



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA  
SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

***"PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS EN PACIENTES  
CON ASPERGILLUS"***

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

**CARLA MARINA ROMÁN MONTES**

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARIA FERNANDA GONZÁLEZ LARA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ROSA ARELI MARTINEZ GAMBOA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

DRA. DIANA VILAR COMPTE

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

**CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



---

CARLA MARINA ROMAN MONTES

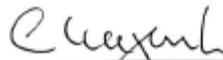
SUSTENTANTE



---

DRA. MARIA FERNANDA GONZÁLEZ LARA

TUTOR PRINCIPAL



---

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

## RESUMEN

*Aspergillus* es un hongo filamentoso ubicuo, que causa enfermedad invasiva en hospederos con factores de riesgo, principalmente trastornos hematológicos e inmunosupresión. El tratamiento antifúngico estándar suele ser con azoles, aunque anfotericina B o equinocandinas muestran actividad contra el hongo. Nuestro objetivo primario fue evaluar la prevalencia de resistencia a azoles en aislados de *Aspergillus fumigatus* de muestras clínicas, describir los patrones de susceptibilidad a antifúngicos de *A.fumigatus* y de otras especies de *Aspergillus* con el análisis según los valores de corte epidemiológico (VCE) existentes.

**Metodología:** Estudio descriptivo, retrospectivo. Se realizó microdilución en caldo a las especies de *Aspergillus* y se describió el valor de concentración mínima inhibitoria, según recomendaciones de CLSI. Se realizó identificación molecular a nivel de especie por secuenciación de B-Tubulina y Calmodulina.

**Resultados:** Se analizaron un total de 136 aislados, de 117 pacientes, 109 con información clínica de los cuales 81 presentaron una IFI. Las especies de *Aspergillus* se clasificaron en siete secciones, siendo *Aspergillus fumigatus* (66/136,48.5%) la especie más frecuentemente aislada de la sección *Fumigati*. En frecuencia la sección Nigri fue la segunda, encontrando una proporción de especies crípticas importante (84%). Se encontró una prevalencia de resistencia a azoles en *A. fumigatus* de 7.5% (5/66) y no se encontró mutación en el gen *cyp51A* de los aislados con resistencia a azoles. De los 81 pacientes con IFI, cinco tuvieron *A. fumigatus* con resistencia a azoles, de los cuales el 80% falleció.

**Discusión y conclusión:** encontramos que los aislados de *A. fumigatus* con resistencia a azoles no presentaron la mutación del gen *cyp51A* descrita en la bibliografía, por lo que se requiere mayor investigación para conocer las causas de la resistencia en estos aislados, por lo que, entre otras cosas, deberemos buscar mutaciones en los genes *erg6* y *hmg1* asociados a la síntesis del ergosterol. En nuestro medio existe una frecuencia ligeramente mayor de aislados de *Aspergillus fumigatus* con resistencia a azoles en comparación a lo reportado de manera global. La mortalidad es similar en los pacientes con aspergilosis por *A. fumigatus* no resistente y por *A. fumigatus* con resistencia a azoles.

## ÍNDICE

1. Marco teórico
2. Planteamiento del problema
3. Justificación
4. Pregunta de investigación
5. Hipótesis
6. Objetivos
7. Metodología
8. Análisis estadístico
9. Resultados
10. Discusión
11. Conclusiones
12. Referencias bibliográficas

## Marco teórico

*Aspergillus* es un hongo ubicuo en el ambiente que se ha relacionado con un espectro de síndromes clínicos, que van desde aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergilosis pulmonar crónica hasta aspergilosis invasiva (AI).<sup>1</sup> En la mayoría de los casos la infección ocurre tras la inhalación de esporas, pero puede ocurrir por diseminación a partir de los senos paranasales, tracto gastrointestinal o la piel. La evolución y pronóstico depende de la interacción entre el patógeno y el grado de disfunción inmune del huésped. La AI se caracteriza por angio-invasión tisular y diseminación hematológica. *Aspergillus* spp. es responsables de más de 200,000 casos de AI cada año, más de 1.2 millones de personas con aspergilosis crónica pulmonar y 4.8 millones de personas con aspergilosis broncopulmonar alérgica.<sup>2,3</sup> Existen más de 300 especies de *Aspergillus*, sin embargo *A. fumigatus* es la más frecuente, seguido de *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger*.<sup>4</sup> Actualmente, se han identificado filogenéticamente a las especies de *Aspergillus*, clasificándolas en subgénero, secciones y especies. Actualmente, se conocen 6 subgéneros, 27 secciones y 75 series. La importancia de la identificación a nivel de especie radica en que las secciones tienen especies crípticas, morfológicamente similares entre ellas, pero con diferencias importantes en su comportamiento como lo es la susceptibilidad a antifúngicos.

La incidencia de AI ha incrementado en las últimas décadas, debido al aumento en el número de hospederos inmunosuprimidos, el uso de esquemas de quimioterapia más agresivos, esquemas de inmunosupresión más intensa en pacientes con trasplante de órgano sólido, así como una mayor sospecha clínica y el uso de métodos diagnósticos más sensibles como el uso de biomarcadores (galactomanano y PCR). Se estima que en México la prevalencia de aspergilosis invasiva en pacientes con neoplasias hematológicas es alrededor del 8%, mientras que en pacientes con trasplantes de órgano sólido se estima que la tasa de incidencia es de 0.7%.<sup>5</sup>

Los factores de riesgo conocidos para el desarrollo de AI son la neutropenia grave (< 500 neutrófilos totales), uso de corticoesteroides, trasplante de órgano sólido (en especial pulmón y corazón), infección concomitante por citomegalovirus, infección avanzada por VIH, enfermos críticos en unidades de cuidados intensivos; inmunodeficiencias primarias (enfermedad granulomatosa crónica) y puede asociarse a otras condiciones como: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, falla hepática y /o renal, uso de esteroides y múltiples esquemas antibióticos así como la coinfección de *Aspergillus* en infecciones graves por influenza, que requieren ventilación mecánica.<sup>6,7</sup>

Las manifestaciones clínicas de AI son variadas, incluyen: fiebre, dolor torácico o pleurítico, disnea y hemoptisis. En tomografía computarizada (TC) el signo del halo (zona de vidrio despolido rodeando a un nódulo en parénquima pulmonar) es un hallazgo sugerente de AI, sin embargo, otros signos inespecíficos son comunes: infiltrados pulmonares difusos y lesiones cavitadas y derrame pleural.<sup>2</sup>

El estándar de referencia para el diagnóstico de AI es el hallazgo en histopatología de hifas septadas con ángulos a 45° o el crecimiento de *Aspergillus* en cultivo muestras estériles. El cultivo de *Aspergillus* spp. se realiza en medios de cultivo estándar en 2-5 días, sin embargo, la interpretación de un cultivo positivo debe tomar en cuenta el sitio anatómico del que proviene (sitios estériles), el contexto del hospedero y los hallazgos radiológicos. El rendimiento diagnóstico del cultivo es bajo y solamente el 30% de los casos de AI tiene un cultivo positivo. El método tradicional para la identificación de las especies de *Aspergillus*, que suele ser el único disponible en la mayoría de los centros, es la descripción de la morfología micro y macroscópica. La principal limitación de este método es que no permite la identificación confiable a nivel de especie, sino solo a nivel de secciones *Fumigati*, *Nigri* y *Flavi*. En años recientes se ha sugerido que las cepas de *Aspergillus* deben ser identificadas hasta el nivel de especie, debido a que las especies crípticas sobre todo las de la sección *Fumigati* presentan susceptibilidad disminuida a azoles. El estándar de oro para la

identificación a nivel de especie es la secuenciación nucleotídica de genes como ITS,  $\beta$  tubulina y/o calmodulina.<sup>2</sup>

Debido a la dificultad de obtener biopsias en pacientes inmunosuprimidos que suelen presentar trombocitopenia, se han desarrollado técnicas basadas en la medición de biomarcadores en suero o en lavado broncoalveolar (LBA) como galactomanano (GM) o la realización de PCR para la detección de las especies de *Aspergillus*.<sup>8</sup>

Para clasificar los episodios de AI con fines de estudios de investigación y también de práctica clínica, se utiliza la clasificación de la European Organization for Research and Treatment of Cancer y Mycoses Study Group Education and Research Consortium. (EORTC/MSG) la cual los divide en aspergilosis posible, probable y probada.<sup>9</sup>

1. Aspergilosis probada: Incluye demostrar la presencia de *Aspergillus* en muestras de cultivo obtenidas de manera estéril (Ej. biopsia) y/o la presencia de histopatología compatible con hifas septadas con una reacción tisular concordante con angio invasión, necrosis e infiltrado inflamatorio. El rendimiento diagnóstico de la histopatología suele ser subóptimo.
2. Aspergilosis probable: Requiere cumplir con criterios del huésped, criterio clínico y criterio micológico.
  - a. Criterio de huésped, presentar uno de los siguientes: Historia de neutropenia por más de 10 días previo al inicio del cuadro clínico, receptores de trasplante de células hematopoyéticas, uso de esteroides a una dosis equivalente a 0.3 mg/Kg por día o más por al menos 3 semanas, uso de inmunosupresores como ciclosporina, antiTNFalfa, anticuerpos monoclonales específicos como alentuzumab, o análogos nucleósidos en los 90 días previos.
  - b. El criterio clínico incluye evidencia de infección fúngica pulmonar, con la presencia de infiltrados nodulares con o sin signo del halo, signo de aire

creciente o cavitaciones; traqueobronquitis con la presencia de úlceras, nódulos, pseudomembranas, placas o escaras vistos durante broncoscopía; infección nasosinusal con la presencia de sinusitis, por estudio de imagen más de uno de los siguientes: dolor agudo localizado en la región de senos paranasales, úlcera nasal con necrosis, extensión de la afección sinusal a hueso; infección de SNC con lesiones focales en estudio de imagen o reforzamiento meníngeo mediante tomografía o resonancia magnética.

- c. El criterio micológico incluye la presencia de uno de los siguientes: Hallazgo de hifas mediante estudio directo que puede ser citología, microscopía directa o cultivo tomado de esputo, lavado broncoalveolar y/o aspirado sinusal; o evidencia indirecta de infección fúngica como detección de galactomanano en plasma, suero, lavado broncoalveolar o líquido cefalorraquídeo. Se considera un galactomanano positivo cuando la densidad óptica del ensayo se reporta  $>0.5$

3. Aspergilosis posible: Requiere cumplir con los criterios del huésped y criterio clínico, pero sin criterio micológico.

En años recientes se han descrito otros factores de riesgo para presentar AI por lo que, se han descrito algoritmos de diagnóstico como el algoritmo AspICU modificado, el cual no contempla el criterio del huésped mencionado en los criterios de EORTC, y consta de los siguientes criterios:<sup>10</sup>

- Clínico, uno de los siguientes: fiebre refractaria por al menos tres días con el antibiótico apropiado, fiebre recrudesciente posterior a un período de 48hrs afebril aún con antibiótico o sin otra causa aparente, disnea, hemoptisis, dolor pleurítico o torácico, empeoramiento de la función respiratoria a pesar de manejo antibiótico y soporte ventilatorio.

- Radiológico: cualquier infiltrado en estudio de imagen pulmonar (radiografía de tórax o CT).
- Micológico, uno o más deben estar presentes: demostración por histopatología o demostración directa de hifas septadas con cultivo de tejido positivo con *Aspergillus*, cultivo de LBA positivo con *Aspergillus*, GM<sup>3</sup> con 1.0 DO a partir de muestra de LBA o GM<sup>3</sup> con 0.5 DO a partir de muestra sérica.

El tratamiento de primera línea recomendado por las guías de 2016 de la Sociedad Norteamericana de Enfermedades Infecciosas (IDSA por sus siglas en inglés) es voriconazol. Lo anterior, basado en un estudio aleatorio que demostró mayor supervivencia, mejores desenlaces y menor toxicidad en el grupo de voriconazol en comparación con anfotericina B deoxicolato. La Anfotericina B liposomal, se reserva para pacientes con hepatotoxicidad que impida el uso de voriconazol o el hallazgo de cepas resistentes a voriconazol. Además, múltiples estudios de cohorte subsecuentes han demostrado supervivencia del 15% más en los pacientes con voriconazol en comparación contra otras terapias. El uso de equinocandinas se recomienda como tratamiento de rescate, solas o en combinación. No se recomienda como tratamiento de primera línea.<sup>7,11</sup>

Con relación al pronóstico, los estudios anteriores al tratamiento de primera línea con voriconazol reportaban una mortalidad en los pacientes neutropénicos con AI de 50%, y hasta 90% en receptores de trasplante de células hematopoyéticas.<sup>12</sup> Estudios recientes, como el SECURE trial, comparó voriconazol contra isavuconazol en pacientes hematológicos con AI probable o probada, se observó una mortalidad a 6 semanas de 19-20% y una mortalidad a 12 semanas de 29 y 31%, respectivamente.<sup>13</sup> Por otro lado, Bitar et al reportaron una tendencia decreciente en la mortalidad atribuible de los casos con AI de 32% a 25 % en el periodo 2001 a 2010.<sup>14</sup>

Los siguientes factores se han relacionado con mayor mortalidad en diversos estudios: uso de esteroides, la presencia de insuficiencia respiratoria, mayor edad, uso de ventilación

mecánica, trasplante de células hematopoyéticas, terapia de reemplazo renal, hepatopatía, diabetes mellitus, estancias hospitalarias prolongadas.<sup>15,16</sup>

En 1997 se describieron los primeros dos casos de *A. fumigatus* resistentes a azoles (ARAF) en California.<sup>17</sup> Posteriormente, en 2007 se reportaron 13 cepas con una concentración mínima inhibitoria (CMI) elevada para azoles, en muestras de pacientes de los Países Bajos desde 2002. En este estudio se reportó la presencia de un nuevo mecanismo de resistencia que consistía en un incremento en el número de tandas repetidas en el promotor del gen *cyp51A* y en la sustitución del nucleótido del codón 98 (L98H). Posteriormente, en 2008 se encontraron ARAf en un cepario de muestras recolectadas entre 1994 y 2002 en seis países europeos. Al inicio del periodo se describió una prevalencia de 1.7% y mientras que, al final fue del 6%. En este estudio se describió que la mutación más frecuentemente encontrada (94%) en los aislados resistentes era la TR<sub>34</sub>/L98H, previamente descrita. Esta mutación se caracteriza por causar resistencia cruzada a todos los azoles.<sup>17-19</sup>

En 2013 se describió una segunda mutación caracterizada por 46 repeticiones en tandem en el promotor del gen *cyp51A*. Se le denominó TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A por las sustituciones en los aminoácidos correspondientes.<sup>20</sup> Esta mutación confiere resistencia de alto nivel a voriconazol (CMI 50 >16), y resistencia variable a los otros azoles. También se le asoció a falla terapéutica en pacientes con AI tratados con voriconazol. Además, se identificó otra mutación con 53 repeticiones en la región promotora de aislados ambientales en Colombia y en un paciente con exposición crónica a itraconazol.<sup>21</sup>

Debido a que en el 60-71% de los pacientes con AI por cepas con las mutaciones descritas eran vírgenes al tratamiento con azoles, se evaluó el efecto in vitro de los azoles utilizados por la industria agrícola.<sup>19</sup> Se sabe que la enzima codificada por el *cyp51A* (14ª demetilasa) es responsable de un paso en la síntesis de ergosterol y es el blanco de la terapia con azoles.<sup>22</sup> Las mutaciones que generan resistencia se desarrollan en ambientes donde el hongo es expuesto a azoles con actividad anti-*Aspergillus*, como sucede con los siguientes

fungicidas ambientales: propiconazol, tebuconazol, epoxiconazol. La molécula de estos fungicidas tiene similitud con los triazoles de uso médico y fueron introducidos al mercado entre 1990 y 1996. La exposición de *A. fumigatus* a los mismos y la reproducción sexual, parasexual y asexual que ocurre en el ambiente incrementa la capacidad del hongo para presentar recombinación genética. Estudios in vitro han demostrado la capacidad de los fungicidas ambientales de inducir la aparición de TR<sub>34</sub>/L98H en cepas wild-type de *Aspergillus*.<sup>22</sup>

Al ser utilizados de manera global, existe un nicho importante en el ambiente donde las especies resistentes de *Aspergillus* pueden sobrevivir, estas cepas son capaces de colonizar y causar enfermedad invasora en huéspedes susceptibles ya que las mutaciones no generan disminución de la “*eficacia biológica*”. Se piensa que la resistencia a los azoles se puede convertir en un problema de salud pública, ya que las esporas se pueden dispersar grandes distancias.<sup>23</sup>

El estudio SCARE evaluó la prevalencia de resistencia en 19 países europeos, estimando un 3.2% global, con una variabilidad regional importante, donde Reino Unido presentó una prevalencia tan elevada como 26%.<sup>24,25</sup> En el estudio ARTEMIS que incluyó 62 centros de manera global, se reportó un 5.8% de resistencia a azoles en aislados de ARAf, todos provenientes de China, 8/29 con la mutación TR34/L98H.<sup>26</sup>

En E.E.U.U se ha reportado una prevalencia ARAf del 5% de 1,026 aislados recolectados de 2011 a 2013, sin detectar las mutaciones de origen ambiental.<sup>27</sup> Fue hasta 2015 que se reportó el hallazgo de dos aislados con la mutación TR<sub>34</sub>/L98H.<sup>28</sup> En Latinoamérica, se han reportado mutaciones de origen ambiental, asociadas ARAf, únicamente en algunas regiones y se piensa existe un importante subregistro.<sup>29</sup> En México se ha publicado un estudio en donde se realizó microdilución en caldo a 25 aislados de *Aspergillus* de pacientes con queratitis, la mayoría eran *A. flavus* con concentración inhibitoria mínima por debajo del punto de corte epidemiológico, pero no se incluyeron *A. fumigatus*.<sup>30</sup> En la ciudad de México, en un

centro de tercer nivel de atención en 2018 se identificaron dos casos con la mutación TR<sub>34</sub>/L98H en dos pacientes con AI que presentaron falla al tratamiento con voriconazol y fallecieron.<sup>31</sup> Recientemente se publicó un análisis más grande de susceptibilidad en el cual analizaron muestras clínicas y ambientales, en este estudio encontraron un 32% de aislados con CMI's a azoles por arriba de los puntos de corte (cepas no wild type), sin embargo, no se realizó mayor investigación en las cepas no wild type.<sup>32</sup>

Se han descrito otros mecanismos de resistencia, por ejemplo, en pacientes bajo tratamiento crónico con azoles, ocurre reproducción asexual de *A. fumigatus* con producción abundante de esporas bajo presión selectiva dentro de las cavernas. En estos casos se han descrito mutaciones puntuales en el gen *cyp51A* que corresponden a sustituciones en G54, P216, F219, M220, G138, Y431, G448.<sup>28</sup> Otro mecanismo de resistencia a azoles, independiente de *cyp51A* es la sustitución de un aminoácido en el gen *HapE* que ocasiona la sobreexpresión del *cyp51A*.<sup>27,33,34</sup>

El método de referencia para evaluar la susceptibilidad a antifúngicos en hongos filamentosos, fue establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y se basa en la técnica de microdilución en caldo que consiste en probar diferentes concentraciones de antifúngicos contra una suspensión que contiene un inóculo conocido de esporas obtenidas de cultivos frescos, utilizando el caldo de cultivo RPMI 1640.<sup>35</sup>

Hasta la fecha no se han establecido puntos de corte clínicos (PCC) del inglés “*breakpoints*” de resistencia debido a que no se ha logrado establecer claramente una relación de la CMI con el desenlace de los pacientes y para ello se requiere un conjunto de información de la farmacocinética, farmacodinámica, ensayos clínicos, entre otros factores. Por este motivo, la mayoría de los resultados se interpretan de acuerdo a los valores de corte epidemiológicos (VCE) que discriminan a la población *Wildtype* de aquella que pueda contener mecanismos de resistencia. En el caso de *A. fumigatus*, se cuenta con un punto de corte clínico solo para voriconazol (1.0 µg/mL), mientras que para el resto de los azoles, únicamente se cuenta con

el VCE para Isavuconazol (1.0 µg/mL) e Itraconazol (1.0 µg/mL), sin embargo, no se cuenta con puntos de corte para posaconazol. Para equinocandinas, se tiene VCE para Caspofungina (0.5 µg/mL del valor de concentración mínima efectiva [CME], que es la concentración más baja de caspofungina que conduce al crecimiento de de hifas pequeñas redondeadas y compactas en comparación con el crecimiento de hifas observado en el pozo de control de crecimiento. Para otras especies como *A. flavus* el VCE para voriconazol es 2.0 µg/mL, itraconazol 1.0 µg/mL y posaconazol 0.5 µg/mL. En *A. niger*, el VCE para voriconazol es de 2.0 µg/mL, itraconazol 4.0 µg/mL y posaconazol 2.0 µg/mL. Finalmente, para *A. terreus*, el de voriconazol es de 2.0 µg/mL, itraconazol 2.0 µg/mL y posaconazol 1.0 µg/mL. Para anfotericina B, el VCE para *A. fumigatus* y *A. niger* es 2 µg/mL y para *A. flavus* y *A. terreus* es de 4.0 µg/mL.<sup>36,37</sup>

Las guías más recientes de la *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) para el diagnóstico y tratamiento de aspergilosis, no recomiendan realizar pruebas de susceptibilidad a antifúngicos de manera rutinaria, sugieren realizarlas en casos de falla terapéutica o por motivos epidemiológicos.<sup>7</sup> Por el contrario, la guía Europea sugiere realizar pruebas de susceptibilidad a antifúngicos a todas las cepas de pacientes con AI, a excepción de aquellas cepas de zonas donde existan programas de vigilancia regulares y no se hayan detectado cepas resistentes.<sup>38</sup> De igual manera, debido a que algunas especies crípticas de la sección *Fumigati* tienen CMI elevadas a azoles, se recomienda su identificación hasta a nivel de especie de manera rutinaria. Estas especies son morfológicamente indistinguibles entre ellas y requieren la secuenciación de las regiones ITS, β-tubulina y calmodulina.<sup>38</sup>

Existe poca información acerca del tratamiento en pacientes con cepas resistentes. Estudios in vitro han sugerido que la efectividad del tratamiento combinado depende del tipo de mutación observada. Además, se han observado CMI elevadas a isavuconazol en presencia de las mutaciones TR<sub>34</sub>/L98H y TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A.<sup>2</sup> Finalmente, un panel de expertos internacionales en 2015, sugirió que en regiones donde la prevalencia de resistencia a azoles

sea mayor del 10%, el tratamiento antifúngico empírico para los casos de AI sea combinado, hasta corroborar la susceptibilidad.<sup>39</sup>

### **Planteamiento del problema**

Por lo descrito anteriormente, consideramos necesario establecer de manera inicial, la prevalencia de resistencia a antifúngicos a nivel local, así como a futuro establecer valores a nivel nacional. Además, es necesaria la identificación de *Aspergillus* hasta el nivel de especie para poder orientar de manera más certera el tratamiento antifúngico inicial o empírico en pacientes con aspergilosis, en el entendido que las especies crípticas pueden presentar patrones de susceptibilidad diversos.

Hasta el momento se han realizado escasos estudios observacionales en México que describen la epidemiología de pacientes con aspergilosis invasiva. En las últimas décadas, se ha descrito, a nivel mundial, el surgimiento de cepas de *Aspergillus* resistentes a azoles, y siendo voriconazol el tratamiento de primera línea, esto, es alarmante. El uso de fungicidas ambientales es un fenómeno global, por lo que el desarrollo de las mutaciones asociadas es un evento que en consecuencia tiene el potencial de afectar a los pacientes susceptibles de AI en todo el mundo. Por otro lado, se ha sugerido que las cepas de *Aspergillus* deben ser identificadas hasta el nivel de especie, debido a que las especies crípticas sobre todo de la sección *Fumigati* y *Nigri* presentan susceptibilidad disminuida a azoles. Mediante los métodos tradicionales, la identificación se limita a la sección *Fumigati*, *Nigri* y *Flavi*.

La información respecto a la susceptibilidad a antifúngicos de *Aspergillus* a los antifúngicos en México está limitada, por lo que, consideramos que se requiere más información para conocer la prevalencia de resistencia a los antifúngicos.

### **Justificación**

Debido al incremento en la incidencia de infecciones fúngicas invasivas, sobre todo de aspergilosis invasiva relacionada tanto al aumento en el número de pacientes susceptibles, como a las nuevas técnicas diagnósticas, es importante el conocimiento del estado actual de la epidemiología, características clínicas y desenlace de los pacientes con este padecimiento.

Por el incremento en la incidencia y prevalencia de resistencia a azoles principalmente en *A. fumigatus*, es necesario conocer la prevalencia de resistencia inicialmente en centros con atención pacientes susceptibles de desarrollar esta infección en México.

En el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, se han identificado dos casos de *A. fumigatus* con mutaciones relacionadas a resistencia adquirida en el medio ambiente, lo cual es algo preocupante.<sup>31</sup> Consideramos que conocer la prevalencia de resistencia permitirá definir mejor las recomendaciones de tratamiento empírico y monitorear la emergencia de las cepas con resistencia adquirida en el medio ambiente.

Debido al incremento en la incidencia de infecciones fúngicas invasivas, sobre todo aspergilosis invasiva relacionado tanto al aumento en el número de pacientes susceptibles, como a las nuevas técnicas diagnósticas, es importante el conocimiento del estado actual de la epidemiología, características clínicas y desenlace de los pacientes con este padecimiento.

### **Pregunta de investigación**

¿Cuál es la frecuencia de resistencia a azoles en los aislados de *Aspergillus fumigatus*?

### **Hipótesis**

La prevalencia de resistencia a azoles en las cepas de *Aspergillus fumigatus* será entre 4-30%.

### **Objetivos**

**Principal:**

- Determinar la prevalencia de *Aspergillus fumigatus* resistente a azoles en aislados clínicos mediante microdilución en caldo.

**Específicos:**

- Determinar la distribución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de anfotericina B y azoles, así como la concentración efectiva mínima (CME) de las equinocandinas sobre aislados clínicos de *Aspergillus* spp.
- Identificar mutaciones en el gen *cyp51A*, de cepas de *Aspergillus fumigatus* resistente a azoles, mediante PCR y secuenciación.
- Identificación de cepas de *Aspergillus* a nivel de especie mediante MALDI-TOF y mediante secuenciación del gen  $\beta$ -tubulina y calmodulina.
- Describir la frecuencia de infección fúngica invasiva (IFI) tipo aspergilosis invasiva, describir las características clínicas y desenlace de los pacientes con aspergilosis y cultivo positivo.

**Metodología**

Se trata de un estudio transversal y observacional. Muestreo no probabilístico consecutivo. Se recolectaron de manera ambispectiva los aislados clínicos de *Aspergillus* spp. en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" para su estudio.

Se realizaron pruebas de susceptibilidad a antifúngicos mediante microdilución en caldo, para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de voriconazol, posaconazol, itraconazol y anfotericina B, así como la concentración mínima efectiva (CME) a caspofungina de cada aislado. En todas las cepas de *A. fumigatus* con CMI igual o mayor al punto de corte de resistencia, se realizó secuenciación del gen *cyp51A* para identificar mutaciones.

Asimismo, se realizó la identificación a nivel de especie de todas las cepas mediante MALDI-TOF Bruker Biotyper (Filamentous Fungi library 4.0) y secuenciación parcial del gen  $\beta$ -tubulina y calmodulina la cual fue la reportada.

Se recabó información demográfica y clínica de los pacientes con cultivo positivo para *Aspergillus* spp. para consignar si presentaba infección fúngica invasiva probada o probable, según los criterios de la EORTC, o del algoritmo modificado de AspICU en los casos de aspergilosis en pacientes críticos o bien, según los criterios de International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM) para aspergilosis asociada a COVID-19.<sup>9,10,40</sup>

Se obtuvo información clínica con apoyo de una herramienta de captura de características demográficas, clínicas y acerca del tratamiento antifúngico administrado. Se realizó la evaluación a las 6 semanas del diagnóstico para establecer el desenlace en cada paciente, con énfasis en resolución o no de los síntomas y en mortalidad. No se realizaron intervenciones sobre el tratamiento de los pacientes. El tiempo estimado de la recolección de aislados y procedimientos fue de 18 meses.

### **Criterios de selección**

Se incluyeron a todos los aislados de *Aspergillus* spp. provenientes de muestras clínicas de pacientes de nuestro instituto.

### **Procedimientos de laboratorio**

Todos los aislados de *Aspergillus* de muestras clínicas detectados en el Laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ fueron registrados para posteriormente ser sometidos a identificación mediante MALDI-TOF, secuenciación nucleotídica de una región parcial del gen  $\beta$ -tubulina y calmodulina, así como, determinación de los perfiles de susceptibilidad.

- Identificación por MALDI-TOF: Para la identificación por MALDI TOF, se realizó el cultivo en medio líquido Sabouraud con rotación a 360 grados. Se realizó el lavado de la masa

fúngica, para posteriormente realizar la extracción en tubo con etanol, ácido fórmico al 70% y acetonitrilo, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La lectura se realizó en el equipo MALDI-TOF Biotyper ver. 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany) y con el uso de la biblioteca Fungi 1. Para la interpretación de los resultados se tomaron en cuenta las recomendaciones del fabricante: puntaje  $\geq 2$  identificación correcta a nivel de género y especie;  $\geq 1.7$  identificación correcta a nivel de género únicamente, y  $< 1.7$  identificación no confiable.

• **Identificación molecular:**

a. Extracción de DNA: Todos los aislados de *Aspergillus* se sub cultivaron en medio agar Sabouraud a 37°C por 24 h. A partir de este desarrollo, se subcultivo nuevamente, pero en caldo Sabouraud a 37°C por 24 h. Se realizó la cosecha para extraer el DNA mediante ruptura mecánica con perlas de circonia de ¼ de pulgada y el equipo Pre Cellius y el kit de extracción E.Z.N.A Fungal DNA Isolation según las recomendaciones del fabricante. La concentración y pureza del DNA se analizó con el uso del NanoDrop.

b. Amplificación del gen  $\beta$ -tubulina. Se realizó la amplificación parcial del gen  $\beta$ -tubulina mediante el uso de los oligonucleótidos Bt2a 5´-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3´ y Bt2b 5´- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3´. El producto de amplificación, de 600pb aproximadamente, se analizó en gel de agarosa, usando como referencia el marcador de peso molecular de 100pb. Los productos de PCR se purificaron con las columnas PCR QIAquick spin (Qiagen, Venlo, Netherlands) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

c. Amplificación del gen calmodulina d. Secuenciación e identificación de la especie. La secuenciación de ambos genes se realizó en un secuenciador automatizado 3130 xL (Applied Biosystems, Hitachi, San Francisco, EE.UU) mediante el protocolo estándar. Las secuencias se compararon con las disponibles en la National Center for Biotechnology Information Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando el algoritmo BLAST, con las de MycoBank DataBase e ISHAM. Como control de secuenciación se incluyó la cepa de *A. fumigatus* ATCC MYA.

e. Análisis filogenético. Mediante el uso de “multiple alignment ClustalW”, alineamos las secuencias con BioEdit, editamos y exportamos los documentos como FASTA. Se determinó el mejor árbol evolutivo a través de MEGA7. El análisis de máxima verosimilitud también se realizó con MEGA7 con un non-parametric bootstrap usando 1000 réplicas.

f. Análisis molecular del gen *cyp51A*

i. Para la amplificación e identificación de las secuencias repetidas en la región promotora del gen *cyp51A* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: PA7F-5`TCATATGTTGCTCAGCGG-3`, PA5R-5`TCTCTGCACGCAAAGAAGAAC-3`

ii. Para la amplificación e identificación las mutaciones en la región codificante del gen *cyp51A* se usaron los siguientes oligonucleótidos: p450A1-5`ATGGTGCCGATGCTATGG-3`, p450A2-5`CTGTCTCACTTGGATGTG-3`

Los productos de amplificación de 600 y 1500 pb se analizaron en gel de agarosa. Los productos de PCR se purificaron con las columnas PCR QIAquick spin (Qiagen, Venlo, Netherlands) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, y se realizó la secuenciación nucleotídica y el alineamiento con la secuencia correspondiente de la cepa WT, disponible en [https://github.com/oliverbader/Aspergillus\\_fumigatus\\_cyp51A](https://github.com/oliverbader/Aspergillus_fumigatus_cyp51A), para detectar las mutaciones.

**Susceptibilidad a antifúngicos mediante microdilución en caldo:** Se realizaron pruebas de microdilución en caldo a itraconazol (Sigma Aldrich), voriconazol (Sigma Aldrich), posaconazol (Sigma Aldrich) y anfotericina B (Sigma Aldrich) y caspofungina, todos en un rango de 0.03-  $\geq$ 16  $\mu$ g/mL, siguiendo el CLSI\_M38. En breve, los aislados de *Aspergillus* spp. se incubaron en agar Sabouraud a 30°C durante 5-7 días. Para la recolección de las conidias se agregó solución salina y con la ayuda de un asa de plástico estéril se facilitó su suspensión y se aspiraron con una pipeta. Se dejó sedimentar durante 3 a 5 minutos y posteriormente se tomó el sobrenadante para ajustar el inóculo a 0.09-0.13 de absorbancia a 530 nm. De esta suspensión, se tomaron 150  $\mu$ L y se mezclaron con 7350  $\mu$ L de solución salina, para obtener una dilución 1:50. Utilizando una pipeta multicanal se tomaron 100  $\mu$ L de la suspensión para

inocular cada uno de los pozos de la placa de microdilución. La microplaca se incubó a 35°C ± 2°C por 24-48 horas. Se determinó la CMI de anfotericina B, itraconazol, posaconazol y voriconazol, así como la CEM de caspofungina. Como control de calidad se utilizaron cepas de referencia (*C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 y *A. fumigatus* MYA ATCC 3626) Se consideró la CMI como la concentración más baja del antifúngico que inhibió el 100% de crecimiento del hongo filamentoso y la CME como la concentración más baja del antifúngico que produjo crecimiento de hifas pequeñas, redondas y compactas en comparación con el control de crecimiento.

**Evaluación clínica.** Se realizó la revisión características demográficas y clínicas: énfasis en edad, sexo, comorbilidades, antecedente de consumo de esteroides, tabaquismo. Se registro si contaban con el criterio clínico (tomografía de tórax con lesiones compatibles de infección fúngica, etc.). Se registro si cumplieron con criterio de AI según criterios de EORTC/MSG, AspICU o CAPA en los pacientes con COVID-19. Se registró desenlaces clínicos, recepción de antifúngico y muerte a las 6 semanas. De manera extra se registraron variables de laboratorio como conteo de leucocitos, neutrófilos y linfocitos.

### **Análisis estadístico**

Se describió la frecuencia de las especies de *Aspergillus* mediante número y porcentaje. Se describió el número y porcentaje de cepas con CMI y CME de cada antifúngico por encima del punto de corte epidemiológico, así como el percentil 50, 97.5 y 99 de la CMI y CME de la combinación de cada antifúngico y especie de *Aspergillus* spp. Se describió la frecuencia de cepas identificadas como resistentes, así como la frecuencia de especies crílicas de las principales secciones. Se realizó análisis descriptivo de las características sociodemográficas y clínicas mediante media, desviación estándar, mediana y rangos intercuartiles para las variables cuantitativas de acuerdo con su distribución, así como porcentajes para las variables cualitativas.

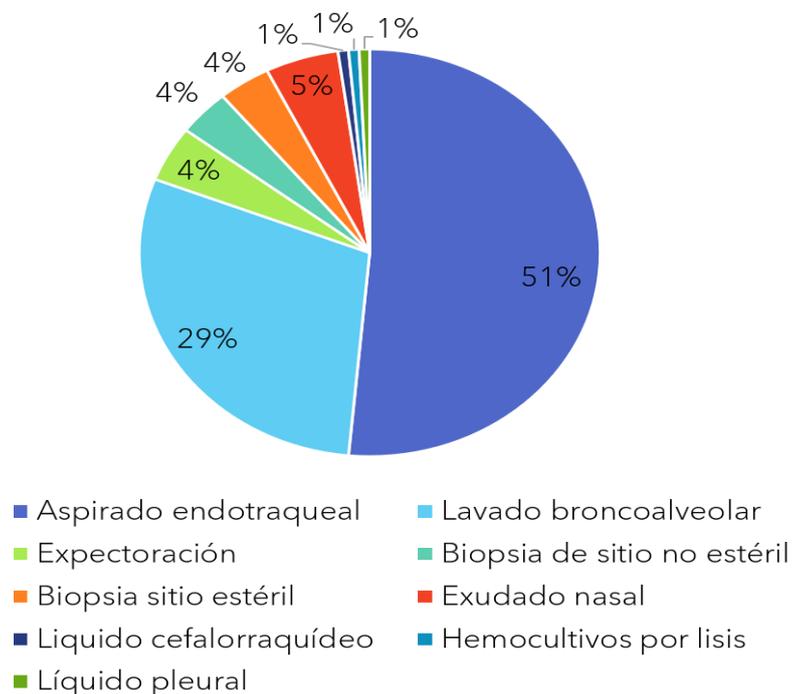
El tamaño de la muestra se calculó según la prevalencia reportada a antifúngicos en un estudio piloto de 7%, mediante la fórmula  $n = Z^2 P (1-P) / d^2$ . Se tomó en cuenta valor de Z 1.96 para IC95% y un nivel de precisión (d) de 0.05. El cálculo de la muestra (n) con dichos valores fue de 100.

## Resultados

Durante el período de estudio se analizaron un total de 136 aislados de *Aspergillus spp.* de muestras clínicas recibidas entre septiembre de 2018 y febrero de 2021. Los 136 aislados provienen de 131 muestras clínicas de 117 pacientes (104 pacientes con 1 aislado, 10 pacientes con 2 aislados, 3 pacientes con 3 aislados y 1 paciente con 4 aislados de 2 muestras clínicas). El sitio de aislamiento de las cepas de *Aspergillus spp.* fue en 70 (51%) de aspirado traqueal, 40 (29%) de lavado broncoalveolar principalmente, se muestran todos los sitios de aislamiento en la Figura 1.

**Figura 1. Sitio de aislamiento de aislados clínicos de *Aspergillus spp.***

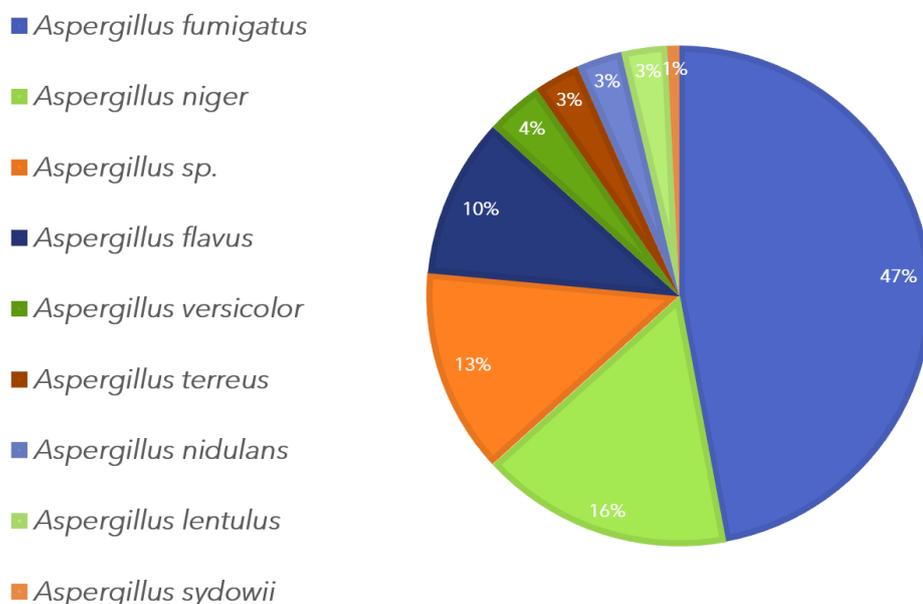
Sitio de aislamiento de *Aspergillus spp.*



Respecto a las 131 muestras clínicas (3 muestras con 2 especies de *Aspergillus* y 1 con 3 especies de *Aspergillus* en la misma muestra), en 35 (27%) se obtuvo otro aislamiento microbiológico, siendo más frecuente bacterias, incluidas micobacterias (8 enterobacterias, 6 *Pseudomonas aeruginosa*, 3 *Staphylococcus aureus*, 3 *Streptococcus pneumoniae*, 3 *Stenotrophomonas maltophilia*, 3 *Mycobacterium tuberculosis* y 2 *M. avium*), seguido de otros hongos (4 mucorales, 2 *Geotrichum spp.* y 1 *Alternaria spp.*).

La identificación por especie se clasificó en general en 7 secciones, siendo la más frecuente la sección *Fumigati* con 70 (51.5%) especies aisladas, seguida de la sección *Nigri* 25 (18.4%), sección *Flavi* 21 (15.4%), sección *Versicolores* 7 (5.1%), sección *Nidulantes* 6 (4.4%), sección *Terrei* 5 (3.6%) y sección *Aspergillus* con 2 (1.6%) aislados. Respecto a la identificación a nivel de especie por morfología y/o MALDITOF, se presenta la proporción de especies como se reportan en la práctica clínica en la Figura 2, resalta *A.fumigatus* como la especie más frecuente (47%).

**Figura 2. Frecuencia de especies identificadas por MALDITOF y morfología.**



Presentamos en la Tabla 1, la identificación a nivel de especie por identificación molecular (secuenciación de  $\beta$ -tubulina y calmodulina). Se encuentra pendiente dicha identificación en 16 aislados y se presentan únicamente la identificación por sección. En cuanto a la concordancia entre la identificación por MALDITOF y la molecular a nivel de sección la concordancia es del 100%, excluyendo los 16 aislados en los que aún no se ha realizado completa la identificación molecular. Sin embargo, en la identificación por MALDITOF y la molecular a nivel de especie la concordancia se presentó en el 76%, con una Kappa de 0.64 (IC95% 0.609-0.65,  $p < 0.0001$ ), lo que significa un acuerdo o concordancia moderada.

**Tabla 1. Distribución de las especies de *Aspergillus* identificadas por secuenciación del gen  $\beta$ -tubulina y calmodulina, y elaboración de árbol filogenético**

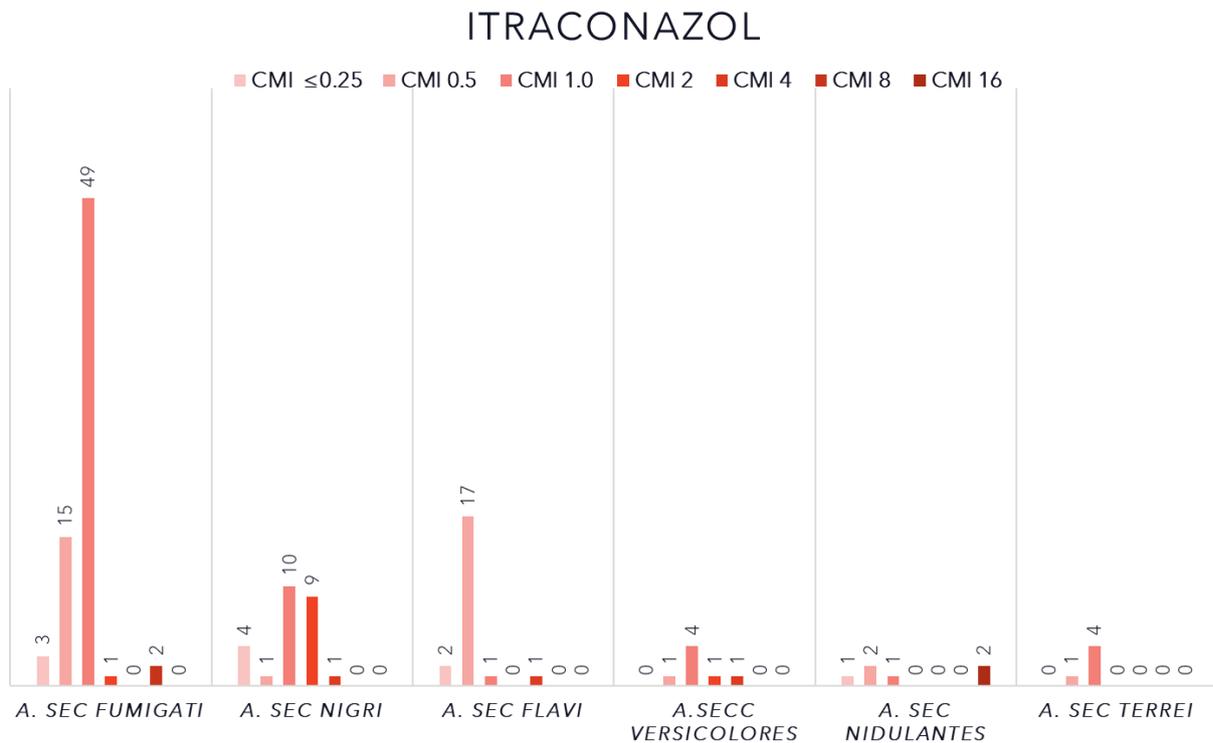
Subgénero	Sección	Número de aislados N=136	Identificación por secuenciación
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i> (N=70)	66 2 2	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus lentulus</i> <i>Aspergillus hiratsukae</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Nigri</i> (N=25)	4	<i>Aspergillus niger</i>
		5	<i>Aspergillus tubingensis</i>
3		<i>Aspergillus welwitschiae</i>	
2		<i>Aspergillus costaricensis</i>	
1		<i>Aspergillus neoniger</i>	
1		<i>Aspergillus phoenix/awamori</i>	
9		Pendiente secuenciación	
	<i>Flavi</i> (N=21)	18 3	<i>Aspergillus flavus/oryzae</i> <i>Aspergillus tamari</i>
<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i> (N=5)	4 1	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus neoniveus</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Versicolores</i> (N=7)	6 1	<i>Aspergillus sydowii</i> Pendiente secuenciación
	<i>Nidulantes</i> (N=6)	2 4	<i>Aspergillus nidulans</i> Pendiente secuenciación
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> (N=2)	2	Pendiente secuenciación

### Susceptibilidad a antifúngicos.

Se presenta por secciones de *Aspergillus* para cada antifúngico analizado. De manera orientativa se expresan los VCE existentes para algunas especies. En la Figura 3 se muestran

las CMI para Itraconazol. El VCE para *A. fumigatus* es 1.0 µg/mL, de *A. niger* es de 4.0 µg/mL, *A. flavus* es de 1 µg/mL y *A. terreus* de 2 µg/mL. Lo observado de la sección *Fumigati*, fue que 15/70(21.4%) con CMI 0.5 µg/mL, 49/70 (70%) de los aislados con CMI de 1.0 µg/mL, 1/70(1.4%) con CMI 2.0 µg/mL y 2/70 (3%) CMI de 8 µg/mL (los cuales ambos corresponde a *A. lentulus*). De la sección *Nigri* 5/25 (20%) con CMI ≤0.5 µg/mL, 10/25(40%) con CMI 1.0 µg/mL, 9/25(36%) con CMI 2.0 µg/mL y 1/25(4%) con CMI 4.0 µg/mL. De la sección *Flavi*, 19/21(90.6%) con CMI ≤ 0.5 µg/mL, 1/21(4.7%) con CMI 1.0 µg/mL y 1/21(4.7%) con CMI 4.0. Con respecto a la sección *Nidulantes*, dos aislados con una CMI de 16 µg/mL correspondieron a *A. unguis*.

**Figura 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de Itraconazol para especies de *Aspergillus*.**



En la Figura 4 se muestran las CMI para Voriconazol. El PCC de *A. fumigatus sensu stricto* para voriconazol es 1.0 µg/mL, se considera sensible 0.5 µg/mL y resistente 2.0 µg/mL. Mientras que el VCE de *A. niger* y *A. flavus* es de 2.0 µg/mL.

Observamos que, de los aislados de la sección *Fumigati*, 3(4.3%) con CMI ≤0.25 µg/mL, 32 (45.7%) CMI de 0.5 µg/mL, 29 (41%) de 1.0 µg/mL y 4 (5.7%) una de 2.0 µg/mL y 2 con una CMI de 8 µg/mL, los cuales corresponden a *Aspergillus lentulus*. Los 4 aislados con CMI de 2.0 µg/mL corresponde a *A.fumigatus sensu stricto*. En cuanto a la sección *Nigri*, hay 4 aislados que tienen una CMI igual o mayor al punto de corte epidemiológico, y 3 corresponden a *A. tubingensis* 1 a *A. costaricensis*, ambas especies crípticas de *A.niger*.

La Figura 5 muestra los CMI de Posaconazol. CLSI no cuenta con VCE ni PCC para posaconazol en *A. fumigatus*. El VCE de posaconazol para *A. niger* es de 2 µg/mL y para *A. flavus* de 0.5 µg/mL. Se muestra que de los aislados de la sección *Fumigati* 4/70 (5.7%) con CMI de 0.125 µg/mL, 15/70(21.4%) con CMI 0.25 µg/mL, 48/70(68.5%) con CMI 0.5 µg/mL 2/70(3%) con CMI 1.0 µg/mL y 1/70 (1.4%) con CMI 2.0 µg/mL. De la Sección *Nigri* 1/25(4%) con CMI 0.125 µg/mL, 4/25 (16%) con CMI 0.25 µg/mL, 18/24(72%) con CMI 0.5 µg/mL y 2/24(8%) con CMI 2.0 µg/mL.

**Figura 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de voriconazol para especies de *Aspergillus*.**

## VORICONAZOL

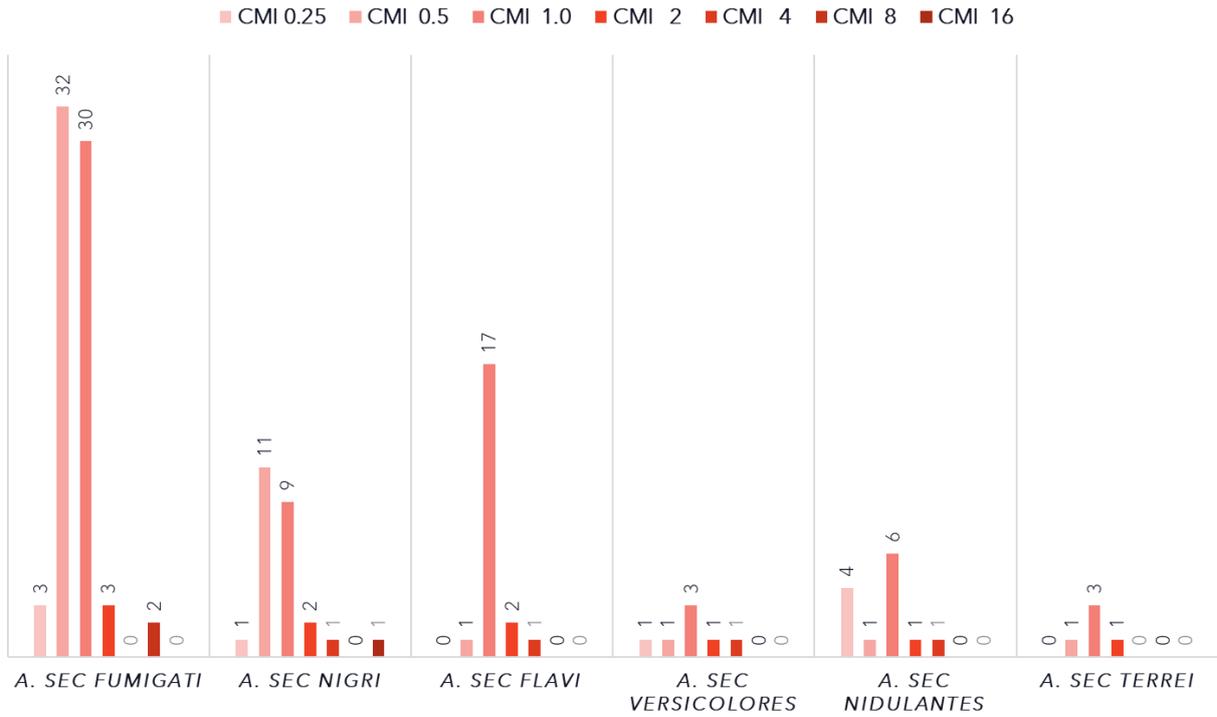
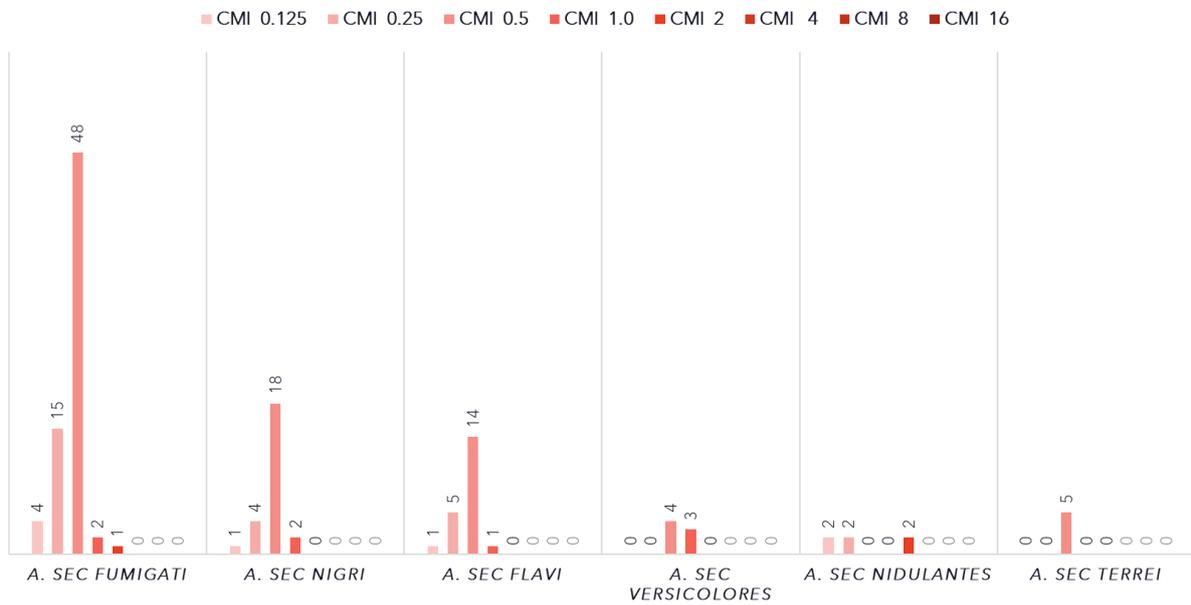


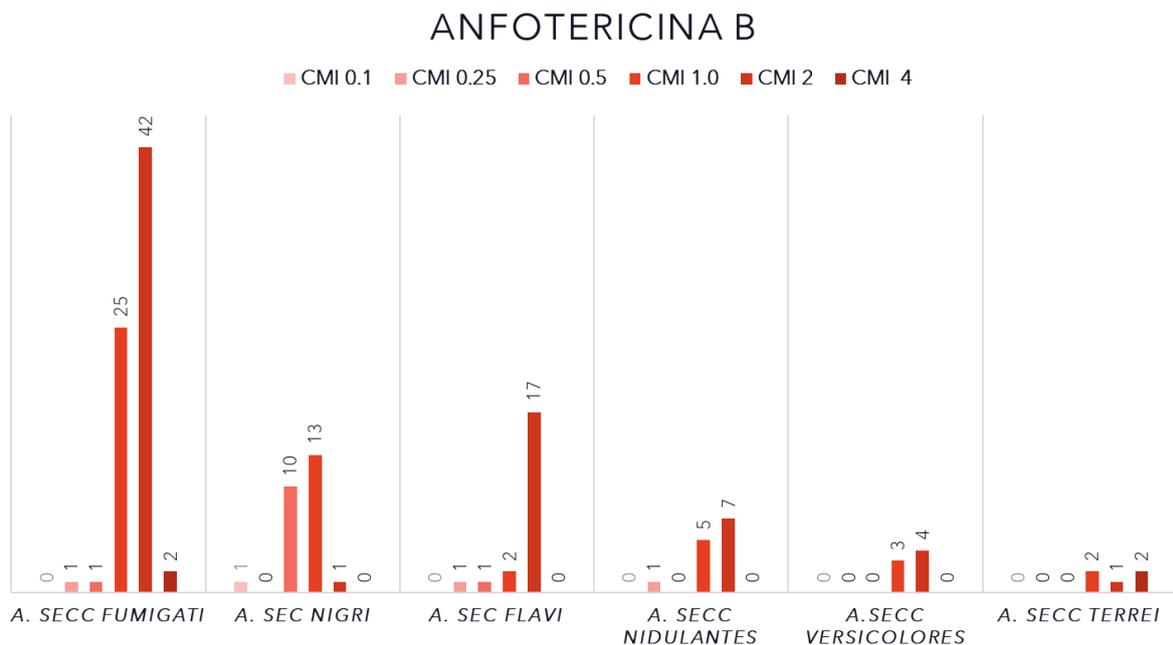
Figura 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de Posaconazol para especies de *Aspergillus*.

## POSACONAZOL



En la Figura 6 se muestran los CMI para Anfotericina B. El VCE de *A. fumigatus* para Anfotericina B es de 2.0 µg/mL, *A. flavus* 4.0 µg/mL, *A. niger* 0.5 µg/mL, *A. terreus* 4 µg/mL y *A. versicolor* 2.0 µg/mL. De la sección *Fumigati*, 25/70(36%) con CMI 1.0 µg/mL, 42/70(60%) con CMI 2.0 µg/mL y 2/70(2.8%) con CMI 4.0 µg/mL. De la sección *Nigri*, 1/25(4%) con CMI 0.1 µg/mL, 10/25(40%) con CMI 0.25 µg/mL, 13/25(52%) con CMI 1.0 µg/mL y 1/25(4%) con CMI 2.0 µg/mL. De la sección *Terrei*, 2/5(40%) con CMI 1.0 µg/mL, 1/5(20%) con CMI 2.0 µg/mL y 2/5(40%) con CMI 4.0 µg/mL

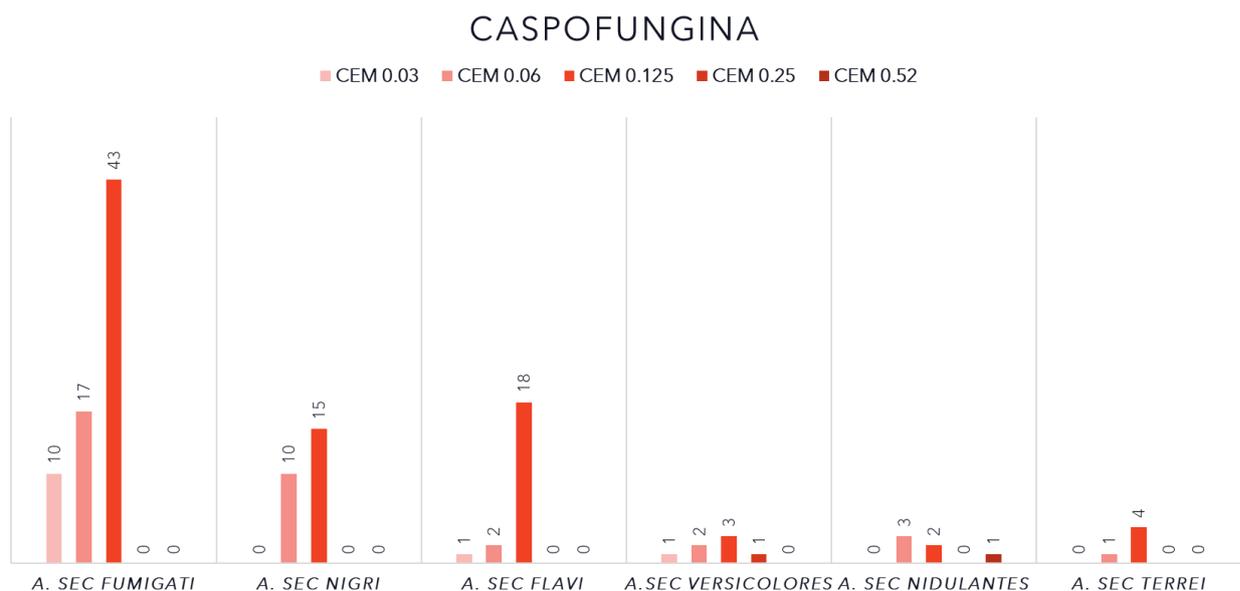
**Figura 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para Anfotericina B de especies de *Aspergillus*.**



La Figura 7 muestra los CME para Caspofungina. El VCE para caspofungina en *A. fumigatus* es 0.5 µg/mL, *A. flavus* 0.5 µg/mL, *A. niger* 0.25 µg/mL y *A. terreus* 0.12 µg/mL. Nuestros hallazgos relevantes para la sección *Fumigati* fueron 43/70(61%) con

CME de 0.125 µg/mL y 27/70(49%) con CEM ≤ 0.06 µg/mL. De la sección *Nigri* 15/25(60%) con CME 0.125 µg/mL y 10/25 (40%) con CEM 0.06 µg/mL. De la sección *Terrei*, 4/5(80%) con CME 0.125 µg/mL.

**Figura 7. Concentración efectiva mínima (CME) de Caspofungina paraespecies de *Aspergillus*.**

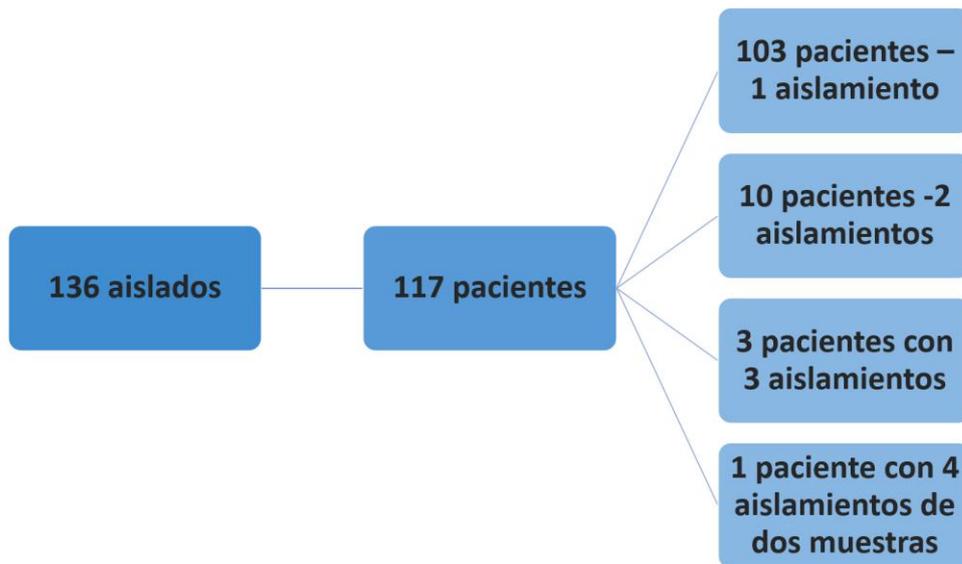


De la sección *Fumigati*, en el caso de *Aspergillus fumigatus* específicamente, 5/66 (7.5%) de los aislados presentaron resistencia a azolescuatrocon resistencia a una clase de azol y uno con resistencia a dos clases de azoles, ninguno mostró resistencia a tres azoles. A estos cinco aislados se les realizó la amplificación y secuenciación del gen *cyp51A* en búsqueda de las mutaciones o repeticiones en tándem (RT) reportadas asociadas a resistencia, sin embargo, en ninguno de los aislados se encontró la mutación. Dentro de la misma sección, 2/70(3%) aislados correspondieron a *Aspergillus lentulus* y 2/70 (3%) *Aspergillus hiratsukae*, ambas especies crípticas.

*A. lentulus* presentó una CMI de 8 µg/mL tanto a Itraconazol como a Voriconazol y los dos *A. hiratsukae* presentaron una CMI para azoles debajo de los VCE descritos para *A. fumigatus*. Respecto a los aislados de la sección *Nigri*, haremos énfasis debido a la importancia por la identificación de especies crípticas. Únicamente 4/25 (16%) fueron identificados como *A. niger* sensu stricto, ninguno con una CMI mayor o igual al VCE para ningún antifúngico. La especie críptica más frecuente fue *A. tubingensis* en 5/25 (20%) de las cuales, un aislado con CMI de 4.0 µg/mL itraconazol (igual al VCE), dos aislados con una CMI de 2.0 µg/mL a Voriconazol (igual al VCE), y un aislado con una CMI de 16 µg/mL a voriconazol (por arriba del VCE). Una especie identificada como *A. costaricensis* presentó una CMI de 4 µg/mL a voriconazol y un aislado aún está pendiente de identificación molecular, que mostró una CMI de 2.0 µg/mL a Anfotericina B. El resto con CMI/CME debajo de los VCE descritos para *A. niger*.

**Correlación clínica.** De los pacientes de los cuales provenían las muestras clínicas, la Figura 9 muestra el flujograma de su identificación. Sin información clínica en 9 pacientes, por lo que, en total se analizaron 108 pacientes, de los cuales 70 (65%) cumplió el criterio de infección fúngica invasiva (IFI), es decir aspergilosis invasiva, mientras que en los 38 (35%) pacientes que no cumplieron con criterio de infección fúngica, el aislamiento de *Aspergillus* se consideró colonización.

**Figura 9. Distribución de pacientes y muestras clínicas.**



La Tabla 2, muestra las características generales de los pacientes con aislamiento de *Aspergillus* con las diferencias generales entre quienes cumplieron criterio de infección fúngica invasiva tipo aspergilosis invasiva y quienes no.

En la Tabla 3 se muestran las características clínicas y desenlace de los pacientes con aspergilosis invasiva y se especifican en tres grupos, según con los criterios que fueron clasificados, criterios de EORTC/MSGERC, criterios del algoritmo de AspICU modificado y los que tenían coinfección de COVID-19 y fueron clasificados con los criterios de ECMM/ISHAM para la aspergilosis asociada a COVID-19 (CAPA por sus siglas en inglés).

**Tabla 2. Características generales de pacientes con aislados de *Aspergillus* spp.**

Características	General N= 108 (%)	IFI N= 70(%)	Sin IFI N=38 (%)	p=
Hombres	68(63)	42(62)	26(38)	0.38
Edad, media(DS)	51.6(16)	51.1(17.5)	52.6(13)	0.63
<b>Comorbilidad</b>				
Obesidad	27(25)	14(20)	13(34)	0.10
Neoplasia hematológica	18(17)	17(24)	1(3)	0.004
Enfermedad reumatológica	10 (9)	7(10)	3(8)	1.0
Hepatopatía	5(5)	5(100)	0	0.15
<b>COVID-19</b>	41(38)	2(31)	19(50)	0.06
<b>Neutropenia grave</b> (NT < 500 cel/ $\mu$ L)				
	8(7)	7(10)	1(3)	0.25
<b>Linfopenia</b> (Linfocitos <1000 cel/ $\mu$ L)				
	68(63)	41(67)	21(55)	0.22
<b>Coinfección</b>	82(76)	57(81)	25(66)	0.08
<b>Desenlace</b> Muerte a 6 semanas	44(41)	36(51)	8(21)	0.002

Se realizó la comparación del desenlace mortalidad entre los que tuvieron un aislamiento de *A.fumigatus* con resistencia a azoles, se observó una mortalidad de 40 vs 47% de los que tuvieron *A. fumigatus* no resistente a azoles (p=0.76). En la Tabla 4, se muestran los pacientes con aspergilosis y un aislamiento de *Aspergillus fumigatus* con resistencia a los azoles.

**Tabla 3. Características de los pacientes con aspergilosis invasiva.**

Características	General N= 70(%)	AI con EORTC/MSG N=33(%)	AI con AspICU N= 14(%)	CAPA N=23(%)	Valor p
Hombres	42(60)	20(61)	9(60)	13(59)	0.74
Edad, media(DS)	51(17.5)	45.7(18.3)	56(15.9)	55.7(15.4)	0.65
<b>Comorbilidades</b>					
Obesidad	14(20)	1(3)	3(20)	10(45.5)	0.001
Neoplasia hematológica	17(24)	15(45.5)	2(13)	0	<0.0001
Enfermedad reumatológica	7(10)	5(15)	1(7)	1(4.5)	0.5
Inmunosupresión farmacológica	21(30)	19(58)	1(7)	1(4.5)	<0.0001
Hepatopatía	5(7)	1(3)	4(27)	0	0.009
<b>Linfopenia</b>	47(67)	23(70)	10(67)	14(64)	0.89
<b>Neutropenia</b>	13(19)	12(36)	1(7)	0	0.001
<b>Neutropenia grave</b>	7(10)	6(18)	1(7)	0	0.08
<b>Sitio de Enfermedad</b>					
Pulmonar	64(91)	27(82)	14(100)	23(100)	0.02
Sinusal	12(36)	12(41)	0	0	0.36
<b>Antígeno de Galactomanano (GM)</b>					
GM en suero positivo	10/30(33)	4/13(31)	4/8(50)	2/9(22)	0.46
GM en LBA positivo	7/19(37)	5/15(33)	2/4(50)	0	0.60
<b>Recibió tratamiento antifúngico</b>	56(80)	24(43)	12(86)	20(87)	0.35
<b>Antifúngico recibido</b>					0.20
Voriconazol	45/56(80)	19/24(79)	10/12(83)	16/20(80)	-
Anidulafungina	5/56(9)	0	1/12(8.5)	4/20(20)	-
Otro azol	4/56(7)	3/24(12.5)	1/12(8.5)	0	-
Anfotericina B	2/56(4)	2/24(8.5)	0	0	-
<b>Motivo de no tratamiento</b>					0.29
Aislamiento posterior a fallecimiento	5/14(36)	3/9	1/2 (50)	1/3(33)	-
Aislamiento posterior al alta	3/14(21)	2/9	0	0	-
Considerado colonización	2/14(14)	2/9	0	0	-
Traslado	1/14(7)	0	1/2 (50)	0	-
No especificada	3/14(22)	2/9	0	2/3(67)	-
<b>Desenlace</b>					
Muerte a 6 semanas	36(51)	12(36)	10(71)	14(61)	0.04

Además respecto a la correlación clínica, 2 pacientes tuvieron AI con aislados de *A.fumigatus* con CMI >2 µg/mL para Anfotericina B (mayor al VCE) lo que sugiere resistencia. Ninguna de esos dos pacientes recibió anfotericina como tratamiento. Ningún paciente con AI con aislamiento que sugiera resistencia a Caspofungina. Respecto a las otras secciones y casos con aislamientos con posible resistencia según los valores de la MIC y sus VCE, no existen VCE para *A.nidulans* ni *Aspergillus* de la sección *Aspergillus*. Sin embargo, se registraron dos casos de AI con aislados de *A. unguis* (sección Nidulantes) con CMI >16 µg/mL a Itraconazol, ninguno recibió

Itraconazol como tratamiento. Dos pacientes con AI con aislamientos de *A.sección nigri* con CMI  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  a Voriconazol (2  $\mu\text{g/mL}$  VCE para Voriconazol), ambos casos descritos más adelante en casos por especies crípticas. Un caso de AI con aislamiento de *A.sclerotium* (de la sección *terrei*) con CMI 4  $\mu\text{g/mL}$  Anfotericina B, no recibió tratamiento. Un caso de AI con aislamiento de *A.sydowii* (de la sección *Versicolores*) con CMI 2  $\mu\text{g/mL}$  VCE para Anfotericina B ( 2  $\mu\text{g/mL}$  VCE para Anfotericina B en *A.versicolores*).

**Aspergilosis Invasiva por especies crípticas.** No se encontró ningún caso por especies crípticas de *A.fumigatus*. Diez casos de AI fueron por una especie críptica de otra sección, el 50% (5/10) por especies crípticas de *A.niger* ( 3 *A.tubingensis*, 1 *A.neoniger* y 1 *A.costaricaensis*), 27%(3/11) especies crípticas de *A.flavus* (3 *A.tamari*) y el 18%(2/11) especies crípticas de *A.versicolor* (2 *A.sydowii*). Se muestran las características de estos pacientes en las Tabla 5 y 6.

**Tabla 4. Características de los pacientes con aspergilosis invasiva y aislamiento de *Aspergillus fumigatus* con resistencia a azoles.**

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
Edad /Sexo	67 años / Hombre	73 años / Hombre	34 años /Mujer	18 años/ Mujer	39 años/Mujer
Ocupación Origen	Desempleado CdMx	Pensionado Zumpango, Edo.Méx	Ama de casa Veracruz	Estudiante CdMx	Ama de casa Morelia
Comorbilidad	Sx mielodisplásico Neutropenia	VIH	Ninguna	Lupus	Miastenia Bronquiectasias
Motivo de ingreso	Diverticulitis	Neumonía	Neumonía por Influenza H1N1	Tb diseminada	MAC y NIH
Estancia en días al diagnóstico	28 días	7 días	13 días	6 meses	18 días
Antifúngico previo	No	No	No	Si, Fluconazol	Si, Voriconazol
IFI Criterio	Sí EORTC probable	Si EORTC probada	Sí AspICU	Si EORTC probable	Sí AspICU
Antígeno GMN	Positivo en suero (8.5 DO)	Negativo en suero (0.16 DO)	Positivo en suero (0.8 DO)	Negativo en suero y LBA	Negativo en suero
MICs > VCE	Voriconazol	Voriconazol & Posaconazol	Voriconazol	Itraconazol	Posaconazol
Recibió tratamiento	No Aislamiento posterior a muerte	No Aislamiento posterior a muerte	Voriconazol 42 días	Voriconazol 42 días	Voriconazol 42 días
Desenlace	Muerte	Muerte	Vivo	Muerte por otra causa	Muerte por otra causa

**Tabla 5. Características de los pacientes con aspergilosis invasiva por especies crípticas de *Aspergillus niger*.**

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
Edad /Sexo	44 años/Hombre	46 años/Hombre	38 años/Hombre	29 años/Mujer	78 años/Hombre
Comorbilidad	Desnutrición crónica	Obesidad	Dermatomiositis	Leucemia linfoblástica aguda	Obesidad
Especie aislada	<i>A.neoniger</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.tubingensis</i>	<i>A.costaricaensis</i>
Motivo de ingreso	Neumonía	Neumonía por Influenza H1N1	Neumonía Influenza	Neumonía por <i>S.pneumoniae</i>	COVID-19
IFI Criterio	AspICU modificado	AspICU modificado	AspICU modificado	Criterio EORTC/MSG	CAPA
Antígeno GMN	No realizado	Negativo suero	Negativo suero y LBA	No realizado suero Negativo en LBA	Negativo suero
CMI ≥VCE	No	Voriconazol CMI 4	No	No	Voriconazol CMI 4
Antifúngico /tiempo	Itraconazol 42 días	Voriconazol 11 días	Voriconazol 1 día	Voriconazol 48 días	Voriconazol 16 días
Desenlace	Vivo	Muerte	Muerte	Vivo	Muerte

**Tabla 5. Características de los pacientes con aspergilosis invasiva por especies crípticas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus versicolor*.**

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
Edad /Sexo	51/Hombre	68/Hombre	34/Hombre	33/Hombre	61/ Mujer
Comorbilidad	Obesidad	Sobrepeso	Ninguno	Obesidad	Ninguno
Especie aislada	<i>A.tamari</i> (Especie críptica Sección <i>flavi</i> )	<i>A.tamari</i> (Especie críptica Sección <i>flavi</i> )	<i>A.tamari</i> (Especie críptica Sección <i>flavi</i> )	<i>A. sydowii</i> (Especie críptica Sección <i>versicolores</i> )	<i>A. sydowii</i> (Especie críptica Sección <i>versicolores</i> )
Motivo de ingreso	COVID-19	Ambulatorio	COVID-19	COVID-19	COVID-19
Criterio IFI	ECMM/ISHAM para CAPA	EORTC/MSG AI probada	ECMM/ISHAM para CAPA	ECMM/ISHAM para CAPA	ECMM/ISHAM para CAPA
Antígeno GMN	Negativo en suero No realizado en LBA	No realizado	Positivo en suero(DO 1.7) No realizado en LBA	No realizado	No realizado
CMI $\geq$ VCE	< al VCE ITR, VOR, POS, AMB y CAS	< al VCE ITR, VOR, POS, AMB y CAS	< al VCE ITR, VOR, POS, AMB y CAS	< al VCE ITR, VOR, POS, AMB y CAS	< al VCE ITR, VOR, POS, CAS CMI 2 AMB (=VCE)
Antifúngico /tiempo	Voriconazol /4 días	Itraconazol/42 días	Voriconazol/27 días	Voriconazol/42 días	Anidulafungina/20 días
Desenlace	Muerte	Vivo	Vivo	Muerte	Muerte

## Discusión

Respecto al objetivo principal de este estudio, la prevalencia encontrada de resistencia a azoles en *A. fumigatus* fue de 7.5%, similar al estudio piloto donde se identificó, únicamente con tamizaje y no con microdilución, una prevalencia similar, pero con presencia de la mutación en el gen *cyp51A*.<sup>31</sup> Las diferencias encontradas, en las proporciones de aislados con resistencia, entre los diferentes estudios pueden deberse principalmente a la variabilidad geográfica y al uso de pesticidas y antifúngicos ambientales en ciertas regiones, lo cual permite la generación de las mutaciones conocidas de adquisición ambiental y resistencia. Lo que enfoca la necesidad de realizar una vigilancia epidemiológica o tamizaje de la susceptibilidad tal como lo realizado en éste trabajo.<sup>48</sup> Actualmente, se han descrito, en mayor frecuencia, casos de aspergilosis invasiva con aislados de *A. fumigatus* con resistencia a azoles asociada a mutaciones ambientales, principalmente TR34/L98H

en el gen *cyp51A*, mutación asociada a la resistencia a itraconazol y susceptibilidad intermedia o resistencia a voriconazol , posaconazol o ambos.<sup>49</sup>

En nuestro estudio la especie aislada con mayor frecuencia fue *Aspergillus fumigatus*. La frecuencia de dicha especie en aislados clínicos se ha observado en grandes estudios observacionales y multicéntricos.<sup>41,42</sup> Un estudio suizo reportó que hasta el 88% de sus especies correspondía al complejo de *A. fumigatus*, pero a pesar de existir variabilidad regional se reproduce dicho hallazgo, como lo descrito por Sung-Yeon Cho y cols. donde el 45.9% de sus aislados clínicos corresponden a *A. fumigatus*.<sup>16</sup> A nivel nacional, lo reportado por Treviño-Rangel y cols. es similar aunque el porcentaje de *A. fumigatus* fue de 33% de sus cepas aisladas.<sup>32</sup>

Un hallazgo relevante es la frecuencia en la identificación de especies crípticas. La identificación a nivel de especie no puede realizarse mediante los métodos tradicionales como lo es la morfología macros y mircoscópca, incluso ni por los métodos automatizados como MALDI-TOF debido a que, las bibliotecas comerciales aún tienen la limitante de contar con pocos espectros representantes de estas especies. Esta limitante puede ser superada con el uso de la biblioteca en línea y de libre acceso, MSI2, la cual cuenta con una gran cantidad de espectros representando a las especies cripticas más comúnmente encontradas en la práctica clínica, sin embargo, se requieren de más análisis de desempeño para poder asegurarlo. (<https://msi.happy-dev.fr/>) .<sup>43,44</sup>

Por lo tanto, es importante destacar la identificación hasta nivel de especie, debido a la existencia de las especies crípticas, como se ha mencionado. En el estudio FILPOP de España describió 15% de especies crípticas entre 323 aislamientos analizados; la

importancia de su reporte además de la epidemiología radica en el posible impacto en el desenlace clínico al saber que se trata de una de estas especies, indistinguibles por morfología y que presentan susceptibilidades a los antifúngicos diversas, tal como se observó en nuestro estudio en las especies de la sección *Fumigati* entre *A. fumigatus*, *A. lentulus* y *A. hiratsukae* y la sección *Nigri*, con la diferencia en *A. tubingensis*.<sup>42</sup> La principal diferencia entre *A. niger* y *A. tubingensis* radica en la mayor resistencia a los azoles (CMI elevadas) de esta última especie. De hecho recientemente Chi-Ching Tsang y cols.<sup>45</sup> reportaron que el perfil de susceptibilidad en especies crípticas encontradas de aislados clínicos, suelen diferir de los patrones de susceptibilidad de especies tradicionales y similar fue lo reportado por Sanaz Nargesi y cols. en donde una significativa proporción de especies crípticas presentaron CMIs para los antifúngicos por arriba del VCE reportado.<sup>46</sup> Nosotros de la sección *Nigri* encontramos que 81% de las especies son una especie críptica, lo que nos refuerza el concepto y la importancia de la identificación de dichas especie, una posible opción en la mejora de la identificación será la actualización de las bibliotecas de MALDITOF con los espectros de las especies, tal como se realizó en lo reportado por Vidal-Acuña y cols., donde fue posible la identificación de especies crípticas alimentando la base de datos de MALDITOF.<sup>47</sup>

En lo que a la identificación a nivel de sección respecta MALDITOF aparente no tener discrepancia o una baja concordancia, sin embargo, se pudo observar que la concordancia es moderada para identificar hasta nivel de especie. La importancia radica justamente en la identificación de especies crípticas cuyos perfiles de susceptibilidad pueden ser o son distintos.

Es importante resaltar que en los aislados encontrados en nuestro estudio, se realizó secuenciación del gen *cyp51A* y no se encontró ninguna de las mutaciones ambientales descritas, lo que puede significar que el mecanismo involucrado de resistencia sea distinto, se han descrito otros mecanismos no asociados a mutaciones del gen *cyp51A*, uno de estos está relacionado con mutación del gen *hmg1* y *erg6* involucrados en la síntesis del ergosterol.<sup>50</sup> Otras como la presencia de bombas de eflujo, principalmente asociada a sobreexpresión de dos cassettes de unión a transportadores de ATP (*AfuMDR1* y *AfuMDR2*), aunque también se han reportado otras alteraciones en transportadores. Además, se ha intentado dilucidar otros mecanismos posiblemente asociados, incluso con la secuenciación completa del genoma de *A. fumigatus* resistente, en un estudio se encontró una mutación en el gen *HapE* posiblemente asociada a la resistencia a azoles, finalmente otro mecanismo de resistencia a los azoles presente en *A. fumigatus* después de la exposición a triazoles, es la incorporación de colesterol exógeno en las membranas plasmáticas compensando ergosterol empobrecido y teniendo posiblemente un impacto en las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (*SREBP*) utilizados en el proceso de transcripción y que funcionan como reguladores del colesterol y el metabolismo de los lípidos.<sup>50</sup>

Será necesaria la búsqueda de otros mecanismos de resistencia posiblemente involucrados en nuestros aislados, por lo que no se descarta a futuro como posibilidad, el realizar otros estudios moleculares o incluso análisis de vías de señalización involucradas en el sitio de unión del antifúngico.<sup>51</sup>

A la fecha ha sido más común el interés por estudiar la susceptibilidad a los antifúngicos, por lo que existen diversos estudios que reportan la proporción de cepas

no *wild-type* con una variabilidad importante. En 2019, un estudio español reportó que 3% de sus aislados de *A. fumigatus* eran no *wild-type* para azoles y el 1.2% para anfotericina B. De manera relevante en el estudio FILPOP, uno de los más grandes estudios en España, no reportó cepas de *A. fumigatus* con CMIs por arriba del VCE sin embargo, reportó que las especies crípticas era las que presentaban resistencia in vitro a los antifúngicos.<sup>42</sup>

La susceptibilidad a otros antifúngicos específicamente en *A. fumigatus* torna relevancia debido a los hallazgos de CMIs por arriba del punto de corte epidemiológico en una proporción considerable, lo que amerita mayores estudios, principalmente con anfotericina B. Recientemente en Canadá, reportaron que más del 96% de cepas de *A. fumigatus* presentaron  $CMI > 2$  mg/L para anfotericina B, sin realizar una correlación con el desenlace clínico, ya que conocemos que actualmente dicho antifúngico no es el tratamiento de primera línea pero si suele utilizarse como tratamiento de rescate o tratamiento secundario; además, en este estudio investigaron la actividad de la catalasa como un posible mecanismo, o como correlación con resistencia a azoles, sin embargo, será necesario realizar más estudios respecto a los mecanismos involucrados. En nuestro estudio 66% de los aislados de *A. fumigatus* mostraron  $CMI \geq 2$  mg/L, que es el valor de corte epidemiológico, se deberá indagar sobre si dichos aislamientos son cepas wild type o no.<sup>52</sup>

Respecto al desenlace clínico, existen algunas revisiones en dónde se ha correlacionado un desenlace fatal en casos de pacientes con aspergilosis y resistencia a azoles, sin embargo, se requiere mayor tamaño de muestra en los estudios, lo que complica el poder realizarlos. Un estudio del impacto clínico en Holanda, evidenció

que de 8 pacientes con aspergilosis con aislados de *A. fumigatus* con mutación TR34/L98H y CMI's elevados a voriconazol, fallecieron el 87.5% (7/8) de ellos.<sup>39</sup> Otro estudio en Corea, analizó y comparó el desenlace de pacientes con aislado susceptible vs aislado resistente, encontrando que las tasas de mortalidad relacionadas con aspergilosis invasiva fueron del 33,3 % vs 50 % en los grupos sensibles a los azoles y resistentes a los azoles ( $p = 0,573$ ), respectivamente, mientras que la mortalidad general a los 100 días fue del 41,7 % vs 100 % ( $p = 0,193$ ).<sup>53</sup> Las guías de IDSA de tratamiento de aspergilosis, mencionan que no es necesario realizar de rutina pruebas de susceptibilidad a antifúngicos, en contraste las guías europeas mencionan que se deben realizar en estudios epidemiológicos, en sitios con alta prevalencia de aislados resistentes o en los casos con sospecha de falla al tratamiento antifúngico, por lo que podríamos hacer un balance entre ambas sugerencias e individualizar los casos según la epidemiología local, además de que las guías Europeas mencionan que casos en donde se documente resistencia a azoles (aislados con CMI a voriconazol igual a 2 mg/mL) se sugiere combinación de Voriconazol + equinocandina o Anfotericina B como monoterapia y casos donde la CMI sea mayor se sugiere monoterapia con Anfotericina B liposomal o complejo lipídico o combinación de Voriconazol y equinocandina o Posaconazol y equinocandina.<sup>54</sup>

Una pregunta interesante sería saber si ¿De haber tenido el diagnóstico de resistencia más rápido hubiera cambiado el desenlace de los pacientes? Dicho cuestionamiento tiene relación en saber qué tan importante y qué relevancia tiene la susceptibilidad con el desenlace clínico, lo cual hemos comentado previamente. Hoy día existen métodos de identificación que técnicamente pueden ser más rápidos como son la PCR

*Aspergillus* estandarizada (AsperGenius®) la cual tiene además la capacidad de identificar la presencia de las mutaciones conocidas en el gen *cyp51A* asociadas a resistencia a azoles. La limitación se centra en lo que identifica la PCR, que es la mutación del gen *cyp51A* y no propiamente la correlación con la CMI a los antifúngicos.<sup>55</sup>

Además, debemos considerar qué a todos los que tuvieron resistencia en *A. fumigatus* se les dio voriconazol como tratamiento sin aparente diferencia en los desenlaces. De haber tenido conocimiento temprano de la presencia de CMI elevada al antifúngico, las opciones terapéuticas disponibles hubiesen sido un cambio en el tipo de azol hacia uno al que no se presentara CMI elevada como Isavuconazol o Posaconazol o en ciertos casos en donde no existe respuesta clínica, agregar una equinocandina pues observamos que no aparenta haber resistencia a este antifúngico en los aislados de *A. fumigatus*. Las recomendaciones actuales se centran en cambiar el tipo de azol o agregar al azol una equinocandina, o bien el uso de Anfotericina B liposomal, como se ha mencionado.<sup>56</sup>

## **Conclusiones**

La prevalencia de resistencia a azoles en aislados de *A. fumigatus* fue de 7.5% en nuestra población, ligeramente mayor a la descrita global, no se encontraron mutaciones ambientales asociadas. Los mecanismos de resistencia asociados deberán de ser estudiados. No se evidenció mayor mortalidad en comparación con pacientes con Aspergilosis sin aislados resistentes. Se evidenció posible resistencia en más de 60% a Anfotericina B en aislados de *A. fumigatus*. Finalmente es importante la identificación a nivel de especie debido a las diferencias observadas en los patrones de susceptibilidad en las especies crípticas.

## Referencias bibliográficas

1. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: A clinical review. *Eur Respir Rev.* 2011;20(121):156-174. doi:10.1183/09059180.00001011
2. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(1):125-142. doi:10.1016/j.idc.2015.10.015
3. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Postgrad Med J.* 2015;91(1077):403-410. doi:10.1136/postgradmedj-2014-206291rep
4. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* Published online 2014:141-173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004
5. Corzo-León DE, Armstrong-James D, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses.* 2015;58:34-44. doi:10.1111/myc.12395
6. Thompson GR, Young J-AH. *Aspergillus* Infections. *N Engl J Med.* 2021;385(16):1496-1509. doi:10.1056/nejmra2027424
7. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, 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. doi:10.1093/cid/ciw326
8. Mercier T, Castagnola E, Marr KA, Wheat LJ, Verweij PE, Maertens JA. Defining Galactomannan Positivity in the Updated EORTC/MSGERC Consensus Definitions of Invasive Fungal Diseases. *Clin Infect Dis.* 2021;72:S89-S94. doi:10.1093/cid/ciaa1786
9. J. Peter Donnelly,<sup>1</sup> Sharon C. Chen,<sup>2</sup> Carol A. Kauffman,<sup>3</sup> William J. Steinbach,<sup>4</sup> John W. Baddley,<sup>5</sup> Paul E. Verweij,<sup>6</sup> Cornelius J. Clancy,<sup>7</sup> John R. Wingard,<sup>8</sup> Shawn

- R. Lockhart,<sup>9</sup> Andreas H. Groll,<sup>10</sup> Tania C. Sorrell,<sup>11</sup> Matteo Bassetti,<sup>12</sup> Hamdi Akan,<sup>13</sup> Barbar 61 and Peter G. Pappas<sup>5</sup>. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1367-1376.
10. Schauwvlieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N, et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2018;6(10):782-792. doi:10.1016/S2213-2600(18)30274-1
  11. RAOUL HERBRECHT, M.D., DAVID W. DENNING, F.R.C.P., THOMAS F. PATTERSON, M.D., JOHN E. BENNETT MD, REGINALD E. GREENE, M.D., JÖRG-W. OESTMANN, M.D., WINFRIED V. KERN, M.D., KIEREN A. MARR MD, PATRICIA RIBAUD, M.D., OLIVIER LORTHOLARY, M.D., PH.D., RICHARD SYLVESTER, SC.D., ROBERT H. RUBIN MD, et al. VORICONAZOLE VERSUS AMPHOTERICIN B FOR PRIMARY THERAPY OF INVASIVE ASPERGILLOSIS. *N Engl J Med*. 2007;347(6):408-415. doi:10.1056/NEJMoa020191
  12. Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-De-León LA. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*. 2012;6(1):23-34. doi:10.1007/s12281-011-0081-7
  13. Maertens JA, Raad II, Marr KA, 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. *Lancet*. 2016;387(10020):760-769. doi:10.1016/S0140-6736(15)01159-9
  14. Bitar D, Lortholary O, Strat Y Le, et al. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections - Volume 20, Number 7—July 2014 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. 2014;20(7):1149-1155.

[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/7/12-1004\\_article](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/7/12-1004_article)

15. Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, et al. Factors Associated with Mortality in Transplant Patients with Invasive Aspergillosis. *PLoS One*. 2017;32(7):736-740. doi:10.1371/journal.pone.0178059
16. Sun KS, Tsai CF, Chen SCC, Huang WC. Clinical outcome and prognostic factors associated with invasive pulmonary aspergillosis: An 11-year follow-up report from Taiwan. *PLoS One*. 2017;12(10):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0186422
17. David W Denning†1 2 & David S Perlin. Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. *Future Microbiol*. 2011;6(11):1229-1232.
18. Steinmann J, Hamprecht A, Vehreschild MJGT, et al. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2014;70(5):1522-1526. doi:10.1093/jac/dku566
19. Paul E. Verweij, M.D, Emilia Mellado P. Multiple-Triazole-Resistant Aspergillosis To. *N Engl J Med*. 2007;356(14):1481-1481. doi:10.1056/nejmc076105
20. Snelders E, Van Der Lee HAL, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*. 2008;5(11):1629-1637. doi:10.1371/journal.pmed.0050219
21. Patrice Le Pape, Rose-Anne Lavergne, Florent Morio CA-M. Multiple Fungicide-Driven Alterations in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Colombia, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(1):156.
22. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJG, Meis JF. Azole resistance in *aspergillus fumigatus*: Can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis*. 2016;62(3):362-368. doi:10.1093/cid/civ885

23. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-resistant aspergillosis: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis.* 2017;216(Suppl 3):S436-S444. doi:10.1093/infdis/jix210
24. Bueid A, Howard SJ, Moore CB, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2116-2118. doi:10.1093/jac/dkq279
25. van der Linden JWM, Arendrup MC, Warris A, et al. Prospective Multicenter Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(6):1041-1044.
26. Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, Pfaller MA, Diekema DJ, Balajee SA. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4465-4468. doi:10.1128/AAC.00185-11
27. Pham CD, Reiss E, Hagen F, Meis JF, Lockhart SR. Passive surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011-2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(9):1498-1503. doi:10.3201/eid2009.140142
28. Wiederhold NP, Gil VG, Gutierrez F, et al. First detection of TR34 L98H and TR46 Y121F T289A Cyp51 mutations in *aspergillus fumigatus* isolates in the United States. *J Clin Microbiol.* 2016;54(1):168-171. doi:10.1128/JCM.02478-15
29. Macedo D, Leonardelli F, Gamarra S, Garcia-Effron G. Emergence of Triazole Resistance in *Aspergillus* spp. in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep.* 2021;15(3):93-103. doi:10.1007/s12281-021-00418-6
30. Al-Hatmi AMS, Castro MA, de Hoog GS, et al. Epidemiology of *Aspergillus* species causing keratitis in Mexico. *Mycoses.* 2019;62(2):144-151. doi:10.1111/myc.12855
31. Gonzalez-Lara MF, Roman-Montes CM, Diaz-Lomeli P, et al. Azole resistance and

- cyp51A mutation screening in *Aspergillus fumigatus* in Mexico. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(7). doi:10.1093/jac/dkz121
32. Treviño-Rangel RDJ, Villanueva-Lozano H, Bonifaz A, et al. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Aspergillus* isolates from clinical specimens and soil samples in Mexico. *Med Mycol.* 2021;59(10):1006-1014.  
doi:10.1093/mmy/myab031
  33. Camps SMT, Van Der Linden JWM, Li Y, et al. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: A case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):10-16.  
doi:10.1128/AAC.05088-11
  34. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(7):1068-1076. doi:10.3201/eid1507.090043
  35. Standards P, Testing AS, Fungi F. M61 Performance Standards for Antifungal.
  36. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5150-5154. doi:10.1128/AAC.00686-11
  37. Clinical and Laboratory Standards Institute. *M59. Epidemiological Cut-off Values for Antifungal Susceptibility Testing.*; 2020.
  38. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:e1-e38. doi:10.1016/j.cmi.2018.01.002
  39. van der Linden JWM, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole

- resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1846-1854. doi:10.3201/eid1710.110226
40. Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis : the 2020 ECMM / ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis.* Published online 2020.
  41. Castro C, Galan-Sanchez F, Linares MJ, et al. A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: Species identification and susceptibility patterns. *Med Mycol.* 2019;57(4):412-420. doi:10.1093/mmy/myy080
  42. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3380-3387. doi:10.1128/AAC.00383-13
  43. Hu Z, Zhang J, Chen Z, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric identification and antifungal susceptibility analysis of *Candida* species isolated from patients with invasive yeast infections in five university hospitals. *Brazilian J Microbiol.* 2019;50(1):99-105. doi:10.1007/s42770-018-0027-0
  44. De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):475-484. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x
  45. Tsang CC, Tang JYM, Ye H, et al. *Rare/Cryptic Aspergillus Species Infections and Importance of Antifungal Susceptibility Testing.* Vol 63.; 2020. doi:10.1111/myc.13158
  46. Nargesi S, Jafarzadeh J, Najafzadeh MJ, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of clinically relevant and cryptic species of *Aspergillus* sections *Flavi* and *Nigri*. *J Med Microbiol.* 2022;71(4):1-9. doi:10.1099/jmm.0.001480

47. Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez De Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar J. Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol.* 2018;56(7):838-846. doi:10.1093/mmy/myx115
48. Berger S, Chazli Y EI, Babu AF, Coste AT. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A consequence of antifungal use in agriculture? *Front Microbiol.* 2017;8(JUN):1-6. doi:10.3389/fmicb.2017.01024
49. Chowdhary A, Sharma C, Hagen F, Meis JF. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. *Future Microbiol.* 2014;9(5):697-711. doi:10.2217/fmb.14.27
50. Daisuke Hagiwara, Teppei Arai. Non-cyp51A Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Isolates with Mutation in HMG-CoA Reductase. 2018;24(10):1889-1897.
51. Chen P, Liu J, Zeng M, Sang H. Exploring the molecular mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Mycol Med.* 2020;30(1). doi:10.1016/j.mycmed.2019.100915
52. Ashu EE, Korfanty GA, Samarasinghe H, et al. Widespread amphotericin B-resistant strains of *aspergillus fumigatus* in Hamilton, Canada. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1549-1555. doi:10.2147/IDR.S170952
53. Cho SY, Lee DG, Kim WB, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility profile of *aspergillus* species: Comparison between environmental and clinical isolates from patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol.* 2019;57(7):1-13. doi:10.1128/JCM.02023-18
54. Cadena J, Patterson TF. Aspergillosis. Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin N Am.* 2021;35:415-434.

55. White PL, Posso RB, Barnes RA. Analytical and clinical evaluation of the PathoNostics AsperGenius assay for detection of invasive aspergillosis and resistance to azole antifungal drugs during testing of serum samples. *J Clin Microbiol.* 2015;53(7):2115-2121. doi:10.1128/JCM.00667-15
  
56. Aigner M, Lass-Flörl C. Treatment of drug-resistant *Aspergillus* infection. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(15):2267-2270. doi:10.1517/14656566.2015.1083976