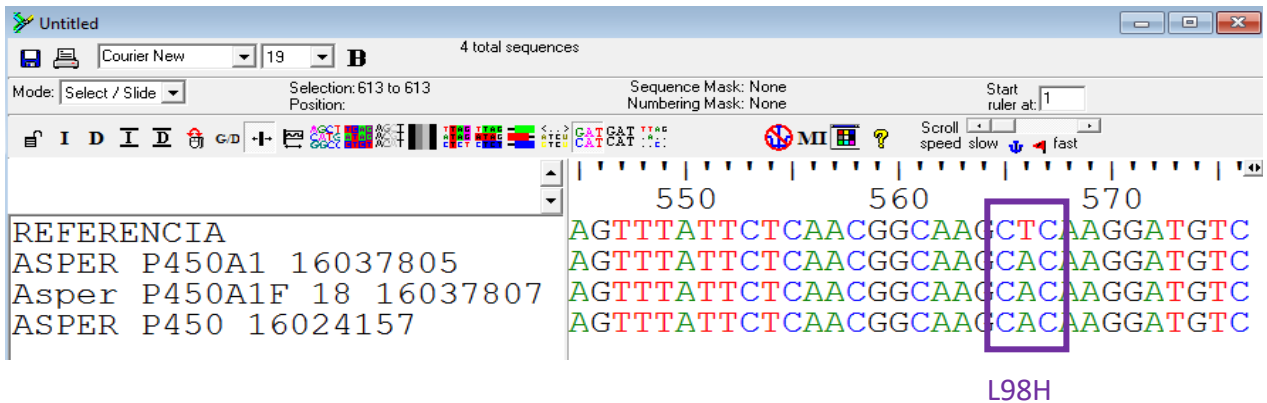


Figura 10. Análisis de la secuencia de la región codificadora del gen *Cyp51A*. Referencia: secuencia de la cepa de referencia MYA3626 con región codificadora con el codón intacto. AsperP450A1 16037805, 16037807 Y 16024157: secuencias de los tres aislados que presentaron la mutación en el codón 98, lo que ocasiona el cambio de una Leucina por una Histidina.

Cabe mencionar que dentro de la información clínica con la que contamos se encuentra que, ambos pacientes se hallaban inmunocomprometidos y presentaron aspergilosis invasiva en el 2016, ninguno de los dos había sido tratado previamente con azoles, ambos sufrieron enfermedad progresiva, fracasaron a la terapia con voriconazol y fallecieron.

9.- DISCUSIÓN

- La prueba de cribado detectó 7/58 (12%) de los *A. fumigatus* con una prueba positiva. De estos siete aislados, solo tres mostraron alteraciones en el gen *cyp51A*, la alteración encontrada fue TR₃₄/L98H. En una publicación reciente (74) se reportó que la prueba de cribado tiene una sensibilidad y especificidad de 99% para la detección de aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles, por lo que recientemente, el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) emitió las recomendaciones a seguir para

realizar la prueba de cribado para la detección de *A. fumigatus* resistente a azoles (73). En nuestro caso detectamos cuatro aislados con una prueba de cribado positiva, sin embargo, con una secuencia intacta en el gen *cyp51A*. Para confirmar o descartar estos resultados como “falsos positivos”, es necesario conocer la concentración mínima inhibitoria para los azoles, lo cual se está abordando en otro proyecto de investigación. Cabe la posibilidad de que los aislados sean realmente resistentes, pero por otro mecanismo diferente a *cyp51A*.

- El 5.2% (3/58) de los aislados de *A. fumigatus* analizados mostraron mutaciones en *cyp51A*. Este es el primer reporte de detección de aislados de *A. fumigatus* resistentes relacionado con mutaciones en *cyp51A* en México. Se ha reportado la emergencia de *A. fumigatus* resistente a nivel mundial. Europa es el continente con las tasas más altas de resistencia, las cuales van del 0% al 26% (59). En América Latina son escasos los datos con los que se cuenta, solo existen reportes aislados de EE UU(75, 76), Argentina(77) y Colombia(78), siendo en este último, datos de aislados ambientales, no clínicos. En el caso de México, este es el primer reporte que se hace al respecto, lo cual es de gran relevancia ya que, en 2015, un grupo de expertos recomendó que el tratamiento de la aspergilosis invasiva debe basarse en las tasas locales de resistencia a los azoles: en aquellos lugares con resistencias mayores al 10%, el tratamiento debe ser voriconazol en combinación con una equinocandina o monoterapia con anfotericina B liposomal, mientras que en lugares con resistencias <5%, los pacientes deben tratarse con monoterapia con voriconazol (67).

Nuestros datos sugieren la necesidad de iniciar un programa de vigilancia nacional, con el objetivo de conocer el panorama real de *A. fumigatus* resistente a azoles en nuestro país, lo cual apoyará al médico en la toma de decisiones al momento de implementar el tratamiento.

- Los tres aislados que encontramos con la mutación *cyp51A* TR₃₄/L98H fueron recuperados de dos pacientes vírgenes a tratamiento con azoles. Esta mutación se ha relacionado con el uso de azoles en la agricultura (39); y es la principal mutación reportada a nivel mundial, encontrada en aislados de pacientes que nunca han recibido tratamiento con azoles, por lo que se asume, que todos estos casos son consecuencia de infección por aislados ambientales con resistencia a azoles adquirida en el campo.

10.- CONCLUSIÓN

Existe un 5.2% de resistencia a azoles en *A. fumigatus* relacionada con la mutación TR₃₄/L98 en el gen *cyp51A* entre pacientes con aspergilosis del INCMNSZ.

11.- BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 5ta ed. México McGraw-Hill 2014. 450 p.
2. Bonifaz Trujillo A. Micología Médica Básica. 5ta ed. México: McGraw-Hill 2015. 725 p.
3. Mirón Hernández A, Culver González MdIO, Lagoma Lorén L, Asensio Cristóbal L. DATABIO: Ficha de agentes biológicos. *Aspergillus spp.* Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). 2015.
4. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014;78:141-73.
5. Alcalá L, Patricia M, Peláez T, Emilio B. *Aspergillus* y aspergilosis. Control Calidad SEIMC.Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón:5.
6. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* Infections in Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews.* 2005;18(1):44-69.

7. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002;100(13):4358-66.
8. Education LIF. fungal infections. LIFE Fungal Infections Trust.
9. Tangarife V FS, Mesa A. Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares. *Medicina & Laboratorio*. 2015;21:211-42.
10. J P. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Revista Iberoamericana de micología*. 2002;19:25-9.
11. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2016;30(1):125-42.
12. Heng SC, Morrissey O, Chen SCA, Thursky K, Manser RL, Nation RL, et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Microbiology*. 2015;41(1):124-34.
13. ROHRLICH P, SARFATI J, MARIANI P, DUVAL M, CAROL A, SAINT-MARTIN C, et al. Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 1996;15(3):232-7.
14. Hao W, Pan Y-X, Ding Y-Q, Xiao S, Yin K, Wang Y-D, et al. Well-characterized monoclonal antibodies against cell wall antigen of *Aspergillus* species improve immunoassay specificity and sensitivity. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(2):194-202.
15. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*. 2001;91(2):311-8.
16. Mattei D, Rapezzi D, Mordini N, Cuda F, Lo Nigro C, Musso M, et al. False-Positive *Aspergillus* Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Results In Vivo during Amoxicillin-Clavulanic Acid Treatment. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(11):5362-3.
17. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False Positive Test for *Aspergillus* Antigenemia Related to Concomitant Administration of Piperacillin and Tazobactam. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(24):2366-7.
18. Walsh TJ, Shoham S, Petraitiene R, Sein T, Schaufele R, Kelaher A, et al. Detection of Galactomannan Antigenemia in Patients Receiving Piperacillin-Tazobactam and Correlations between In Vitro, In Vivo, and Clinical Properties of the Drug-Antigen Interaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(10):4744-8.
19. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT, et al. False-Positive Galactomannan *Platelia Aspergillus* Test Results for Patients Receiving Piperacillin-Tazobactam. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;38(6):913-6.
20. Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A, Souville D, Gay F, Philippe B, et al. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(10):5214-20.

21. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of Aspergillus galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*. 1997;40(9-10):353-7.
22. Singh N, Obman A, Husain S, Aspinall S, Mietzner S, Stout JE. Reactivity of Platelia *Aspergillus* Galactomannan Antigen with Piperacillin-Tazobactam: Clinical Implications Based on Achievable Concentrations in Serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(6):1989-92.
23. Unda F, Agüero J, Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011;29(4):282-5.
24. Imbert S, Normand AC, Gabriel F, Cassaing S, Bonnal C, Costa D, et al. Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of cryptic and rare species of *Aspergillus* by MALDI-TOF. *Medical Mycology*. 2019;57(8):962-8.
25. J. G. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínicas* 2011;30 (1):33-9.
26. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2006;23:38-49.
27. Dudakova A, Spiess B, Tangwattanachuleeporn M, Sasse C, Buchheidt D, Weig M, et al. Molecular Tools for the Detection and Deduction of Azole Antifungal Drug Resistance Phenotypes in *Aspergillus* Species. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017;30(4):1065-91.
28. Price CL, Parker JE, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL. Azole fungicides – understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Management Science*. 2015;71(8):1054-8.
29. José P. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina *Revista Iberoamericana de micología*. 2008;25:78-82.
30. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(3):327-60.
31. M.A.J. A, R. N, R. G. Antifúngicos. Ayer, hoy y mañana. *Educación continua Act Therap Dermatol*. 2007;30: 8.
32. Fortún J, Meije Y, Fresco G, S M. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínicas*. 2012;30 (4):201-8.
33. Ricroch A, Harwood W, Svobodová Z, Sági L, Hundleby P, Badea EM, et al. Challenges facing European agriculture and possible biotechnological solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(5):875-83.
34. V. M, T. S. A short history of fungicides. APS. 2008.
35. Azevedo M-M, Faria-Ramos I, Cruz LC, Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(34):7463-8.
36. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003633-e.

37. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas

Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas, (2012).

38. K.J. B, D.W. H. FUNGICIDE RESISTANCE: THE ASSESSMENT OF RISK. Fungicide Resistance Action Committee. 2007;2:42.

39. Berger S, Chazli Y, Babu A, Coste A. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? *Frontiers in Microbiology*. 2017;8.

40. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Luis Rodríguez-Tudela J. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2002;20(10):523-30.

41. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-Resistant *Aspergillo*sis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*. 2017;216(suppl_3):S436-S44.

42. Camps SMT, van der Linden JWM, Li Y, Kuijper EJ, van Dissel JT, Verweij PE, et al. Rapid Induction of Multiple Resistance Mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during Azole Therapy: a Case Study and Review of the Literature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(1):10-6.

43. Hare R, Gertsen J, Astvad K, Degn K, Løkke A, Stegger M, et al. In Vivo Selection of a Unique Tandem Repeat Mediated Azole Resistance Mechanism (TR120) in *Aspergillus fumigatus* cyp51A, Denmark. *Emerging infectious diseases*. 2019;25:577-80.

44. Lelièvre L, Groh M, Angebault C, Maherault AC, Didier E, Bougnoux ME. Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: An emerging problem. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2013;43(4):139-45.

45. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Sharma C, Sundar G, Singh PK, et al. Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR₃₄/L98H mutations in the cyp51A gene in India. *PLoS One*. 2012;7(12):e52871-e.

46. Snelders E, Camps SMT, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Kema GHJ, van der Lee HA, et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*. 2012;7(3):e31801-e.

47. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Melchers WJG, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A New *Aspergillus fumigatus* Resistance Mechanism Conferring In Vitro Cross-Resistance to Azole Antifungals Involves a Combination of *cyp51A* Alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(6):1897-904.

48. Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, et al. Correlation between Triazole Treatment History and Susceptibility in Clinically Isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(9):4870-5.

49. Fischer J, van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E, Vehreschild MJGT, Wisplinghoff H, Krönke M, et al. Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. isolates from German cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(6):1533-6.
50. Jasinski M, Ducos E, Martinoia E, Boutry M. The ATP-Binding Cassette Transporters: Structure, Function, and Gene Family Comparison between Rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2003;131(3):1169-77.
51. Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K, Goldman GH. Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(1382).
52. Meneau I, Coste AT, Sanglard D. Identification of *Aspergillus fumigatus* multidrug transporter genes and their potential involvement in antifungal resistance. *Medical Mycology*. 2016;54(6):616-27.
53. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997;41(6):1364-8.
54. Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J Fungi (Basel)*. 2016;2(3):21.
55. Snelders E, van der Lee HAL, Kuijpers J, Rijs AJMM, Varga J, Samson RA, et al. Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread of a Single Resistance Mechanism. *PLOS Medicine*. 2008;5(11):e219.
56. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(7):1068-76.
57. Bueid A, Howard SJ, Moore CB, Richardson MD, Harrison E, Bowyer P, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(10):2116-8.
58. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, et al. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Aspergillus* species to the triazoles. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(2):586-90.
59. Van der linden JWM, Arendrup MC, Verweij PE, . Prospective international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: (ICAAC) siCoAAaC, editor. Chicago II: SCARE-NETWORK; 2011.
60. Le Pape P, Lavergne R-A, Morio F, Alvarez-Moreno C. Multiple Fungicide-Driven Alterations in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Colombia, 2015. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(1):156-7.
61. van der Linden JWM, Arendrup MC, Melchers WJG, Verweij PE. Azole Resistance of *Aspergillus fumigatus* in Immunocompromised Patients with Invasive Aspergillosis. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(1):158-9.
62. Leonardelli F, Theill L, Nardin ME, Macedo D, Dudiuk C, Mendez E, et al. First itraconazole resistant *Aspergillus fumigatus* clinical isolate harbouring a G54E

substitution in Cyp51Ap in South America. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2017;34(1):46-8.

63. Gonçalves SS. Global Aspects of Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* with Focus on Latin American Countries. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(1):5.
64. Bustamante B, Illescas LR, Posadas A, Campos PE. Azole resistance among clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* in Lima-Peru. *Medical Mycology*. 2019.
65. van der Linden JWM, Snelders E, Kampinga GA, Rijnders BJA, Mattsson E, Debets-Ossenkopp YJ, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(10):1846-54.
66. van der Linden JWM, Camps SMT, Kampinga GA, Arends JPA, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJA, et al. Aspergillosis due to Voriconazole Highly Resistant *Aspergillus fumigatus* and Recovery of Genetically Related Resistant Isolates From Domiciles. *Clinical Infectious Diseases*. 2013;57(4):513-20.
67. Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, Arendrup MC, Brüggemann RJ, Chowdhary A, et al. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resistance Updates*. 2015;21-22:30-40.
68. Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;63(4):e1-e60.
69. Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyiannis DP, Alexander BD, Kauffman CA, et al. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2010;50(12):1559-67.
70. Maertens JA, Raad II, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *The Lancet*. 2016;387(10020):760-9.
71. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. In: CLSI, editor. 2017.
72. EUCAST. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. In: EUCAST, editor. 2015.
73. Guinea J, Verweij PE, Meletiadis J, Mouton JW, Barchiesi F, Arendrup MC, et al. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(6):681-7.
74. Arendrup MC, Verweij P, Mouton J, Lagrou K, Meletiadis J. Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72.

75. Beer KD, Farnon EC, Jain S, Jamerson C, Lineberger S, Miller J, et al. Multidrug-Resistant *Aspergillus fumigatus* Carrying Mutations Linked to Environmental Fungicide Exposure - Three States, 2010-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018;67(38):1064-7.
 76. Wiederhold NP, Gil VG, Gutierrez F, Lindner JR, Albatineh MT, McCarthy DI, et al. First Detection of TR34 L98H and TR46 Y121F T289A Cyp51 Mutations in *Aspergillus fumigatus* Isolates in the United States. *Journal of clinical microbiology.* 2016;54(1):168-71.
 77. Isla G, Leonardelli F, Tiraboschi IN, Refojo N, Hevia A, Vivot W, et al. First Clinical Isolation of an Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Isolate Harboring a TR46 Y121F T289A Mutation in South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2018;62(10):e00872-18.
 78. Alvarez-Moreno C, Lavergne R-A, Hagen F, Morio F, Meis JF, Le Pape P. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR(34)/L98H, TR(46)/Y121F/T289A and TR(53) mutations related to flower fields in Colombia. *Sci Rep.* 2017;7:45631-.
-