



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

Identificación rápida de *Aspergillus* spp. en estudio retrospectivo por la tecnología de espectrometría de masas en un hospital infantil de tercer nivel

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL:

GRADO DE ESPECIALISTA

EN:

BIOQUÍMICA CLÍNICA

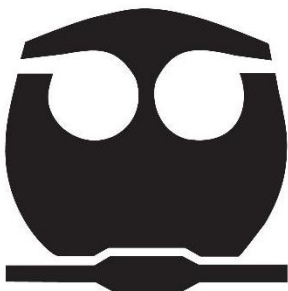
PRESENTA:

QFB MAURICIO SARABIA CRUZ

TUTOR:

MCE YANET ESTRELLA TOVAR CALDERÓN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2024





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.

Jurado asignado:

Presidente: M en C Carlos Alberto Eslava Campo

Vocal: Dra. Verónica Viñuela Berni

Secretario: Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez

1er. Suplente: M en C Luis Manuel Perea Mejía

2do. Suplente: Dr. Alberto García Lozano

Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Pediatría, Laboratorio de Parasitología y Micología.

Tutor:

MCE Yanet Estrella Tovar Calderón

Sustentante:

QFB Mauricio Sarabia Cruz

Índice de abreviaturas.

ABPA. Aspergilosis broncopulmonar alérgica.

AI. Aspergilosis invasiva.

APC. Aspergilosis pulmonar crónica.

API. Aspergilosis pulmonar invasiva.

BTS. Estándar de prueba bacteriana.

CYP51A. Proteína 14 α -desmetilasa.

EGC. Enfermedad granulomatosa crónica.

EPOC. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

FQ. Fibrosis quística.

HCCA. Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.

INP. Instituto Nacional de Pediatría.

MALDI-TOF MS. Espectrometría de masas en tiempo de vuelo ionización por desorción láser asistida por matriz.

SAFS. Asma grave con sensibilización fúngica.

SNC. Sistema nervioso central.

spp. Plural de especie.

RSAH. Rinosinusitis alérgica por hongos.

TB. Tuberculosis.

LBA. Lavado broncoalveolar.

VRI. Vías respiratorias inferiores.

QC. Control de Calidad

Índice de tablas.

- **Tabla 1.** Valores de score para el espectro generado por una muestra e interpretación del resultado.
- **Tabla 2.** Tabla de operacionalización de variables.
- **Tabla 3.** Recopilación de datos de las muestras de las cepas aisladas de *Aspergillus spp.*
- **Tabla 4.** Resultados del análisis por espectrometría de masas.
- **Tabla 5.** Morfología macroscópica (colonial) y microscópica de los aislados de *Aspergillus spp.*
- **Tabla 6.** Valores de score obtenidos.

Índice de figuras.

- **Figura 1.** Flujo de trabajo para identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF).
- **Figura 2.** Cámara de ionización del espectrómetro de masas.
- **Figura 3.** Colocación de la muestra sobre placa MALDI utilizando la técnica corta de extracción con ácido fórmico.
- **Figura 4.** Lectura de emisión espectros y resultados (valor de score).
- **Figura 5.** Especies y frecuencias de *Aspergillus spp.* identificados.
- **Figura 6.** Frecuencia de diagnósticos asociados al aislamiento de *Aspergillus spp.*
- **Figura 7.** Tiempo de crecimiento para poder realizar un análisis por espectrometría de masas vs. tiempo de requerido para poder realizar un análisis morfológico.

Resumen

La existencia de pacientes inmunosuprimidos de diversos servicios en un hospital pediátrico de tercer nivel, da lugar a infecciones por patógenos oportunistas entre los que destaca *Aspergillus spp.* el cual es un hongo filamentoso que ha despertado cierto interés debido a su amplia distribución en la naturaleza y a su relación con ciertas enfermedades que predisponen la enfermedad como son EGC, TB, FQ, entre otras enfermedades del tracto respiratorio inferior. Además se ha documentado la presencia de cepas que presentan resistencia a los azoles asociadas al gen de la proteína 14 α -desmetilasa (CYP51A), tales fármacos son la primera línea de tratamiento.

La problemática de las infecciones por aspergillus son las complicaciones que conllevan, las cuales cursan desde enfermedades alérgicas no invasivas hasta infecciones pulmonares crónicas e invasivas, estas últimas retrasan en muchos casos los procedimientos e impacta directamente en el egreso de pacientes y por lo tanto en la disponibilidad de camas. Por otra parte, aunque el cultivo junto con la microscopia aun sean la prueba de referencia para el diagnóstico de la aspergilosis, resultan ser pruebas que requieren tiempo para la obtención de resultados debido al tiempo que se requiere para el crecimiento de estructuras fúngicas bien diferenciadas, y en ciertos casos se complica la determinación de especie.

Por lo tanto, es necesario, establecer técnicas que proporcionen resultados de forma rápida y confiable, y que nos permitan determinar género y especie para que los tratamientos sean oportunos y mejor dirigidos. Una de las técnicas que han tenido mayor relevancia en los últimos años, es la espectrometría de masas la cual nos ayuda recortar los tiempos de diagnóstico además de que nos puede proporcionar especie del hongo filamentoso en cuestión.

En este trabajo retrospectivo, se sembraron 38 muestras de vías respiratorias inferiores de pacientes neutropénicos en las cuales previamente se hallaron por microscopia estructuras fúngicas pertenecientes al *Aspergillus spp.*, una vez que hubo crecimiento de las primeras estructuras fúngicas se procedió a utilizar la técnica de

espectrometría de masas para la identificación del hongo filamentoso, a su vez también se realizó un análisis microscópico.

Se encontró que la espectrometría de masas resultó ser una herramienta de diagnóstico rápida y confiable, resaltando que se debe de trabajar con proteínas de cultivos jóvenes y utilizar la técnica corta de extracción con ácido fórmico. Lo anterior debido a que de las 38 muestras, 37 se lograron identificar hasta género y especie con valores de score >2.0 en el 89.4% de las muestras y un promedio de score de 2.22 en un 97.3% de las muestras. También se encontró una coincidencia de género y especie en la identificación por espectrometría de masas versus microscopia del 86.8% lo que nos indica que por más experiencia que tenga el microbiólogo el análisis por microbiología se complica debido a la estrecha relación morfológica que existe entre algunas especies de *Aspergillus spp.*, algo que no ocurre con la técnica de espectrometría de masas.

Por último, *A. fumigatus* fue el de mayor presencia, por lo que se puede sugerir un análisis por secuenciación en búsqueda de cepas resistentes a los azoles.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Aspergilosis.....	7
1.2. Epidemiología	8
1.3. Clínica de la enfermedad	9
1.4. Panorama actual de la aspergilosis.....	12
1.5. Métodos de diagnóstico	12
1.5.1. Antecedentes.....	12
1.5.2. Cultivo.....	16
1.5.3. Detección de galactomanano.	17
1.5.4. Reacción de la cadena polimerasa.....	17
1.5.5. Espectrometría de masas	18
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVO GENERAL.....	21
3.1. Objetivos específicos.	21
4. HIPÓTESIS	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	22
5.1. Tipo de estudio	22
5.2. Área de estudio	22
5.3. Aspectos éticos.....	22
5.4. Criterios inclusión	22
5.5. Criterios de exclusión	23
5.6. Metodología.	23
5.6.1. Equipos e instrumentos.....	24
5.6.2. Reactivos	24
5.7. Método	25
5.7.1. Cultivo de muestras.....	25
5.7.2. Análisis por espectrometría de masas	25
5.7.2.1. Preparación y medición de BTS	25
5.7.2.2. Preparación de muestras.....	25
5.7.3. Montaje en el equipo	26
5.7.4. Análisis macro y microscópico.....	28
5.7.5. Análisis estadístico.....	29
6. RESULTADOS.....	30
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
8. CONCLUSIONES	39
9. ANEXOS.	41
9.1. Flujo de trabajo para identificación de hongos filamentosos por espectrometría de masas.	41
10. BIBLIOGRAFÍA	42

1. Introducción

Este trabajo está enfocado en describir la tecnología de espectrometría de masas que permite una identificación rápida y confiable para el diagnóstico a nivel microbiológico del agente etiológico, ayudando a la interpretación clínica y su tratamiento de primera línea. En la actualidad muchos laboratorios de micología dependen aún del crecimiento del cultivo y la microscopía como identificación estándar. Con la tecnología de espectrometría de masas se puede lograr una identificación de forma rápida a nivel de género y especie con una preparación sencilla y consumibles mínimos, lo cual suma tiempo de respuesta para el inicio de tratamiento o desescalamiento fúngico ya que dicha estrategia es un objetivo para el desarrollo eficiente de programas terapéuticos así como de los tratamientos empíricos y profilácticos para disminuir las tasas de morbimortalidad por infecciones fúngicas invasivas.

Este trabajo se enfoca en la detección del hongo filamentosos *Aspergillus spp.* por la tecnología de espectrometría de masas, la cual últimamente ha cobrado mayor relevancia por ser una técnica con varias ventajas.

1.1. Aspergilosis

El género *Aspergillus spp.* es un hongo filamentoso hialino, saprofita, perteneciente al phylum Ascomycota que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Su estructura se encuentra formada por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (formación ascosporas) y asexual (formación de conidios) (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo [INSST], 2021). En la naturaleza se estima que hay alrededor de 180 especies de *Aspergillus spp.* de las cuales 40 tiene importancia clínica por causar infecciones en los seres humanos (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2021).

Las especies de *Aspergillus spp.* se pueden diferenciar en cuanto al tamaño, color (ej. verde amarillento *A. flavus*, negro *A. niger*, y marrón *A. terreus*), forma y textura (aterciopelada, granular o algodonosa) de las colonias, otro criterio de diferenciación es el tiempo de crecimiento, así como en la forma de las hifas y conidios (INSST, 2021).

Se sabe también que el género *Aspergillus spp.* es uno de los principales hongos filamentosos productores de micotoxinas, estas son metabolitos secundarios producidos y secretados durante el proceso de degradación de la materia orgánica los cuales funcionan como defensa frente a otros microorganismos (INSST, 2021).

1.2. Epidemiología

Como se mencionó anteriormente, el género *Aspergillus* comprende varias especies, muchas de las cuales se sabe que son potencialmente patógenas y están implicadas en infecciones graves. La aspergilosis involucra varias enfermedades causadas por especies de *Aspergillus spp.*, estas enfermedades dependen mucho de la respuesta inmunológica del huésped y pueden ir desde enfermedades alérgicas no invasivas hasta infecciones pulmonares crónicas e invasivas (Kanaujia et al., 2023). Los conidios de *Aspergillus* están presentes en el medio ambiente, después de la inhalación o inoculación, dependiendo del estado inmunológico del huésped, la infección puede propagarse localmente o diseminarse a sitios distantes. Los factores de riesgo de esta infección aumentan con la aparición de agentes biológicos dirigidos al sistema inmunológico y el aumento de infecciones virales como la enfermedad por coronavirus (Thomps & Young, 2021).

Dentro de las enfermedades causadas por *Aspergillus spp.*, la aspergilosis invasiva (AI) es una de las infecciones fúngicas invasivas más graves, teniendo alta morbilidad y mortalidad, además de altos costos de atención (Wang et al., 2022). Cada año se reportan más de 200 mil casos de infección por *Aspergillus*, de estos casos *Aspergillus fumigatus* es el *Aspergillus spp.* que se encuentra con mayor frecuencia, el cual causa AI y enfermedades alérgicas, aunque otras especies, como *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor* y *A. nidulans*, también pueden provocar la enfermedad (Van de Veerdonk et al., 2017). Por otro lado, ahora también se están identificando especies no *fumigatus* en una amplia gama de casos liderados por *A. flavus*, este hongo es especialmente prevalente entre los casos de AI de Asia, Medio Oriente y África. Esto podría deberse a su potencial para tolerar ambientes cálidos y áridos. Mientras que *A. fumigatus* representa la mayoría de las aspergilosis pulmonares, *A. flavus* causa

alrededor del 10% de las infecciones broncopulmonares, siendo la aspergilosis rinocerebral la presentación más frecuente (Rudramurthy et al., 2019). Los pacientes inmunocomprometidos y aquellos con enfermedades del tracto respiratorio inferior son los más susceptibles a la AI, desde AI aguda hasta aspergilosis pulmonar crónica (APC). Por otra parte, el diagnóstico temprano de AI es difícil y su diagnóstico erróneo ocurre frecuentemente ya que las infecciones *por Aspergillus* rara vez tienen manifestaciones características y los agentes patógenos específicos normalmente tardan mucho tiempo en detectarse (Wang et al., 2022).

El complejo de especies de *A. terreus* como causante de aspergilosis tiene una prevalencia clínica creciente en los últimos años y al ser resistente a la anfotericina B, la especie asume un papel etiológico muy importante y constituye casi el 4% de todas las AI con un resultado adverso que la AI causada por especies distintas a *A. terreus* (Lass-Flörl, 2018). Los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (EGC) suelen estar infectados con *A. fumigatus*, seguido de *A. nidulans* y otros aspergillus, como *A. tanneri* (Sugui et al., 2012).

A. niger se asocia menos comúnmente con AI que otros *Aspergillus spp.* Suele asociarse con otomicosis e infecciones cutáneas, con pocos informes de neumonía (Wang et al., 2022).

A. versicolor es un hongo ubicuo que ha sido ampliamente descrito como agente de onicomycosis, otomicosis, infección cutánea, osteomielitis y enfermedades oculares. Se encuentra regularmente como colonizador del tracto respiratorio con casos raros de aspergilosis pulmonar invasiva (API). Finalmente se sabe también se sabe que muchas especies de *Aspergillus spp.* producen metabolitos tóxicos (micotoxinas, ácido 3-nitropropiónico, aflatoxinas y ocratoxina A), que alteran la fagocitosis (Charles et al., 2011).

1.3. Clínica de la enfermedad

La aspergilosis puede afectar a casi cualquier órgano del cuerpo humano. Las vías respiratorias inferiores y los pulmones son los infectados con mayor frecuencia,

seguidos de los senos nasales y la piel (Kanaujia et al., 2023). La diseminación directa o hematógona puede afectar el sistema cardiovascular y nervioso central (SNC). Si bien el espectro de la enfermedad depende del estado inmunológico del huésped infectado y de la existencia de una enfermedad pulmonar preexistente, otro factor que puede condicionar la enfermedad es un recuento alto de esporas en el aire (Rudramurthy et al., 2016).

Las aspergilosis superficiales y cutáneas que afectan las capas externas de la piel, las uñas, la córnea o el conducto auditivo son infrecuentes y rara vez infiltran tejidos más profundos. Estas infecciones se adquieren principalmente mediante inyección traumática directa, incluidas otomicosis fúngica, queratitis, onicomycosis y aspergilosis cutánea (Merad et al., 2021).

En cuanto a la infección pulmonar por *Aspergillus spp.*, por lo general, permanecen colonizados en cavidades pulmonares preexistentes como resultado de tuberculosis, bronquiectasias, sarcoidosis o neoplasia cavitaria y causan afecciones como la aspergilosis pulmonar crónica (APC) en individuos que de otro modo serían inmunocompetentes (Alastruey et al., 2018). El asma grave con sensibilización fúngica (SAFS) y la rinitis alérgica son comunes entre las personas hipersensibles. Por el contrario, la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) se observa con frecuencia entre pacientes con fibrosis quística (FQ) subyacente o asma (Agarwal et al., 2013). La aspergilosis pulmonar invasiva se puede observar en personas inmunocomprometidas y neutropénicas como parte de una afectación sistémica y también en pacientes no neutropénicos con estancia prolongada en la unidad de cuidados intensivos (UCI), ventilación mecánica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y, más recientemente, coronavirus (COVID-19) (Alastruey et al., 2018).

A continuación, y a manera de resumen, se presentan los diferentes tipos de aspergilosis resaltando que las personas inmunocomprometidas o con enfermedades pulmonares tienen mayor riesgo de desarrollar aspergilosis.

- **Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA):** Trastorno pulmonar inmunológico causado por hipersensibilidad a *Aspergillus spp.*, se manifiesta con asma mal controlada, infiltrados pulmonares recurrentes y bronquiectasias (Agarwal et al., 2013).
- **Aspergiloma:** Es una masa (bola fúngica) que se desarrolla en una cavidad pulmonar o en una zona de cicatrización pulmonar derivada una lesión previa provocada por tuberculosis o un absceso pulmonar, en este caso el hongo entra a través de la inhalación de esporas (Chakraborty & Baradhi, 2022).
- **Aspergilosis pulmonar crónica:** Incluye el aspergiloma, la aspergilosis crónica cavitada, la aspergilosis crónica fibrosante y la aspergilosis crónica necrotizante. La duración de los síntomas es mayor que la aspergilosis pulmonar aguda, mayor a tres meses regularmente (Alastruey-Izquierdo et al., 2018).
- **Aspergilosis invasiva (AI):** Se presenta cuando hay una infección grave afectando a personas inmunocomprometidas como aquellas que requieren un trasplante de células madre. Las formas clínicas locales más frecuentes de aspergilosis invasiva tienen lugar a nivel pulmonar y en los senos paranasales, aunque también pueden afectar al tracto gastrointestinal o a la piel, por inoculación directa (Rudramurthy et al., 2019).
- **Aspergilosis cutánea (piel):** Afecta a las capas externas de la piel, uñas, cornea o el canal auditivo y rara vez se infiltran a tejidos más profundos. Ingresan al cuerpo a través de una inyección traumática directa, dentro de estas están la otomicosis fúngica, queratitis, onicomiosis y la aspergilosis cutánea, se presenta regularmente en pacientes inmunocomprometidos y en algunas ocasiones pueden derivarse de una AI (Merad et al., 2021).
- **Rinosinusitis alérgica por hongos (AFRS):** Forma no invasiva de la enfermedad, que generalmente se observa en individuos más jóvenes, inmunocompetentes y atópicos, con reacción de hipersensibilidad a los antígenos fúngicos, depósito de complejos inmunes e inflamación (Kanaujia et al., 2023).

Algunos factores de riesgo subyacentes para adquirir una infección por *Aspergillus spp.* son neoplasias malignas hematológicas, trasplante de células madre hematopoyéticas, trasplante de órganos sólidos y pacientes con quimioterapia/esteroides prolongados, y casos virales previos de neumonía (Kanaujia et al., 2023).

1.4. Panorama actual de la aspergilosis

La situación actual de resistencia a los antifúngicos por parte de *Aspergillus* son motivo de gran preocupación, aunque los antifúngicos azólicos resultan críticos en el tratamiento de la AI, incluidos voriconazol, isavuconazol, posaconazol, itraconazol, etc. para regímenes de primera línea o de recuperación (Rybak et al., 2019). La incidencia de aspergilosis aumenta año tras año, la tasa de resistencia de *Aspergillus spp.* a el tratamiento con azoles también aumenta gradualmente y, en particular, la resistencia de *A. fumigatus* ha incrementado en diversas regiones. Por otra parte, se han realizado estudios que han identificado alteraciones en el esteroide 14 α -desmetilasa (CYP51) del citocromo P450, una proteína diana dentro de muchos *A. fumigatus* resistentes a los azoles, que probablemente afecte la capacidad de unión antifúngica como resultado de sustituciones de aminoácidos debido a variantes de un solo nucleótido del gen que codifica la proteína CYP51- *Aspergillus* (CYP51A) (Howard & Arendrup, 2011). Debido a esto, la conciencia clínica y la evaluación de las cepas predominantes, las características epidemiológicas y los perfiles de sensibilidad a los medicamentos de las infecciones invasivas por *Aspergillus* en las regiones locales son clave para el tratamiento clínico temprano y la mejora de los resultados clínicos de los pacientes (Kanaujia et al., 2023).

1.5. Métodos de diagnóstico

1.5.1. Antecedentes

A continuación, se mencionan algunos trabajos que se han realizado previamente respecto a la identificación de *Aspergillus* o que involucren a la técnica de

espectrometría de masas en el diagnóstico micológico, en ellos resalta además el tratamiento y manejo de la aspergilosis.

1. Wang et al. (2022) en su trabajo “Epidemiología, susceptibilidad a los fármacos y factores de riesgo clínico en pacientes con aspergilosis invasiva” realizado en Departamento del laboratorio clínico del primer hospital afiliado de la Universidad Médica de AnHui, Hefei, China, tuvo como objetivo investigar la distribución de especies de aspergillus, las sensibilidades antifúngicas, características clínicas y los factores de riesgo de los pacientes con aspergilosis invasiva. Los autores llevaron a cabo la identificación de *Aspergillus* mediante diferentes métodos como cultivo (agar Sabouroud Dextrosa, CHROMagar y en caso de sangre fresco de hemocultivo para hongos), pruebas de susceptibilidad, secuenciación de genes asociados a las resistencia de azoles (gen *cyp51A*) y por último la técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo por ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF), estas dos últimas técnicas fueron útiles para identificar a nivel de especie. En sus hallazgos encontraron que el aspergillus más común es *A. fumigatus* (56.41 %), seguido *A. Flavus* (20.51) y *A. niger* (15.38 %). También encontraron concentración mínima inhibitoria (CMI) bajas para azoles, ligeramente altas para Anfotericina B y altas para flucitosina. Determinaron también que los factores de riesgo para aspergilosis invasiva eran principalmente enfermedades pulmonares y la edad de los pacientes.
2. Kanaujia et al. (2023) en su trabajo “Aspergilosis: una actualización sobre el espectro clínico, los esquemas de diagnóstico y manejo” realizado en el Departamento de Microbiología Médica, Instituto de Posgrado de Educación e Investigación Médica PGIMER, Chandigarh, India, brinda una revisión general de las enfermedades causadas por aspergillus incluyendo especies involucradas, así como la clínica de la enfermedad. Menciona diversos métodos de diagnóstico de la aspergilosis, entre los cuales están la radiología, la broncoscopia, el cultivo y los métodos microbiológicos no basados en cultivos,

de esta manera analiza los algoritmos diagnósticos disponibles. Y, por último, menciona principales aspectos a contemplar en el manejo de las infecciones por *Aspergillus spp.* como lo es la resistencia a antimicóticos y la elección de antimicóticos.

3. García & Pemán (2018) en su trabajo “Diagnóstico microbiológico de las micosis invasoras” realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario La Paz, Madrid, España, resalta que el pronóstico de las infecciones fúngicas depende de la rapidez de su diagnóstico y su tratamiento. Además, destaca que los métodos convencionales son poco sensibles, laboriosos y lentos, por lo que propone la necesidad de nuevas estrategias diagnósticas rápidas y eficaces entre las cuales están la espectrometría de masas (30 minutos), técnicas moleculares (60-80 minutos), hibridación fluorescente in situ (90 minutos) y la detección combinada de marcadores (antimicelio, manano y β -glucano). También propone la identificación de *Cryptococcus* mediante la aglutinación en latex o inmunocromatografía.
4. Siller-Ruiz et al. (2017) en su trabajo “Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos” realizado en el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), resalta que la espectrometría de masa ya es una herramienta de trabajo rutinaria en microbiología clínica por su rapidez y fiabilidad en la identificación de microorganismos. Expone que la identificación de hongos filamentosos ha sido un poco complicada sin embargo se ha mejorado con la extracción convencional con ácido fórmico y acetonitrilo. Un problema en la identificación de los hongos filamentosos es la existencia de diferencias significativas en los perfiles proteicos obtenidos en función de la antigüedad de los cultivos, e incluso entre diferentes subcultivos de la misma cepa. La solución a esto pasa por la elaboración de bases de datos más amplias y complejas, que incorporen perfiles de un mayor número de cepas y de cultivos de diferente antigüedad. Además, en este trabajo se considera estandarizar el tiempo de lectura del microorganismo a detectar.

5. Alanio et al. (2011) en su trabajo “Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización y desorción láser asistida por matriz para una identificación rápida y precisa de especies de *Aspergillus* clínicamente relevantes” realizado en el Departamento de microbiología de la Universidad de París Descartes, describe que anteriormente se admitía que un pequeño grupo de *Aspergillus spp.* eran responsables de la AI (*A. fumigatus*, el principal agente etiológico, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans*), sin embargo estudios han informado casos de AI causados por especies *Aspergillus* no conocidas previamente, esta identificación se logró gracias la secuenciación multilocus (MLS) para genes que codifican para β -tubulina, calmodulina o actina. Además, actualmente el género *aspergillus* incluye 7 subgéneros que se subdividen en 22 secciones cada una correspondiente a un “complejo de especies” que agrupa especies relacionadas entre sí, por ejemplo, la sección *Fumigati* o “complejo *A. fumigatus*” incluye no sólo *A. fumigatus*, sino también otras 34 especies relacionadas. Alanio et al. (2011) resaltan que la identificación de *Aspergillus* se basa habitualmente en la determinación de características morfológicas macroscópicas y microscópicas, como el color, la forma, la ornamentación y el reconocimiento de estructuras asexuales o sexuales. Estos medios convencionales de identificación no permiten la discriminación entre especies morfológicamente cercanas de *Aspergillus* (es decir, especies que pertenecen a la misma sección), y muchos informes han destacado la aparición de identificaciones erróneas con enfoques fenotípicos tradicionales. Por tanto, se ha subestimado el número de especies responsables de AI.

Alanio et al. (2011) resaltan a la secuenciación multilocus como la herramienta ideal para la identificación de estos *Aspergillus*, sin embargo el alto costo y el tiempo que requiere lo pone en desventaja. Por lo tanto, resalta a la técnica de espectrometría de masas (MS) como método de identificación rápida de especies de *Aspergillus* clínicamente relevantes, por lo que se dieron a la tarea de diseñar un método de identificación rápida de *Aspergillus*, demostrando así que la tecnología de MALDI-TOF es eficaz para la identificación precisa de

aislados clínicos de *Aspergillus* recuperados de pacientes o del medio ambiente.

6. Montelongo (2015) en su trabajo "Identificación y tipificación de levaduras de importancia médica, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF", elaborado en el Hospital General de México, realizó la verificación del procedimiento de identificación de levaduras mediante la técnica de espectrometría de masa (MALDI-TOF) utilizando la plataforma comercial Vitek-MS®. La verificación se realizó comparando el método de espectrometría de masas contra métodos ya existentes y considerados como estándar de referencia para la identificación microbiológica como es el caso de los métodos moleculares. En sus resultados encuentra una concordancia del 90-100% contra la identificación por métodos moleculares. Resalta que en el caso de hongos dismórficos es más fácil la identificación en la fase levaduriforme. Al final se concluye que la espectrometría de masas (MALDI-TOF) puede ser considerada como una técnica complementaria para la identificación rutinaria de levaduras y hongos dismórficos e inclusive puede ser utilizada como un método de tamizaje para evitar llegar a las pruebas moleculares. También se recomienda que la identificación del agente patógeno debe de estar acompañada de pruebas de susceptibilidad a los principales antifúngicos.

1.5.2. Cultivo

A pesar de la aplicación generalizada de los diagnósticos de ácidos nucleicos, los cultivos siguen siendo parte integral de los laboratorios modernos. Debido a que los cultivos detectan una gran cantidad de tipos de organismos, es poco probable que desaparezcan de la práctica clínica en un futuro próximo. Sin embargo, su desventaja es el lento tiempo de respuesta, afectado por el tiempo de crecimiento y la identificación de este por microscopia, esta última en algunos casos se puede complicar por similitud morfológica que hay entre especies muy relacionadas entre sí (Patel, 2013). Por otra parte, se ha documentado un alto reporte de resultados falsos negativos asociados a una baja sensibilidad, causada por el uso de medios

complementados con cicloheximida la cual inhibe a algunas especies de *Aspergillus spp.*(Bedoya, 2020).

Históricamente, la identificación de bacterias y hongos cultivados ha sido una tarea algorítmica compleja. Se han utilizado libros de texto, diagramas de flujo y tablas para interpretar la morfología de las colonias, así como las tinciones en fresco con azul algodón de lacto fenol y pruebas bioquímicas como son la fermentación de azúcares y asimilación de nitrato (Patel, 2013).

1.5.3. Detección de galactomanano.

El galactomanano es un antígeno polisacárido componente de la pared celular de especies de *Aspergillus spp.* el hongo lo excreta durante la fase de crecimiento y este puede liberarse en la sangre y otros fluidos corporales incluso en las primeras etapas de la AI, la presencia del antígeno puede mantenerse durante 1 a 8 semanas y se ha sugerido que el nivel de galactomanano es proporcional a la carga fúngica. Por lo tanto, la detección del nivel de este antígeno mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) puede resultar útil para realizar un diagnóstico temprano de la aspergilosis pulmonar invasiva (Zhou et al., 2017).

Desde la implementación de la detección de galactomano han existido dos tipos de ensayos comerciales para la detección de galactomanano: el primero es la aglutinación por látex el cual hoy en día es rara vez utilizado, y el segundo es la prueba de ELISA tipo sándwich, este último se utiliza para la detección del antígeno en suero y LBA aunque también se puede detectar en muestras como LCR y orina. Un reactivo actualmente comercial es el de la marca BIORAD® el cual involucra la detección del galactomanano en muestras de suero mediante el uso de anticuerpos monoclonales EBA-2 de rata (Leeflang et al., 2015).

1.5.4. Reacción de la cadena polimerasa

Actualmente existen kits que llevan a cabo una reacción de la cadena polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de genes de *Aspergillus spp.*, esta técnica

tiene la ventaja de proporcionar una detección temprana y de manera confiable en varios tipos de muestras, sin embargo, algunos de estos kits solo proporcionan género o solo se limitan a la identificación de los principales *Aspergillus spp.* patógenos dejando fuera otros poco comunes pero que también resultan ser patógenos para el ser humano. Otro inconveniente de la técnica de PCR es que los laboratorios requieren áreas adecuadas para poder realizar esta técnica y en algunos casos los equipos no están al alcance de estos (Patel, 2013).

Un kit actualmente existente es el de “Aspergillus spp ELITe MGB®” que involucra la realización de una PCR en tiempo real (RT-PCR) utilizando sondas tipo TaqMan para la detección y cuantificación del gen rDNA18s de *Aspergillus spp.*, sin embargo, solo se limita a la detección de *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. versicolor* y *A. glaucus*.

1.5.5. Espectrometría de masas

Con la técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), las colonias que crecen en cultivo se identifican de forma económica y precisa en minutos sin conocimiento a priori del tipo de microorganismo; los usuarios ni siquiera necesitan saber si se está analizando una bacteria o una levadura. Producto de los avances en espectrometría de masas y bioinformática, MALDI-TOF MS está revolucionando la identificación de bacterias y hongos en microbiología clínica (Patel, 2013).

Para la identificación por MALDI-TOF MS se requiere de un cultivo de bacterias o levaduras y hongos utilizando consumibles mínimos, proporciona una identificación rápida y de bajo costo. Primero, se selecciona una colonia desconocida pero pura (no mezclada) de una placa de cultivo y con ayuda del asa estéril se toma una pequeña porción de esta agregando un pequeño tratamiento con ácido fórmico y finalmente se recubre con una matriz (Figura 1). Después de un breve periodo de secado, la placa se coloca en la cámara de ionización del espectrómetro de masas (Figura 2) (Patel, 2013).

Antes de la inoculación en la placa objetivo se puede realizar una extracción preparatoria de proteínas más compleja, comúnmente utilizada en estudios más antiguos. Aunque esto produce espectros de masas de más alta calidad, es técnicamente engorroso; puesto que la prueba directa en placa con ácido fórmico identifica un número similar de organismos (Patel, 2013). Es importante recalcar que la técnica directa en placa se debe de evitar con organismos altamente patógenos.

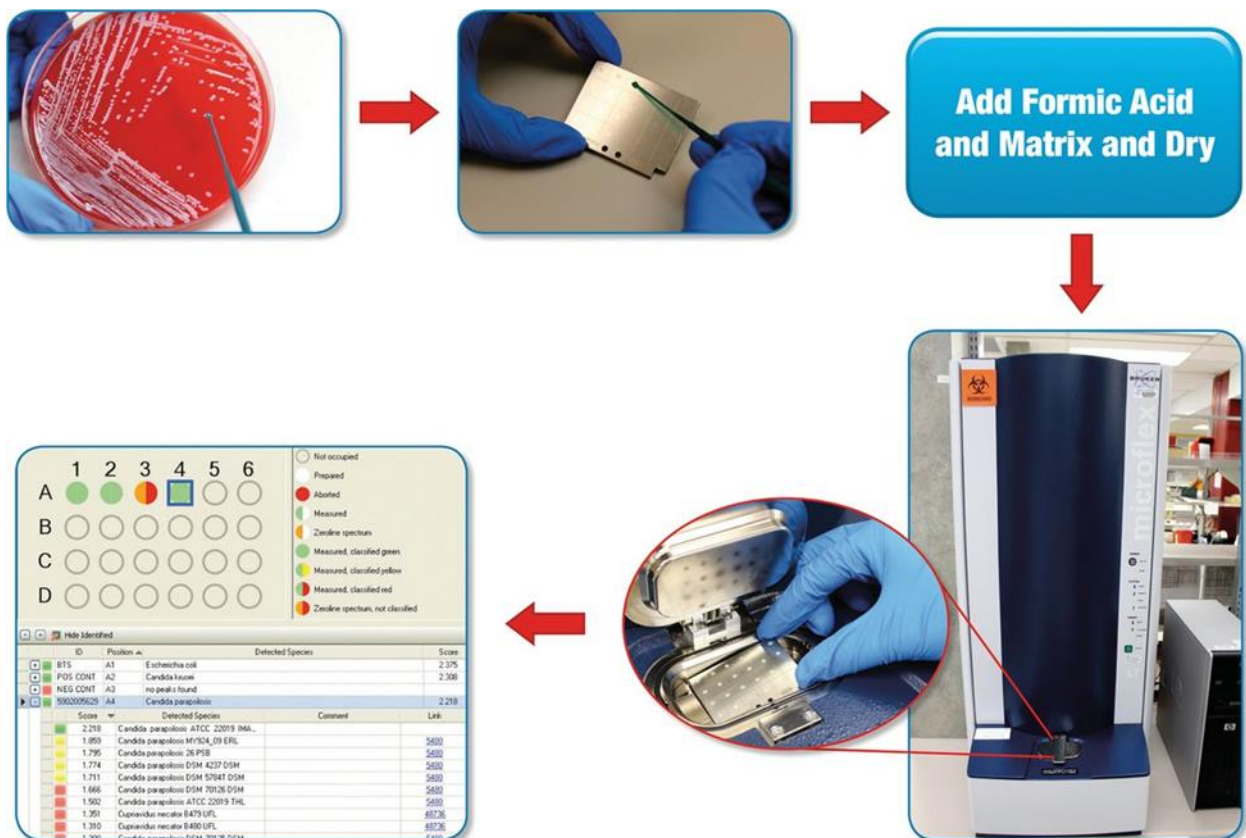


Figura 1. Flujo de trabajo para identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Se puede observar paso a paso la identificación de un microorganismo desde que se toma una asada del cultivo, extracción con ácido fórmico y aplicación de la matriz, posteriormente la lectura de espectros para finalmente poder identificar mediante la obtención de un valor de score. (Patel, 2013).

"MALDI" se refiere a la matriz, que ayuda en la desorción e ionización de analitos microbianos a través de pulsos de energía de una fuente ultravioleta de N₂. La matriz (p. ej., ácido α -ciano-4-hidroxicinámico disuelto en 50% de acetonitrilo y 2,5% de ácido trifluoroacético) aísla las moléculas microbianas entre sí. Las moléculas microbianas y de la matriz en la placa objetivo se desorben, y la matriz absorbe la mayor parte de la

energía, convirtiéndola a un estado ionizado. Mediante una colisión aleatoria en la fase gaseosa, la carga se transfiere de la matriz a las moléculas microbianas; se miden los analitos dentro del rango de masa especificado, siendo los más abundantes las proteínas ribosómicas. La nube de proteínas microbianas ionizadas se canaliza a través de un campo electrostático cargado positivamente hacia un analizador de masas de tiempo de vuelo o "TOF", un tubo al vacío. Los iones viajan hacia un detector de iones y los analitos pequeños viajan más rápido, seguidos por analitos progresivamente más grandes. Se genera un espectro de masas, que representa el número de iones de una masa determinada que impactan en el detector de iones a lo largo del tiempo (Patel, 2013).

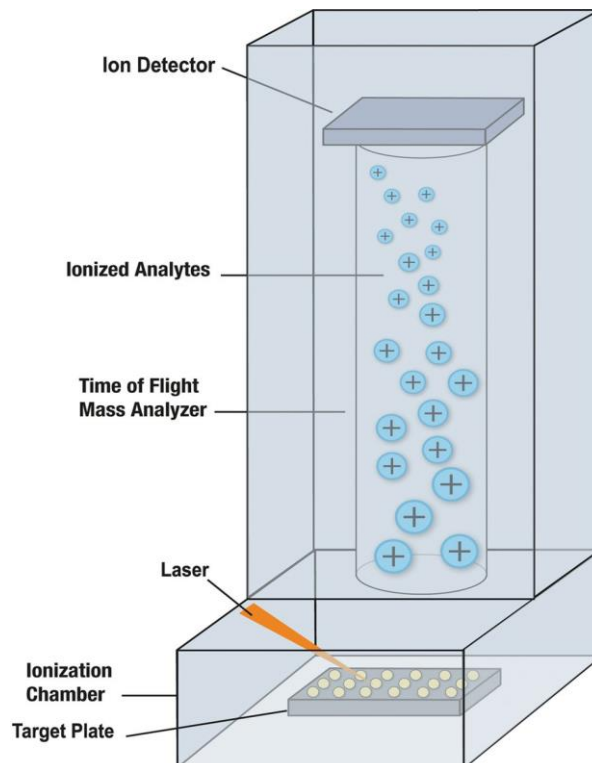


Figura 2. Cámara de ionización del espectrómetro de masas. El equipo genera un espectro de masas, el cual es comparado con una base de datos dando como resultado un valor de score y la identificación del microorganismo (Patel, 2013).

2. Justificación

En el Instituto Nacional de Pediatría la aspergilosis invasiva es causante de infecciones de vías respiratorias inferiores la cual se puede complicar y llevar a una insuficiencia respiratoria rápidamente progresiva, que puede conducir a la muerte. Uno de los grupos susceptibles a estas enfermedades oportunistas son los pacientes con el sistema inmunológico comprometido, con enfermedades respiratorias y principalmente receptores de trasplantes de células madre y órganos sólidos, provocando así una alta mortalidad. Es por eso que es necesario realizar la detección temprana de forma rápida y precisa las cepas predominantes causantes de aspergilosis que junto con la clínica son clave para el tratamiento clínico temprano y mejor dirigido, y por lo tanto una rápida recuperación de los pacientes.

3. Objetivo general.

- Realizar la identificación rápida por metodología de extracción rápida para hongos filamentosos en muestras de pacientes inmunocomprometidos o con infecciones de vías respiratorias inferiores de diversos servicios del Instituto Nacional de Pediatría mediante la técnica de espectrometría de masas en un estudio retrospectivo.

3.1. Objetivos específicos.

- Realizar la identificación rápida de *Aspergillus spp.* a partir de cultivos de muestras pacientes con infecciones de vías respiratorias inferiores por medio de la técnica de espectrometría de masas utilizando el método corto de extracción con ácido fórmico al 25%.
- Determinar las especies comúnmente identificadas y asociadas a infecciones por *Aspergillus spp.*
- Verificar por medio del crecimiento de *Aspergillus spp.* en cultivo micológico si las estructuras (hifas) corresponden a la identificación por espectrometría de masas.
- Determinar si la técnica de espectrometría de masas puede ser una herramienta útil en la identificación rápida de *Aspergillus spp.*

4. Hipótesis

Al utilizar cultivos de hongos filamentosos con tiempos cortos de incubación (crecimiento) 24-48 horas (uno a dos días) en los cuales se encuentran estructuras fúngicas tempranas y utilizando el método corto de extracción con ácido fórmico al 70%, así como apoyarse de una biblioteca amplia de espectros de masas de hongos filamentosos, es posible identificar de manera rápida, eficaz y precisa el género y especie de los patógenos causantes de infecciones fúngicas, en nuestro caso particular de *Aspergillus spp.*

5. Materiales y métodos.

5.1. Tipo de estudio

Estudio cualitativo experimental, observacional, retrospectivo y transversal.

5.2. Área de estudio

Laboratorio de Parasitología y Micología del Departamento de Análisis Clínicos y Estudio Especiales (DACEE) del Instituto Nacional de Pediatría el cual es un hospital pediátrico de tercer nivel, Insurgentes Sur 3700-C, Colonia Insurgentes Cuicuilco Alcaldía Coyoacán CP 04530, Ciudad de México.

5.3. Aspectos éticos

Este estudio forma parte de la rutina diaria del área de microbiología y en este caso del Laboratorio de Parasitología y Micología, lo que no fue necesario solicitar la aprobación del comité de ética del Instituto Nacional de Pediatría.

5.4. Criterios inclusión

- Debido a que es un estudio retrospectivo, se seleccionaron cepas aisladas a partir de muestras de pacientes en las cuales se identificaron especies de *Aspergillus spp.* por microscopia ya sea por examen directo de la muestra o por medio de un cultivo de está. Estas cepas se conservan en glicerol al 10% a temperatura ambiente manteniéndose viables y garantizando la estabilidad

genética, paralizando el metabolismo y por lo tanto el crecimiento por un tiempo largo.

- Periodo comprendido del 01 de enero al 31 de diciembre de 2022.
- Muestras de vías respiratorias inferiores como; lavado bronco alveolar, y aspirado traqueal.
- Muestras de pacientes de diferentes servicios, aunque principalmente de servicios críticos como son; Hematología, Neumología, Oncología, Trasplante de células progenitoras pluripotenciales (TCPH), Terapia Intensiva y Urgencias
- Las edades de los pacientes van 0 a 18 años.

5.5. Criterios de exclusión

- Muestra de vías respiratorias superiores.
- Muestras en las cuales se halla identificado algún otro microorganismo como contaminación.

5.6. Metodología.

Debido a que es un estudio retrospectivo, se seleccionaran aislados de muestras de pacientes de diferentes servicios del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y en las cuales previamente se identificaron especies *Aspergillus spp.* por microscopia ya sea por examen directo de la muestra o mediante cultivo de la muestra.

Estos aislados que están guardados en el cepario del laboratorio se resembraran e incubaran y en cuanto se observen las primeras estructuras filamentosas se realizará un análisis por espectrometría de masas, una vez hecho este análisis estos aislados se seguirán manteniendo en incubación hasta que se observen colonias mejor diferenciadas, posteriormente se llevará a cabo un análisis morfológico por microscopia para verificar que las estructuras observadas correspondan a la identificación por espectrometría de masas. Las muestras fueron proporcionadas por el laboratorio de Parasitología y Micología de dicho hospital.

Cabe mencionar que en este trabajo se utilizara la técnica corta de extracción con ácido fórmico al 70% la cual tiene la finalidad de poder romper la pared celular del hongo y exponer las proteínas de este para poder hacer posible el análisis por espectrometría de masas. Se sabe que existe un método alternativo el cual se realiza utilizando caldo dextrosa Sabouraud, etanol al 70%, acetonitrilo y ácido fórmico sin embargo el procedimiento es más largo de hasta una semana, en este trabajo no se utilizará este método sin embargo nos parece importante mencionarlo.

5.6.1. Equipos e instrumentos

- Equipo de espectrometría de masas, BD® MALDI BIOTYPER
- Refrigerador incubadora para medios de cultivo modelo FOC 2251
- Microscopio Modelo Primo Star 3 Marca Zeiss
- Gabinete de bioseguridad tipo A2
- Pipeta de 10.0 µL calibrada
- Puntas de 10.0 µL

Materiales

- Medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud
- Asa bacteriológica/micológica.
- Palillos de madera o plástico
- Placa Maldi Biotyper MSP de 96 posiciones
- Mechero Bunsen
- Cinta adhesiva transparente
- Portaobjetos
- Cubre objetos

5.6.2. Reactivos

- Solvente orgánico para reconstitución de la Matriz
- Solución de ácido fórmico al 70%
- HCCA (Matriz) ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

- Control, Estándar de prueba bacteriana (BTS), contiene un extracto de *E. coli* DH5 alfa que muestra un perfil característico de péptidos y proteínas en espectros de masa.
- Azul de lactofenol. Contiene azul de metileno, fenol y ácido láctico. Tiñe citoplasma y quitina presente en los hongos.

5.7. Método

5.7.1. Cultivo de muestras

Seleccionar las muestras bajo los criterios de inclusión y exclusión antes mencionados. Una vez hecho esto se procede al cultivo de la muestra de la siguiente manera:

1. Con un asa micológica colocar una asada y sembrar por punción en tres puntos de la placa en forma de triángulo para su crecimiento homogéneo y su correcta identificación.
2. Incubar de 24 a 72 h a 37°C y revisar su crecimiento en este lapso de tiempo.

5.7.2. Análisis por espectrometría de masas

5.7.2.1. Preparación y medición de BTS

1. En la placa Maldi Biotyper MSP, colocar en las primeras dos posiciones 1.0 µL de BTS. Se requiere trabajar con guantes de nitrilo.
2. Dejar secar a temperatura ambiente la placa Maldi Biotyper MSP.
3. Inmediatamente, colocar 1.0 µL de matriz (HCCA) y dejar secar nuevamente a temperatura ambiente.
4. Realizar análisis en el MALDI Biotyper al mismo tiempo con las muestras problema.

5.7.2.2. Preparación de muestras

1. Preparar la hoja de trabajo de la placa MALDI Biotyper identificando las muestras, dejar las dos posiciones iniciales para el BTS y analizar las muestras por duplicado.
2. Colocar 1.0 μL de ácido fórmico al 70% en una posición de la placa.
3. Tomar una parte de la colonia con un palillo de madera o plástico y colocar una capa fina de la muestra en la posición donde se colocó el ácido fórmico, dejar secar a temperatura ambiente. Esto permite exponer las proteínas del hongo. (Figura 3). Es necesario colocar una muestra a la vez para evitar la evaporación del ácido fórmico. Nota: Es recomendable trabajar con cultivos jóvenes.
4. Aplicar 1.0 μL de matriz (HCCA) y dejar secar a temperatura ambiente, proceder a analizar en el MALDI Biotyper.
5. Es recomendable que el BTS se coloque al terminar de colocar todas muestras para evitar que se exponga por mucho tiempo a temperatura ambiente y así evitar la oxidación de las proteínas.

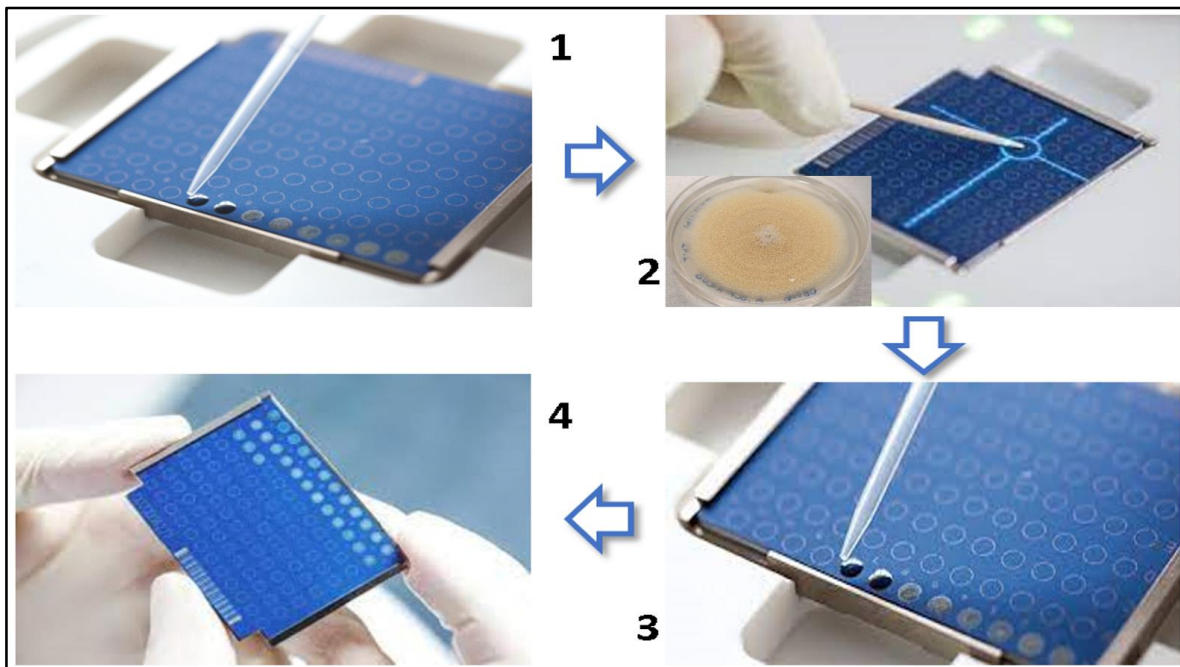


Figura 3. Colocación de la muestra sobre placa MALDI utilizando la técnica corta de extracción con ácido fórmico. 1) Colocar en la posición seleccionada 1.0 μL de ácido fórmico. 2. Colocar inmediatamente una ligera capa de la muestra y permitir secar. 3) Colocar 1.0 μL de matriz y permitir secar. 4) Una vez seca la placa se procede a la lectura de espectros de masa. No olvidar colocar el BTS.

5.7.3. Montaje en el equipo

1. Verificar que el instrumento este encendido y tenga vacío (siempre debe estar encendido y con la platina dentro de la cámara de lectura).
2. Abrir los íconos de Flex Control y Maldi Biotyper RTC en el computador.
3. Abrir la cámara de la platina presionando el botón del icono abrir, en el Flex Control.
4. Esperar que el equipo saque la placa y que en la parte inferior de la pantalla diga OUT.
5. Abrir la tapa para sacar la placa del anterior montaje e ingresar la nueva placa, tape la cámara.
6. Presionar nuevamente el ícono de la pantalla para introducir la placa a la cámara de lectura.
7. Verificar que la placa está dentro de la cámara de lectura (IN) y que el instrumento tiene vacío, y está listo para calibrar. Ver pestaña de detalles, status, vaccum y debe tener tres círculos verdes.
8. Editar lista de trabajo del día: Abra el ícono Maldi Biotyper RTC. Abrir la hoja de programación. Identificar las muestras con sus respectivas posiciones en la placa. Seleccionar que el tipo de microorganismo que se quiere detectar en un hongo filamentoso en la pestaña de FILE.
9. El equipo estará listo para calibrar y leer las muestras. READY-IN.
10. A medida que se va leyendo cada pozo en el icono Maldi Biotyper RTC se obtienen de manera inmediata (menos de 15 minutos) resultados en tiempo real (Figura 4).
11. A cada muestra se le asignara una puntuación de acuerdo a la identificación (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de score para el espectro generado por una muestra e interpretación del resultado.

Valor	Descripción	Símbolo	Color
2.30 – 3.00	Alta probabilidad de identificación de la especie	(+++)	Verde
2.00 – 2.29	Identificación segura del género, identificación probable de la especie	(++)	Verde
1.70 – 1.99	Identificación probable del género	(+)	Amarillo
0.00 – 1.69	Identificación poco fiable	(-)	Rojo

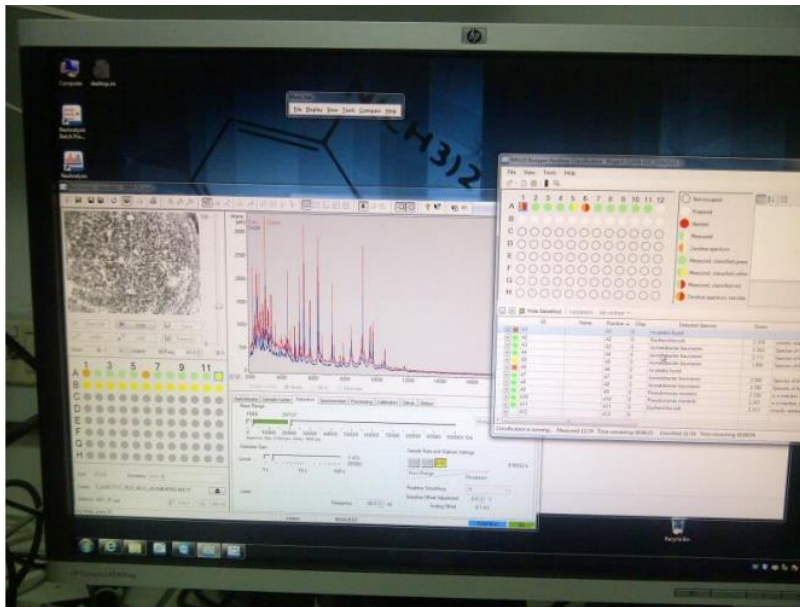


Figura 4. Lectura de emisión espectros y resultados (valor de score). En el lado izquierdo se puede apreciar los patrones de espectros generados por una muestra, mientras que en el lado derecho se puede observar los valores de score y la identificación de cada muestra, es importante mencionar que antes de cada lectura se debe de leer el control BTS para poder proseguir con la lectura de las muestras.

5.7.4. Análisis macro y microscópico

1. Realizar el análisis morfológico de la colonia dentro del gabinete de bioseguridad A2.
2. Para la observación de estructuras fúngicas hacer un frotis de la siguiente manera:
 - En un portaobjeto colocar una gota de azul de lactofenol.

- Tomar parte de la colonia joven con la cinta adhesiva (diurex). Colocar la cinta adhesiva sobre la gota de azul algodón de lactofenol e inmediatamente colocar un cubreobjetos sobre la cinta.

- Observar estructuras primero con el objetivo 5x primero y después con el objetivo 40x.

5.7.5. Análisis estadístico

Se graficaron y tabularon los resultados con el programa Excel, se realizó un análisis de frecuencia de las especies *Aspergillus spp.* identificadas y un análisis del valor de score obtenido, se tomó en cuenta un valor 2.0 de score como una identificación correcta del hongo (Tabla 1). Las variables a tomar en cuenta se encuentra en la tabla No. 2.

Tabla 2. Tabla de operacionalización de las variables.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional.	Unidad de medida
Tiempo	Cuantitativa continua	Periodo determinado durante el cual se desarrolla un acontecimiento o sucesión de estados por lo que pasa la materia	Tiempo que se requiere para el desarrollo de primeras estructura filamentosas (cultivo jóvenes)	Horas (H)
Especie de <i>Aspergillus spp.</i>	Cualitativa no dicotómica	Conjunto de organismos o poblaciones naturales capaces de entrecruzarse y producir descendencia fértil. Unidad básica de clasificación biológica.	<i>A. calidostus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. montevicensis</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. niger</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. sydowii</i> <i>A. terreus</i> <i>A. versicolor</i> No identificado	Presencia Ausencia
Sexo	Cualitativa nominal	Condición física que distingue hombre de mujer	Sexo	Mujer Hombre
Valor de score	Cuantitativa continua	Puntaje de identificación de un microorganismo por análisis con equipo MALDITOF	Valor de score determinado por el equipo BD® MALDI BIOTYPER	2.30-3.00 alta probabilidad de identificación 2.00-2.29 Identificación segura de género y

				probable identificación de especie
				1.70-1.99 Probable identificación de género
				< 1.69 Identificación poco fiable

6. Resultados

De las bitácoras de registro FR-LPM No. 34 y 54 del laboratorio de Parasitología y Micología se recabaron datos de pacientes con los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos. En la base de datos se registraron 42 muestras de las cuales 4 no se encontraron físicamente, quedando para trabajar 38 muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Recopilación de datos de las muestras de las cepas aisladas de *Aspergillus spp.*

No.	ID	Fecha	Edad	Genero	Servicio	Muestra	Diagnóstico
1	01018	14/01/2022	4a	F	Neumología	LBA	Sx supuración broncopulmonar
2	01030	25/01/2022	3a	F	Neumología	LBA	FQ
3	01035	26/01/2022	8a	M	Alergia	LBA	Ant. germinoma
4	02004	01/02/2022	14a	F	Neumología	LBA	LMA
5	03001	01/03/2022	2a	M	CE	LBA	Neuropatía axónica
6	26 DV	14/02/2022	12a	F	A. contingencia	ABA	COVID
7	03016	10/03/2022	12a	F	UTIP	LBA	LLA, Neumonía
8	03024	15/03/2022	5a	M	Oncología	LBA	LLA (Inf, fungica)
9	03032	16/03/2022	13a	F	UTIP	LBA	LLA Neumonía
10	03058	31/03/2022	11a	M	Neumología	LBA	FQ
11	04011	05/04/2022	15a	M	Neumología	LBA	FQ
12	04013	05/04/2022	16a	M	Neumología	LBA	Sx. Guillan Barre, Neumonía
13	04018	12/04/2022	10m	F	Neumología	LBA	FQ
14	04019	12/04/2022	14a	M	Neumología	LBA	EGC
15	04027	19/04/2022	15a	M	Neumología	LBA	Bronquectasias
16	05018	10/05/2022	8a	M	Neumología	LBA	Supuración broncopulmonar

17	05022	12/05/2022	15a	M	CE	LBA	Sospecha tuberculosis
18	05032	17/05/2022	1a	F	Neumología	LBA	Error inhato de la inmunidad Neumopatía
19	05036	19/05/2022	16a	M	Neumología	LBA	FQ
20	05036	19/05/2022	16a	M	Neumología	LBA	FQ
21	06019	08/06/2022	10a	F	Urgencias	LBA	Inf. fúngica
22	06042	20/06/2022	12a	M	Neumología	LBA	FQ
23	06050	21/06/2022	15a	M	Infectología	LBA	TB + Arpergilosis
24	06054	23/06/2022	14a	M	Neumología	LBA	Bronquiectasias FQ
25	07032	19/02/2022	13a	M	Neumología	LBA	LES Lesiones pulmonares
26	07046	29/07/2022	9a	F	Neumología	LBA	FQ
27	07046	29/07/2022	9a	F	Neumología	LBA	FQ
28	08006	05/08/2022	7a	M	Neumología	LBA	Protocolo pretransplante
29	10033	13/08/2022	8a	F	Neumología	LBA	FQ
30	10034	13/10/2022	1a	M	Neumología	LBA	Neumonía
31	10039	17/10/2022	4m	F	UTIP	Asp. traqueal	FQ
32	10042	18/10/2022	4m	F	Neumología	LBA	FQ
33	10047	19/10/2022	4m	F	UTIP	Aspirado	FQ
34	11004	04/11/2022	7m	M	Neumonología	LBA	Inmunodeficiencia combinada
35	11010	08/11/2022	1a	M	CE	LBA	FQ
36	11015	10/11/2022	15a	M	Neumología	LBA	Neumonectomía
37	11023	15/11/2022	7a	F	Hematología	LBA	FQ
38	11029	16/11/2022	15a	M	Neumología	LBA	Bronquiectasias No FQ
39	11045	29/11/2022	7a	F	Neumología	LBA	Inmunodeficiencia
40	11047	30/11/2022	4m	M	Infectología	Asp. traqueal	Neumonía
41	12003	01/12/2022	4m	M	Infectología	Asp. traqueal	Control
42	12014	02/12/2022	6a	F	Cardiología	LBA	Neumopatía crónica

Cabe mencionar que se encontraron en la base 42 muestras, sin embargo se excluyeron 4 (color amarillo) debido a que no se encontraron físicamente o que se encontraron contaminadas. Lavado broncoalveolar = LBA, Fistula Quística = FQ, Leucemia mieloblástica aguda = LMA, Leucemia linfoblástica aguda = LLA, Enfermedad granulomatosa crónica = EGC, Consulta externa = CE, Unidad de terapia intensiva = UTIP.

Las 38 cepas elegidas fueron cultivadas y una vez que se observaron las primeras estructuras (24-48 horas) filamentosas se procedió a la identificación por espectrometría de masas, obteniendo sus respectivos valores de score (Figura 4). Estas mismas cepas se siguieron incubando para que puedan seguir creciendo y una vez que se observaron colonias mejor definidas (mayor a 72 horas) se realizó

un análisis morfológico (Tabla 5). Por otra parte, también se realizó un análisis de frecuencias de las especies de *Aspergillus spp.* aislados (Figura 5) y un análisis de valores de score (Tabla 7).


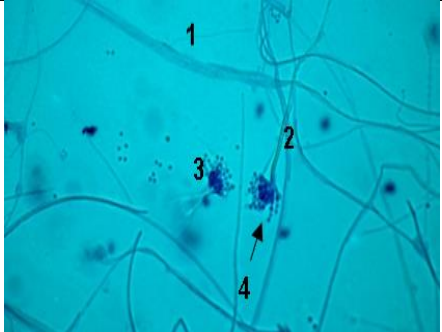
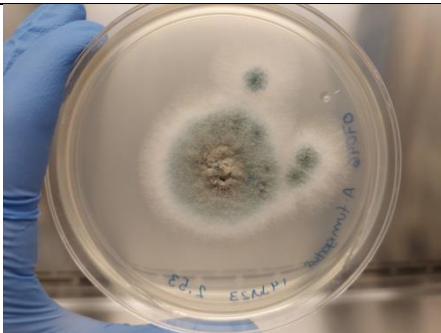
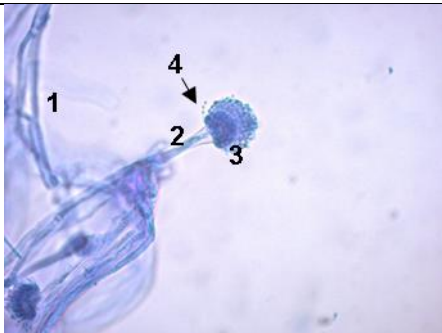

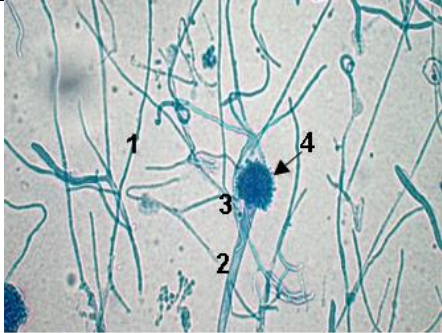
Tabla 4. Resultados del análisis por espectrometría de masas.


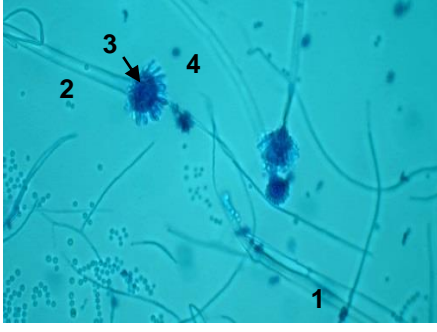

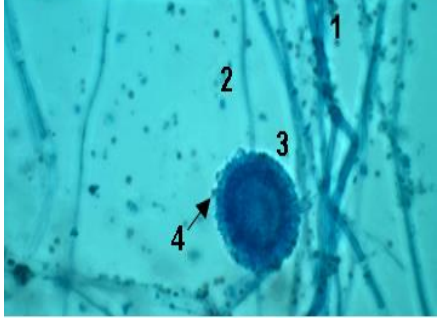

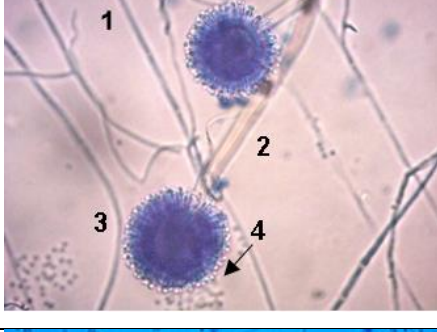
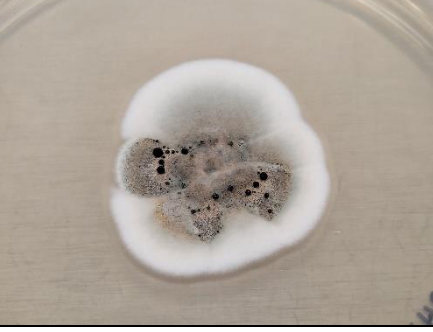
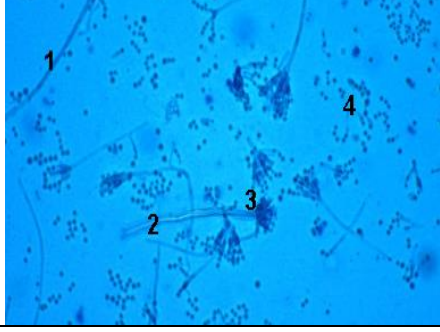
No.	Examen directo de la muestra	ID. por MALDI TOF-MS del aislado del cultivo	Score
1	Negativo	<i>A. calidostus</i>	2.06
2	Negativo	<i>A. niger</i>	2.28
3	Hifas hialinas septadas	<i>No identificado</i>	-
4	Negativo	<i>A. versicolor</i>	2.11
5	Negativo	<i>A. versicolor</i>	2.05
6	NR	<i>A. fumigatus</i>	2.36
7	Negativo	<i>A. fumigatus</i>	2.43
8	Hifas hialinas dicotómicas septadas	-	-
9	Hifas hialinas dicotómicas septadas y macrosifonadas	-	-
10	Hifas hialinas tabicadas	<i>A. fumigatus</i>	2.42
11	Negativo	<i>A. terreus</i>	1.82
12	NR	<i>A. fumigatus</i>	2.45
13	Negativo	<i>A. fumigatus</i>	2.44
14	Negativo	<i>A. fumigatus</i>	2.45
15	Negativo	<i>A. montevicensis</i>	1.78
16	Negativo	<i>A. sydowii</i>	2.16
17	Negativo	<i>A. nidulans</i>	2.14
18	Negativo	<i>A. niger</i>	2.13
19	Hifas hialinas dicotómicas septadas	<i>A. niger</i>	2.24
20	Hifas hialinas dicotómicas septadas	<i>A. fumigatus</i>	2.41
21	NR	<i>A. niger</i>	2.23
22	Abundantes hifas hialinas dicotómicas septadas y macrosifonadas	<i>A. fumigatus</i>	2.41
23	NR	<i>A. fumigatus</i>	2.53
24	Negativo	<i>A. niger</i>	2.10
25	Negativo	<i>A. versicolor</i>	2.03
26	Negativo	<i>A. fumigatus</i>	2.53
27	Negativo	<i>A. ochraceus</i>	2.42
28	Hifas hialinas dicotómicas sept y macros	<i>A. fumigatus</i>	2.40
29	Abundantes hifas hialinas dicotómicas, sept	<i>A. fumigatus</i>	2.36
30	NR	<i>A. fumigatus</i>	2.49
31	Aundantes hifas hialinas, sept, dicotómicas y macro	<i>A. terreus</i>	1.91
32	Hifas hialinas, septadas y dicotómicas	<i>A. terreus</i>	2.00
33	Hifas hialinas, septadas y dicotómicas	<i>A. terreus</i>	1.77

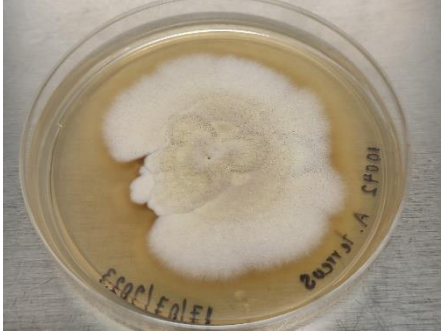
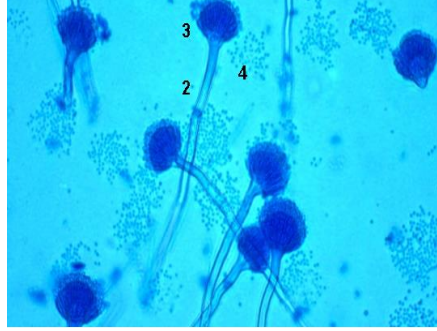


34	Negativo	<i>A. versicolor</i>	2.02
35	Negativo	-	-
36	Negativo	<i>A. fumigatus</i>	2.33
37	Negativo	<i>A. fumigatus</i>	2.31
38	Negativo	<i>A. ochraceus</i>	2.01
39	Negativo	-	-
40	Negativo	<i>A. sydowii</i>	2.22
41	Negativo	<i>A. versicolor</i>	2.04
42	NR	<i>A. ochraceus</i>	2.40

Resultados del análisis por espectrometría de masas con sus respectivos valores de score, también se puede observar el resultado de análisis directo de la muestra por microscopia, resaltando en algunos casos que, aunque el análisis directo de la muestra haya sido negativo, en el cultivo se pudo obtener un aislado, el cual fue posible analizar por MALDI-TOF MS. No se hallaron 4 muestras (color amarillo) por lo que solo se trabaron 38. NR = no realizado.

Tabla 5. Morfología macroscópica (colonial) y microscópica de los aislados de *Aspergillus spp.*

<i>Aspergillus spp.</i>	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
<p><i>A. calidostus</i> Macro: Textura aterciopelada, blancas que cambian a un color ligeramente café. Micro: 1) micelio largo 2) conidióforos curvados 3) vesícula semiesférica con fiálides en ángulo menor a 180° 4) conidios equinados y puede haber la presencia de células de Hülle.</p>		
<p><i>A. fumigatus</i> Macro: Crecimiento rápido, plana y aterciopelada. Color verde con halo blanco y con el tiempo cambia a gris oscuro. Micro: 1) micelio macrosifonado hialino y septado 2) conidióforo corto 3) fiálides que en 180° 4) Conidios redondos 2.5-3.0 µm.</p>		
<p><i>A. montevidensis</i> Macro: Crecimiento lento, aterciopelado, blanco amarillento que puede cambiar a café. Micro: 1) micelio largo 2) conidióforo largo 3) vesícula esférica con fiálides en 180° 4) conidios esféricos.</p>		

<p>A. nidulans Macro: Crecimiento rápido, aterciopelada, seca, color amarillo o verde-amarillento, halo blanco y al reverso presentan color rojo, café o púrpura. Micro: 1) micelio macrosifonado hialino, y septado 2) conidióforos cortos 3) vesículas redondas 4) fiálides uniseriadas y biseriadas dispuestas en 140-180°.</p>		
<p>A. niger Macro: Crecimiento rápido, textura algodonosa, color blanco-amarillento con abundantes puntos negros, al reverso color blanco o crema. Micro: 1) micelio macrosifonado, septado, hialino, 2) conidióforo largo hasta 3mm 3) cabeza aspergilar esférica (25 a 100 µm) y dos series de fiálides en 360°, 4) Conidios redondos, equinulados y negros.</p>		
<p>A. ochraceus Macro: Crecimiento rápido, aspecto polvoriento de color amarillo, el color puede ser de color blanco a marrón. Micro: 1) conidióforos largo de color marrón 2) vesícula esférica con biseriadas 3) fiálides lisas o ligeramente rugosas 4) conidios esféricos</p>		
<p>A. sydowii Macro: Aspecto aterciopelado, azul verdoso con tonos marrón rojizo y un halo blanco. Micro: 1) micelio largo 2) conidióforos largos hialinos 3) vesículas esféricas biseriadas 4) conidios puntiagudos</p>		

<p>A. terreus Macro: Crecimiento rápido (3d), granular o pulverulenta, color blanco que cambia a café y reverso café-amarillento. Micro: 1) micelio macrosifonado, tabicado e hialino 2) conioforos largos 3) vesículas subesféricas biseriadas, con fialides en 180° 4) conidios esféricos 2.0-2.5 µm.</p>		
<p>A. versicolor Macro: Crecimiento rápido (3d), al comienzo son amarillo verdosas, después se tornan rosa pálido o café, aterciopeladas y presentan pliegues. Micro: 1) micelio macrosifonado, hialino y tabicado 2) conidióforos largos y cenocíticos 3) vesículas sub esféricas con dos series de fialides en ángulo menor a 180° 4) conidios de 2 a 3 µm.</p>		

En esta tabla se pueden observar las características macroscópicas y microscópicas de las 9 especies *Aspergillus spp.* que se lograron identificar por espectrometría de masas, la tinción utilizada fue azul de lactofenol y se observaron con el objetivo 40x, el medio utilizado para el crecimiento fue agar dextrosa Sabouraud.

Tabla 6. Valores de score obtenidos.

Valor de score obtenido	
2.30-3.00 (17)	44.7%
2.00-2.29 (17)	44.7%
1.70-1.99 (3)	7.9%
0.00-1.69 (1)	2.6%
PROMEDIO	2.22
DESV. ST	0.22
VARIANZA	0.05
COEF VAR	0.1

En esta tabla se puede observar que más del 89% de las muestras se pudieron identificar de forma confiable hasta género y especie.

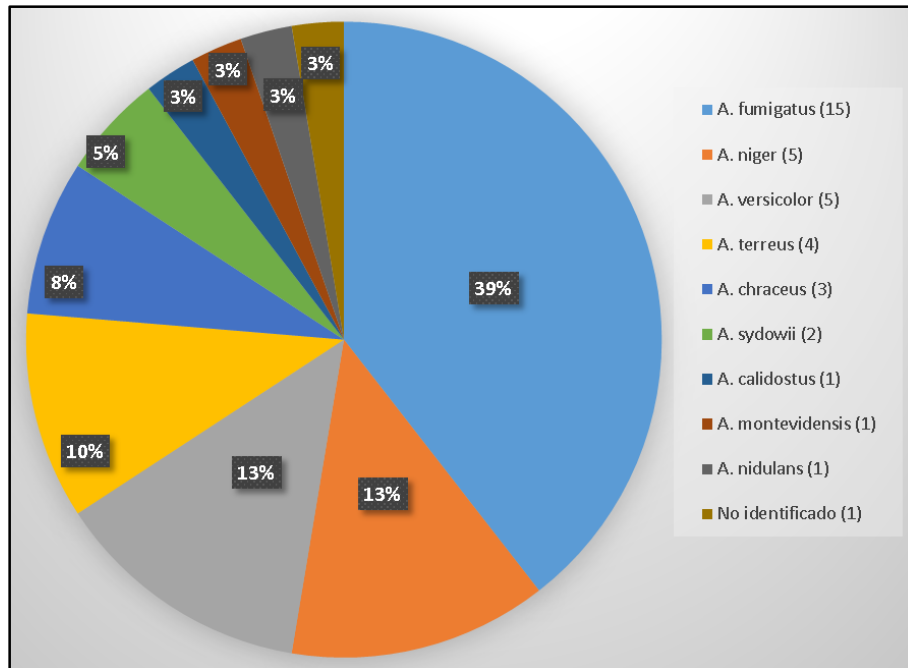


Figura 5. Especies y frecuencia de *Aspergillus spp.* identificadas. *A. fumigatus* fue la especie más aislada acorde a lo que se documenta en la literatura, resalta que no se aisló *A. flavus* como se esperaba que fuera el segundo más frecuente.

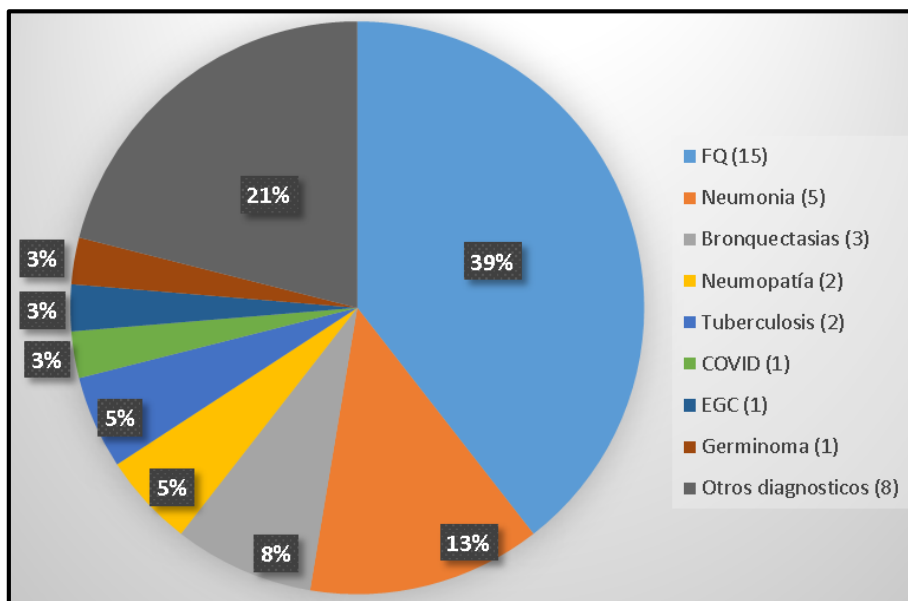


Figura 6. Frecuencia de diagnósticos asociados al aislamiento de *Aspergillus spp.*

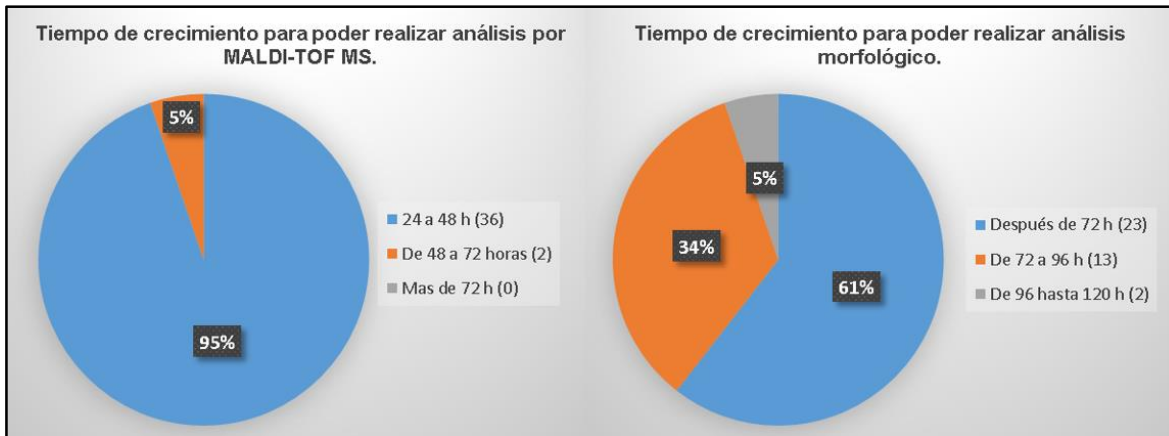


Figura 7. Tiempo de crecimiento para poder realizar un análisis por espectrometría de masas vs. tiempo de requerido para poder realizar un análisis morfológico.

7. Discusión de resultados

En primer lugar, en la tabla 4 podemos observar que el 97.3% (37) de las 38 muestras se lograron identificar de forma confiable hasta género y especie, resaltando que, aunque en el examen directo de las muestras no se encontraron hallazgos de estructuras aspergiliares, en el cultivo se logró obtener un aislado, el cual pudo identificarse por MALDI TOF-MS, en esta misma tabla se puede observar que no se pudo identificar un aislado, esto creemos se debe a que a pesar de que la técnica de MALDI-TOF MS es muy confiable, aún requiere ampliar su biblioteca de espectros como lo señala Siller-Ruiz et al (2017).

Respecto al análisis morfológico de los aislados (Tabla 5), se encontró que todas las muestras analizadas coinciden con los resultados del análisis por MALDI-TOF MS, sin embargo, debemos recalcar sin ayuda de un experto microbiólogo esto no hubiera sido posible, y aquí resaltamos una ventaja de la espectrometría de masas respecto a la microscopia pues existen especies de *Aspergillus spp.* pertenecientes a una misma sección como lo indica Alanio et al. (2021) lo que involucra que son morfológicamente cercanas y se requiere un buen entrenamiento en morfología y aun así puede haber identificaciones erróneas.

De los 38 aislados analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF se encontró que el 89.4 % se logró identificar de forma segura hasta género y especie con un valor de score >2.0, otros 3 aislados obtuvieron un valor de entre 1.70 – 1.99

aun así el equipo logra su identificación hasta género y especie, y por ultimo solo una muestra no se logró identificar y de hecho no se logró obtener un valor de score (Tabla 6).

En cuanto a la frecuencia de las especies de *Aspergillus spp.* aisladas (Figura 5) se observó que *A. fumigatus* es la especie más común como lo indica la mayoría en sus trabajos como Wang et al. (2022), sin embargo, se esperaba que *A. flavus* se encontrara en segundo lugar y en este trabajo la frecuencia fue de 0%, por ultimo *A. niger* obtuvo el segundo lugar en cuanto a frecuencia lo que igualmente coincide con la mayoría de los reportes al ser una de las tres más comunes especies de *Aspergillus spp.* Destacamos en este punto que, aunque que se considera un pequeño grupo de *Aspergillus spp.* (aproximadamente 6) como los causantes principales de AI como reporta Alanio et al. (2021), aislamos otras especies no comunes que por técnicas convencionales pueden pasar desapercibidas. Aquí destaca otra ventaja de la técnica de MALDI-TOF MS la cual es la identificación de género y hasta de especie algo que no es posible con otras técnicas que solo detectan el género como la detección de galactomanano o algunas que solo se limitan a la detección de un número limitado de especies de *Aspergillus spp.* como es el caso de la RT-PCR.

Es importante mencionar que se trabajó con proteínas de cultivos jóvenes (24-48 h) para la identificación por MALDI-TOF MS debido a que los espectros de la biblioteca se realizaron con proteínas de cultivos jóvenes lo que implica que si trabajamos con cultivos viejo podemos obtener resultados erróneos como lo indica Siller-Ruiz et al. (2017), de hecho en este trabajo se sugiere estandarizar los tiempo de lectura para MALDI-TOF MS y ampliar los perfiles proteicos en función de la antigüedad de los cultivos.

Resaltamos en este trabajo, el uso de la técnica corta de extracción con ácido fórmico el cual acortó los tiempos de procesamiento y respuesta de aproximadamente 5 días a 48 horas e incluso 24 h, en nuestra búsqueda bibliográfica no se encontró que algún otro Instituto que esté trabajando con esta misma técnica, salvo el trabajo de Montelongo (2015) titulado "Identificación y

tipificación de levaduras de importancia médica, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF”, realizado en la Facultad de Química de UNAM, en el cual declara haber trabajado solo con hongos levaduriformes.

Por otra parte, es evidente que se acortaron los tiempos de obtención de resultados utilizando la técnica de espectrometría de masas respecto a la microscopia (Figura 7), es importante destacar que esto no hubiera sido posible si no hubiéramos utilizado la técnica corta de extracción.

Por último, en cuanto a los diagnósticos más comunes asociados a infecciones por *Aspergillus spp.* se encontró que estos son en su mayoría afecciones a vías respiratorias inferiores como se esperaba (Figura 5).

8. Conclusiones

Con los valores de score obtenidos > 2.00 en el 89.4% de los aislados, con un promedio de 2.22 indicando una identificación segura de género y especie en el 97.3% de los aislados, y un 97.3% de concordancia entre el análisis morfológico y el resultado del análisis por MALDI-TOF MS de los aislados. Determinamos que la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF resulta ser una herramienta diagnóstica rápida y confiable en la identificación de hongos filamentosos del género *Aspergillus spp.*, lo que no se podría si solo utilizamos técnicas convencionales como la microscopía debido a la dificultad que representa trabajar con *Aspergillus spp.* morfológicamente cercanos y al tiempo que requieren de crecimiento para que las estructuras aspergílicas se puedan diferenciar completamente.

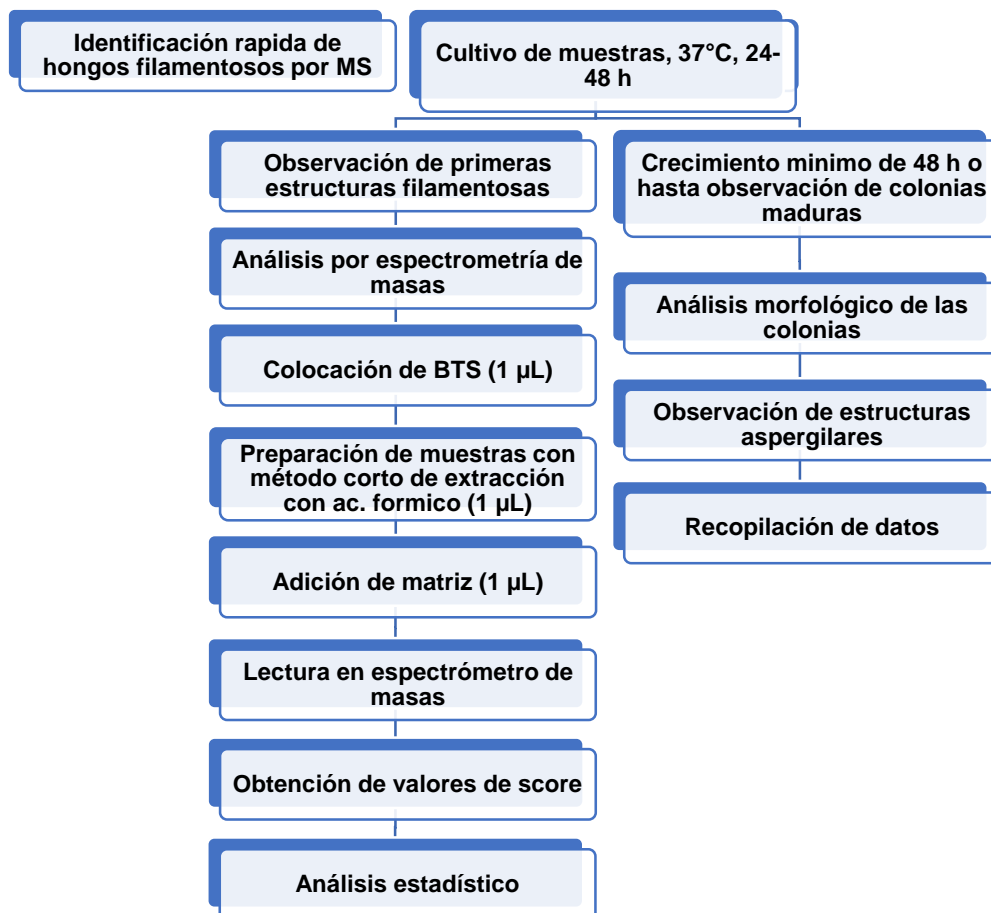
Se logró que los tiempos para la identificación se acortaran gracias a que se trabajaron con cultivos jóvenes y que se echó mano de la extracción corta con ácido fórmico, sin embargo es importante hacer grupos de trabajo para que se puedan estandarizar estos tiempos de lectura ya que se ha documentado que cultivos viejos pueden afectar los resultados., e incluso se ha considerado la ampliación de perfiles proteicos en función de la edad de los cultivos. En cuanto a la muestra no identificada es evidente que la biblioteca de espectros se debe de ampliar poco a poco.

Por otra parte, resaltamos la importancia de tener a la mano técnicas que ayuden a la identificación hasta género y especie, lo que contribuye a tomar decisiones clínicas oportunas y tratamientos mejor dirigidos, algo que no sería posible utilizando otras técnicas convencionales las cuales solo ayudan a identificar género o que se limitan a identificar solo un pequeño grupo de estas.

Por otra parte, este trabajo no tiene la intención de menospreciar el trabajo del microbiólogo sino de contribuir en la búsqueda de herramientas de apoyo que faciliten el flujo de trabajo en el laboratorio.

9. Anexos.

9.1. Flujo de trabajo para identificación de hongos filamentosos por espectrometría de masas.



10. Bibliografía

- Alanio, A., Beretti, J. L., Dauphin, B., Mellado, E., Quesne, G., Lacroix, C., Amara, A., Berche, P., Nassif, X., Bournoux, M.-E. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 17, Issue 5, Pages 750-755, ISSN 1198-743X, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03323.x>.
- Alastruey-Izquierdo, A., Cadranet, J., Flick H., Godet, C., Hennequin, C., Hoenigl, M. (2018). Treatment of chronic pulmonary Aspergillosis: Current standards and future perspectives. *Respiración*; 96:159–70. <https://doi.org/10.1159/000489474>.
- Agarwal, R., Chakrabarti, A., Shah, A., Gupta, D., Meis, J. F., Guleria, R., Moss, R., Denning, D. W. (2013). ABPA complicating asthma ISHAM working group. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013 Aug;43(8):850-73. doi: 10.1111/cea.12141. PMID: 23889240.
- Bedoya, V. (2020) Immunochromatography and galactomannan as unconventional tests for the search for invasive aspergillosis. A theoretical review. Pontificia Universidad de Javeriana. Bogotá D.C. Colombia 2020.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2021). Aspergillosis. CDC: Fungal diseases.
- Chakraborty, R. K., Baradhi, K. M. (2022). Aspergilloma. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 31536274.
- Charles, M. P., Noyal, M. J., Easow, J. M. (2011). Invasive pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus versicolor* in a patient on mechanical ventilation. *Australas Med J*. 2011;4(11):632-4. doi: 10.4066/AMJ.2011.905. Epub 2011 Nov 30. PMID: 23386878; PMCID: PMC3562921.
- García, J., Pemán, J. (2018) Microbiological diagnosis of invasive mycosis. *Revista iberoamericana de micología*. 10.1016/j.riam.2018.05.003.
- Howard, S. J., Arendrup, M. C. (2011). Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol*. 2011 Apr;49 Suppl 1:S90-5. doi: 10.3109/13693786.2010.508469. Epub 2010 Aug 26. PMID: 20795765.
- Instituto nacional de Seguridad y salud en el Trabajo (INSST) (2021). *Aspergillus spp.* INSST: Hongos. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/aspergillus-spp>

- Kanaujia, R., Singh, S., Rudramurthy, S. M. (2023). Aspergillosis: an Update on Clinical Spectrum, Diagnostic Schemes, and Management. *Curr Fungal Infect Rep.* 2023 May 4:1-12. doi: 10.1007/s12281-023-00461-5. Epub ahead of print. PMID: 37360858; PMCID: PMC10157594.
- Lass-Flörl, C. (2018). Treatment of infections due to *Aspergillus terreus* species complex. *Journal of fungi.* 2018; 4(3):83. Doi: 10.3390/jof4030083.
- Leeflang, M. M., Debets-Ossenkopp, Y. J., Wang, J., Visser, C. E., Scholten, R.J., Hoof, L., Bijlmer, H. A., Reitsma, J. B., Zhang, M., Bossuyt, P. M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. (2015). Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Dec 30;2015(12):CD007394. doi: 10.1002/14651858.CD007394.pub2. PMID: 26716951; PMCID: PMC6483812.
- Merad, Y., Derrar, H., Belmokhtar, Z., Belkacemi, M. (2021). *Aspergillus* genus and its various human superficial and cutaneous features. *Pathogens.* 2021; 10(6):643. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060643>.
- Patel, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis.* 2013 Aug;57(4):564-72. doi: 10.1093/cid/cit247. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23595835.
- Rybak, J. M., Ge, W., Wiederhold, N. P., Parker, J. E., Kelly, S. L., Rogers, P. D., Fortwendel, J. R. (2019). Mutations in *hmg1*, Challenging the Paradigm of Clinical Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *mBio.* 2019 Apr 2;10(2):e00437-19. doi: 10.1128/mBio.00437-19. PMID: 30940706; PMCID: PMC6445940.
- Rudramurthy, S. M., Paul, R. A., Chakrabarti, A., Mouton, J. W., Meis, J. F. (2019) Invasive Aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, Diagnosis, Antifungal Resistance, and Management. *J Fungi (Basel).* 2019 Jul 1;5(3):55. doi: 10.3390/jof5030055. PMID: 31266196; PMCID: PMC6787648.
- Rudramurthy, S., Singh, G., Hallur, V., Verma, S., Chakrabarti, A. (2016). High fungal spore burden with predominance of aspergillus in hospital air of a tertiary care hospital in Chandigarh. *Microbiol indio J Med.* 2016;34:529–32.
- Siller-Ruiza, M., Hernández-Egidoa, S., Sánchez-Juanesa, F., González-Buitrago, J. M., Muñoz-Bellido, J. L. (2017). Fast methods of fungal and bacterial identification. MALDI-TOF mass spectrometry, chromogenic media. *Clin Infect Dis* Vol. 35. Issue 5. pages 303-313 (May 2017) 10.1016/j.eimce.2017.03.016.

- Sugui, J. A., Peterson, S. W., Clark, L. P., Nardone, G., Folio, L., Riedlinger, G., Zerbe, C. S., Shea, Y., Henderson, C. M., Zelazny, A. M., Holland, S. M., Kwon-Chung, K. J. (2012). *Aspergillus tanneri* sp. nov., a new pathogen that causes invasive disease refractory to antifungal therapy. *J Clin Microbiol.* 2012 Oct;50(10):3309-17. doi: 10.1128/JCM.01509-12. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22855513; PMCID: PMC3457449.
- Thompson, G. R., Young, J. H. (2021). *Aspergillus* Infections. *N Engl J Med.* 2021 Oct 14;385(16):1496-1509. doi: 10.1056/NEJMra2027424. PMID: 34644473.
- Van de Veerdonk, F. L., Gresnigt, M. S., Romani, L., Netea, M. G., Latgé, J. P. (2017). *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2017 Nov;15(11):661-674. doi: 10.1038/nrmicro.2017.90. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28919635.
- Wang, Y., Zhang, L., Zhou, L., Zhang, M., Xu, Y. (2022). Epidemiology, Drug Susceptibility, and Clinical Risk Factors in Patients With Invasive Aspergillosis. *Front Public Health.* 2022 Apr 15;10:835092. doi: 10.3389/fpubh.2022.835092. PMID: 35493371; PMCID: PMC9051236.
- Montelongo, M. L. F. (2015). Identification and typing of yeasts of medical importance, using mass spectrometry MALDI-TOF. Facultad de química. UNAM. 2015.
- Zarrin, M., Faramarzi, S. (2018). Study of Azole - Resistant and *Cyp51a* Gene in *Aspergillus Fumigatus*. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018 Apr 25;6(5):747-750. doi: 10.3889/oamjms.2018.171. PMID: 29875840; PMCID: PMC5985858.
- Zhou, W., Li, H., Zhang, Y., Huang, M., He, Q., Li, P., Zhang, F., Shi, Y., Su, X. (2017). Diagnostic Value of Galactomannan Antigen Test in Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Patients with Nonneutropenic Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2017 Jul;55(7):2153-2161. doi: 10.1128/JCM.00345-17. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28446576; PMCID: PMC5483917.