# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

# Determinación del desempeño de las bibliotecas FFLv4.0 y MSI2 en la identificación, por MALDI TOF (Bruker), de *Aspergillus* spp

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Q U Í M I C A F A R M A C É U T I C A B I Ó L O G A**

P R E S E N T A :

**L I Z E T H M O R A L E S CA M I L O**

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Rosa Areli Martínez Gamboa

ASESORES

Q.F.B. Patricia Vidal Millán

Q.F.B. Pablo Juárez de los Santos

Q.F.B. Gildardo Herrera Quiroz

Q.F.B. María del Pilar Cedillo Martínez

**Ciudad de México, enero 2025**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**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.

## AGRADECIMIENTOS

Sin duda alguna este largo camino ha sido de grandes retos y en cada una de las etapas recorridas se debe reconocer el gran apoyo que he recibido de tantas personas e instituciones que fueron grandes pilares para poder alcanzar esta meta que por un largo tiempo se veía tan lejana y que hoy finalmente puede sentirse casi real.

Amada Universidad Nacional Autónoma de México, adorada Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, gracias por darme tanto, desde una oportunidad de estudiar en cada una de tus aulas, encontrar grandes amistades, tener maravillosas experiencias, hasta por fin otorgarme la oportunidad de ser Licenciada en Químico Farmacéutico Biólogo. No cabe duda, es un gran orgullo egresar de esta máxima casa de estudios el cual llevaré el resto de la vida. La universidad fue tan maravillosa me permitió formarme y salir al mundo a compartir un poco de lo mucho que aprendí y la vez darme cuenta de que nunca es suficiente y siempre se necesita conocer más. Mientras fui estudiante aún recuerdo a mis profesores dando clase y recalcando que: *"eso sería importante para la vida profesional; indispensable para ayudar a un paciente, etc.,"*, y ¡cuánta razón tenían!

Agradezco a todos mis profesores de esta gran casa de estudios con los que pude tener la dicha de tomar clases, de tener pláticas y compartir dudas, agradezco su dedicación por esta hermosa carrera que el día de hoy me apasiona tanto y me hace tan feliz disfrutando cada etapa y experiencia vivida, algunos de ustedes dejaron palabras de aliento que fueron significativas en mi formación y que hoy en día las recuerdo con mucho cariño, poniendo el nombre de esta hermosa carrera en alto, sea donde sea siempre destaca un Zaragozano. Profesor Gildardo Herrera Quiroz, profesora Pilar Cedillo Martínez agradezco sus enseñanzas durante el área terminal de la carrera, tener profesionales con tanta experiencia laboral nos permite conocer un poco de lo mucho que podemos hacer, son un gran ejemplo de profesionistas, dedicando su tiempo a formar alumnos competentes, gracias por sus enseñanzas y experiencias compartidas, fueron una parte importante para buscar el área que me apasionara tanto, como a ustedes cuando impartían clases. Gracias por su tiempo y apoyo para poder llevar a cabo mi proyecto atesoro mucho sus comentarios y llevo conmigo todas sus enseñanzas.

Profesor Pablo Juárez de los Santos, gracias por alguna vez decirme una frase que nunca voy a olvidar y ¡vaya! que la llevo conmigo día a día cuando estoy en mis áreas de trabajo: *"eres demasiado observadora"*, recuerdo que en ese momento me dio felicidad porque pude completar mi reporte. Sin embargo, esa frase me permitió analizar que muchas de las cosas que hacemos como profesionistas puede ser resuelta si tan sólo te tomas el tiempo de observar, gracias por en algún momento darme confianza en el laboratorio, por compartirme algunas de sus experiencias laborales que en ese momento eran como un sueño para mi poder llegar a realizar y que hoy en día puedo hacer y que felicidad le da a uno saber que hace las cosas bien, ¡gracias por todo!

Profesora Patricia Vidal Millán usted es una de las personas que más admiro en este mundo siempre llena de amor por sus clases, por tener tanta ambición por preparar profesionales competentes llenos de curiosidad por saber más, por comerse el mundo y nunca conformarse con los pocos o muchos conocimientos aprendidos, siempre habrá algo nuevo de saber, algo que mejorar y sobre todo algún conocimiento que compartir para ser siempre ¡EXCELENTES!, muchas gracias por todas sus palabras que aunque parecieran al principio solo son palabras me acompañan muchos de los días en donde me enfrento a aplicar mis conocimientos, muchas son frases que llevaré y recordaré por siempre el resto de la vida y qué maravilloso encontrar colegas en las mejores Instituciones de México que compartan conmigo que es una de las mejores profesoras que puede haber, de verdad que es un orgullo de la FES Zaragoza tener a profesionales como usted. Gracias por permitirme aprender un poco de los tantos conocimientos que la acompañan por siempre responder un mensaje con alegría, por motivarme a hacer mi examen profesional, usted que me abrió la mentalidad de salir a conocer el mundo, es la mejor recomendación que puede recibir un estudiante, gracias a eso estoy ahora trabajando en áreas completamente apasionantes y por muchas cosas más… ¡Infinitas gracias!

Quiero agradecer de manera muy especial al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por darme la oportunidad de ingresar a tan magnífica sede de aprendizaje que me llevó a conocer tantas áreas y que hoy en día tengo la fortuna de poder trabajar en sus instalaciones, me ha permitido observar de cerca que es la excelencia y también me ha dado grandes ejemplos a seguir, sin duda es un gran orgullo pertenecer.

Doctora Rosa Areli Martínez Gamboa usted es y ha sido una de las mejores personas que he conocido en este mundo laboral, no solo por la paciencia que tiene con los que tuvimos la fortuna de ser sus alumnos si no por la entrega que tiene en amar lo que hace, debo decirlo que sin su ayuda, sus consejos, sus enseñanzas, la sabiduría que tiene para poder entender y escuchar, nada de esto sería posible, y que gran fortuna poder trabajar con usted en tan maravillosa Institución, gracias por darme la oportunidad de conocer la importancia de la Micología, espero que la vida y Dios nos permita continuar por mucho tiempo en este camino porque nunca me cansaré de admirar su trayectoria y toda la dedicación tiene por sus alumnos. Palabras me faltarán para expresarle mi gratitud por el extenso apoyo que siempre he recibido de su parte, por ser una gran asesora y profesionista, de verdad de todo corazón muchas gracias por todo.

Sin duda también me ha dejado grandes amistades que me han acompañado en este largo trayecto lleno de retos y complicaciones, amigos, ustedes que han sido testigos de todas las veces que casi me rindo de cansancio, de malestares de salud y han estado ahí para reconfortarme, darme algo para el malestar, pero que también han estado para festejar cuando algo lo amerita, debo darles las gracias porque todo eso se va quedando guardado en el corazón y crean momentos tan especiales que los atesoro mucho, por ahora tengo la fortuna de tenerlos a mi lado pero si algún

día nuestros caminos laborales llegarán a ser diferentes quiero que sepan que son y fueron una parte importante en esta etapa de mi vida que, ¡claramente fue larga!, Angélica Nava Linares, Bruno Alejandro Díaz Mejía, Nancy Fabiola Sánchez Martínez, María de la Luz Morales Ortega, gracias por recibirme en este bello departamento que muy pocos conocen pero que hacen un gran trabajo del cual yo he aprendido muchísimo y que espero que sea por muchos años más, gracias por ser amigos, compañeros, cómplices, por darme alegrías, conocimientos y mucho trabajo, por confiar en mí a lo largo de estos años y también por ser excelentes profesores de vida, no tengan duda que cada una de sus palabras y conocimientos los llevaré conmigo por siempre.

Paulette Guadalupe Díaz Lomelí y Axel Cervantes Sánchez, ustedes que frecuentemente me presionaban a dejar de tener este pendiente gracias porque cada palabra y consejo fueron escuchados y atesorados, sin duda cuando los conocí ambos me brindaron una gran admiración y un ejemplo a seguir porque son magníficos profesores, gracias por todos sus conocimientos compartidos esperemos que sea por mucho tiempo.

Al Instituto de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas gracias por adoptarme cuando recién egresaba de la carrera, por darme tantos años un trabajo tan noble y bello como lo es el laboratorio clínico, por permitirme conocer a personas maravillosas que a lo largo de los años se han convertido en amistades y me han acompañado en este proceso, todos y cada uno de ustedes de alguna manera me brindaron apoyo, cariño, felicidad en los momentos difíciles y motivación con palabras o acciones que me aportaron fortaleza para nunca rendirme de este sueño: Enrique Machorro Martínez, Alain Cortés Palma, Luis Fernando Perea Mora, Juan Carlos Corona Alcántara Juana Gabriela Maldonado Muñiz, amigos gracias por estar presente en mi vida, el Instituto nos dio la fortuna de cruzarnos en este camino; el tiempo que he estado con ustedes ha sido muy reconfortante y claro que debo estar agradecida con la bella amistad que tenemos, espero que esta magnífica coincidencia laboral sea más que eso y podamos seguir compartiendo muchos años esta bella profesión. Los quiero mucho, gracias por ser un gran apoyo.

Y gracias a todas aquellas personas que se han cruzado en mi camino y que de una u otra manera han estado en este proceso

# *DEDICATORIA*

## *A mis padres Raúl Morales Silva y Silvia Camilo Emiliano*

*Padres míos agradezco que estén conmigo hoy y que sean testigos que sí se pudo, que pudieron culminar junto conmigo esta gran etapa, les dedico cada palabra aquí escrita, gracias por ser incondicionales, por ser un gran apoyo emocional, por confiar tanto en mí, por levantarme cuando ni yo misma pensé que podría hacer muchas cosas, gracias por nunca soltarme y por acompañarme hasta el día de hoy en cada logro que es suyo, espero que Dios me permita estar con ustedes muchos años más para seguir celebrando logros juntos. Sus esfuerzos, consejos y su amor finalmente están rindiendo frutos, les dedico este pequeño logro porque nada de esto sería posible sin ustedes a mi lado.*

*Papá, mamá la vida no me alcanzará para agradecer y retribuir lo mucho que dieron e hicieron por mí, los amo infinitamente, gracias por estar, hoy y siempre.*

## *A mi familia…*

*Hermanos, Jonathan y Mariana, gracias por ser esos cómplices menores pero que aportan grandes consejos y ejemplos de vida, evidentemente ser la hermana mayor es de grandes retos pero ustedes a su corta edad me han demostrado que la constancia y esfuerzo son primordiales y claramente aún sigo aprendiendo; gracias por darme confort y amor a su manera, pero que me han llenado de mucha convicción para poder continuar, créanme que los admiro mucho, y agradezco que estén a mi lado para hablar de los Aspergillus… Los amo…*

*A mis padrinos, Imelda y Melquiades, quiero dedicarles este logro, porque han estado conmigo desde que era un bebé para cuidarme, guiarme, regalarme mi primera computadora y muchas otras formas de apoyo que siempre he recibido de ustedes, gracias por ser unos padres más para mí, atesoro mucho cada empujón que me dieron sin duda soy la más dichosa. Sé que mi padri estaría muy feliz y espero que orgulloso porque sí se pudo, desde el cielo está y estará en cada logro o caída pero siempre con nosotros. Hasta el cielo con amor Melquis…*

*A mis primos Lucero, Rubí, Rodrigo, gracias por siempre tener esa felicidad que los caracteriza, aunque no lo piensen pueden ser una inspiración para muchos, gracias porque de una u otra forma contribuyeron a que esto continuará, los quiero mucho y estaré para ustedes como ustedes están para mí hoy y siempre.*

*A mi compañero de vida, tú que desde el primer momento que decidimos caminar juntos has estado para cuidarme, apoyarme y ser incondicional en todo. Gracias por darme felicidad, amor, paz, respeto, fuerza y sobre todo por confiar tanto en mí, por festejar todos mis logros y alegrías, pero también por estar cuando las cosas no van tan bien, eres esa fortaleza que día a día me motiva. Agradezco a la vida por cruzarte en mi camino, no cabe duda de que todo el tiempo que hemos compartido ha sido de muchas vivencias, pero esta es muy significativa y estoy muy orgullosa de tenerte a mi lado. Te amo…*

Por mucho tiempo nos han hecho creer que los lujos se obtienen después de trabajar duramente y poder tener la oportunidad de acceder a las cosas materiales con las que has deseado durante un periodo probablemente muy largo.

Lo que nadie nos dice es que somos millonarios desde que tenemos la oportunidad de voltear a ver a nuestra familia y amigos, gozar de salud, tener la virtud de amar y ser amado, de poder compartir con otros lo que sabes y aprender de lo que desconoces y así esa cadena crece y se multiplica.

Peleamos por convertirnos en adultos para tener la posibilidad de tomar decisiones importantes, de tener responsabilidades y de salir al mundo a gritar que dejamos de ser niños, pero lo verdaderamente importante de crecer es no olvidar al que necesita apoyo, ver con ojos diferentes las necesidades, las carencias y tener el poder de ser una ayuda o impulso para otros.

Vivimos esforzándonos por tener algo mejor sin voltear a ver todo lo que hemos conseguido en el camino recorrido, ojalá nunca nos olvidemos de soñar, de valorar lo que tenemos y amar a los que nos aman.

Los lujos materiales jamás deberán opacar las riquezas que la vida te permite conocer, aprender y vivir día a día. Hoy me siento afortunada de tenerlos a mi lado y de la vida que he recorrido, disfrutando el tiempo en este mundo terrenal porque en otra vida, todo es eterno…

Con amor y cariño

Lizeth Morales Camilo, enero 2025.

## Índice


I. RESUMEN ..... 11
II. INTRODUCCIÓN ..... 13
III. MARCO TEÓRICO ..... 14
III.1 Generalidades *Aspergillus* spp ..... 14
III.1.1 Taxonomía ..... 14
III.1.2 Características morfológicas ..... 17
III.1.3 Ciclo de vida ..... 19
III.1.4 Factores de virulencia ..... 20
III.1.5 Factores de patogenicidad ..... 21
III.2 Aspectos epidemiológicos ..... 23
III.2.1 Distribución geográfica ..... 23
III.2.2 Epidemiología de México ..... 23
III.2.3 Fuente de infección ..... 24
III.2.4 Vías de entrada ..... 24
III.2.5 Formas de parasitación ..... 25
III.2.6 Factores de predisposición ..... 29
III.3 Aspergilosis ..... 31
III.4 Tratamiento ..... 32
III.5 Especies frecuentemente aisladas de casos clínicos ..... 34
III.5.1 Especies crípticas intrínsecamente resistentes ..... 36
III.6 Identificación morfológica de las especies de *Aspergillus* a partir del desarrollo en cultivo ..... 40
III.6.1 Limitantes de la identificación basada en las características morfológicas: ..... 41
III.6.2 Identificación molecular de las especies de *Aspergillus* spp ..... 42
III.6.3 Otras tecnologías para la identificación ..... 43
III.7 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight o ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo) ..... 43
III.7.1 Fundamento de MALDITOF MS ..... 44
III.8 Plataformas comerciales de MALDI-TOF ..... 46

III.9 MALDITOF en la identificación de bacterias ..... 47
III.10 MALDITOF en la identificación de levaduras ..... 49
III.11 MALDI-TOF en la identificación de hongos filamentosos ..... 52
III.12 Bibliotecas utilizadas para la identificación de hongos filamentosos por MALDI-TOF ..... 54
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN ..... 58
V. JUSTIFICACIÓN ..... 59
VI. HIPÓTESIS ..... 59
VII. OBJETIVOS ..... 60
VII.1 Objetivo general ..... 60
VII. 2 Objetivos específicos ..... 60
VIII. MATERIAL Y MÉTODO ..... 60
VIII.1 Tipo de estudio ..... 60
VIII.2 Población de estudio ..... 60
VIII.2.1 Criterios de inclusión ..... 61
VIII.2.2 Criterios de exclusión ..... 61
VIII.3 Variables ..... 61
VII.3.1 Dependiente ..... 61
VII.3.2 Independiente ..... 61
VIII.4 Técnicas e instrumentos ..... 61
VII.4.1 Cepas de referencia ..... 61
VIII.4.2 Recuperación de los aislamientos de *Aspergillus* spp. desde el cepario ..... 61
VIII.4.3 Equipo MALDI-TOF y bibliotecas utilizadas ..... 61
VIII.5 Procedimiento ..... 62
VIII.5.1 Extracción de proteínas ..... 62
VIII.5.2 Interpretación de resultados ..... 63
VIII.5.3 Definiciones ..... 64
VIII.6 Análisis estadístico ..... 64
IX. RESULTADOS ..... 65
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS ..... 71

XI. CONCLUSIÓN ..... 75
XII. REFERECIAS ..... 76

# I. RESUMEN

Las infecciones fúngicas son cada vez más frecuentes debido al aumento de pacientes con diversas inmunosupresiones por enfermedades o tratamientos. Entre los organismos responsables de estas infecciones fúngicas, el género *Aspergillus* es uno de los agentes más frecuentes y es responsable de altas tasas de mortalidad, principalmente en pacientes con enfermedades hematológicas. La identificación de los hongos filamentosos, y por lo tanto de *Aspergillus*, se basa históricamente en la observación de las características macroscópicas y microscópicas, pero hoy sabemos que esto no es suficiente dado la existencia de especies estrechamente relacionadas que no pueden diferenciarse por estos métodos y que son especies con diferentes perfiles de susceptibilidad. El diagnóstico y tratamiento rápido y adecuado es fundamental para el éxito en el desenlace de los pacientes. Recientemente, la espectrometría de masas MALDI-TOF MS ha venido a revolucionar la identificación de bacterias y levaduras ya que la identificación que anteriormente tomaba entre 24-72hrs., actualmente se está logrando en tan solo unos minutos.

El uso de esta tecnología para la identificación de hongos filamentosos ha sido mucho más lenta, debido entre otros factores, como la falta de representación de especies en las bibliotecas MALDI-TOF MS existentes.

Nuestro objetivo principal fue determinar el desempeño de las bibliotecas Filamentous Fungi Library v4.0 (FFLv4.0, Bruker Daltonics Bremen Germany) y la Mass Spectrometry Identification 2 (MSI2) en la identificación de las especies de *Aspergillus* por la tecnología MALDI-TOF MS.

Analizamos 228 aislamientos de *Aspergillus* spp. recuperados de muestras de pacientes del INCMNSZ desde octubre de 2014 hasta abril de 2021. Como estándar de oro para la identificación a nivel de sección y especie se realizó mediante métodos moleculares (construcción de árboles filogenéticos a partir de la secuencia de los genes β-tubulina y calmodulina).

Se utilizó un equipo MALDI-TOF MS de Bruker Daltonics Bremen Germany, para la obtención de los espectros, estos fueron analizados por ambas bibliotecas (FFLv4.0 de Bruker Daltonics y por MSI2); la interpretación de resultados se realizó conforme a los criterios establecidos por ambas bibliotecas.

Se llevó a cabo la identificación correcta a nivel de sección y especie, así como, las tasas de identificaciones erróneas y de no identificaciones.

**Resultados**

La correcta identificación por cada sección analizada (Fumigati, Flavi, Nigri, Terri, Versicolor y Nidulantes) fue superior al 93% con FFL4.0 frente al 70-92% con MSI2. La tasa de identificación a nivel de sección fue del 96% para FFLv4.0 frente al 82% para MSI2; la identificación general a nivel de especie fue del 72% para FFLv4.0 y del 55% para MSI2. La tasa más alta de identificación correcta a nivel de especie se observó en la sección Fumigati con 86% y en la sección Flavi con 84% para FFLv4.0 en comparación con 70% para la sección Fumigati y 71% para la sección Flavi con MSI2.

Mientras que la tasa general de identificación errónea a nivel de especie fue del 16% con FFLv4.0 y 6% por y MSI2.

Y finalmente las tasas de no identificación fueron 4% y 18%, con FFLv4.0 y MSI2, respectivamente.

**Conclusión.**

MALDI TOF MS Biotyper (FFLv4.0) mostró mejor rendimiento en la identificación de *Aspergillus* spp. que MSI2 al analizar espectros obtenidos a partir de cultivo en medio líquido.

# II. INTRODUCCIÓN

La identificación de las especies de *Aspergillus* spp., ha recaído en la observación de las características macroscópicas y microscópicas de los aislamientos, sin embargo, con la introducción de los métodos moleculares en la micología, se ha reconocido la existencia de especies hermanas que son morfológicamente indistinguibles y que presentan susceptibilidad disminuida a los antifúngicos comúnmente utilizados en la práctica clínica; es así que, es fundamental contar con la identificación certera de las especies para que el médico pueda establecer el tratamiento correcto en el menor tiempo posible y ver un impacto positivo en el desenlace de los pacientes. Los métodos moleculares se encuentran prácticamente restringidos a laboratorios de referencia o investigación. La espectrometría de masas basada en ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) ha sido utilizado con gran éxito en la identificación rápida y certera de bacterias desde hace un poco más de dos décadas por laboratorios clínicos, sin embargo, su aplicación para la identificación de hongos filamentosos ha sido más compleja debido a la estructura de sus pareces celulares, a las diferentes morfologías que presenta en los diferentes tiempos de desarrollo y a la falta de bibliotecas robustas. Para salva guardar esta última limitante, se han generado bibliotecas públicas y de acceso libre que cuentan con un gran número de especies, entre ellas se encuentra MSI2, que, en estudios previos, ha mostrado mejor desempeño que las bibliotecas de Bruker, sin embargo, recientemente Bruker actualizó su biblioteca, por lo que esperamos que el desempeño de esta última mejore. Es así como, nos planteamos determinar el desempeño de la Filamentous Fungi Library de Bruker Daltonics y MSI2 en la identificación de especies de *Aspergillus* (previamente identificados molecularmente) a partir de cultivo en medio líquido.

# III. MARCO TEÓRICO

## III.1 Generalidades *Aspergillus* spp.

La palabra *Aspergillus* fue en su origen usada por P.A Micheli a principios del siglo XVIII (1729), por la similitud microscópica que tiene con el *aspergillum* (del latín *asperjar*, que significa rociar o esparcir) instrumento utilizado para dispersar agua bendita en las ceremonias (1).

### III.1.1 Taxonomía

Recientemente, se han producido importantes cambios en la taxonomía de *Aspergillus* y sus teleomorfos. Desde 1965, el texto por excelencia sobre el género ha sido *"The genus Aspergillus"* de Raper y Fennell. En esta monografía se aceptaban 132 especies, las cuales se encontraban subdivididas en 18 grupos de los cuales, sólo 12 (*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor, A. nidulans, A. glaucus, A. clavatus, A. cervinus, A. candidus, A. flavipes y A. ustus*) se relacionaban con enfermedad en el humano: (2). Sin embargo, en los últimos años, la taxonomía de las especies de *Aspergillus* ha cambiado debido a la introducción del nuevo concepto de especies crípticas, lo que implica especies que se agrupan en un único complejo de especies denominado <<*sección*>> y que pueden ser morfológicamente indistinguibles.

El género *Aspergillus* pertenece al reino Fungi, división *Ascomycota*, clase *Eurotiomycetes,* orden *Eurotiales,* familia *Trichocomaceae,* género *Eurotium y Emericella (fase teleomorfa o sexuada), Aspergillus (fase anamorfa o asexuada)* (1,3).

Hay varios trabajos en los que se ha revisado la nomenclatura de *Aspergillus* siguiendo las normas del código internacional de nomenclatura botánica (ICBN), que han contribuido sustancialmente en la clasificación del género. Peterson (2000)

eliminó las secciones Versicolores y Usti e incluyó a las especies en la sección Nidulantes, el mismo autor, en 2008, aceptó cinco subgéneros y 16 secciones. En 2010, el género fue subdividido en 8 géneros y 22 secciones con 620 especies de acuerdo con el Index Fungorum (http://indexfungorum.org) o 577 especies registradas en Mycobank. Los estudios taxonómicos recientes establecen que el género consta de 5 subgéneros, 23 secciones y 339 especies reconocidas (figura 1) (1,4).

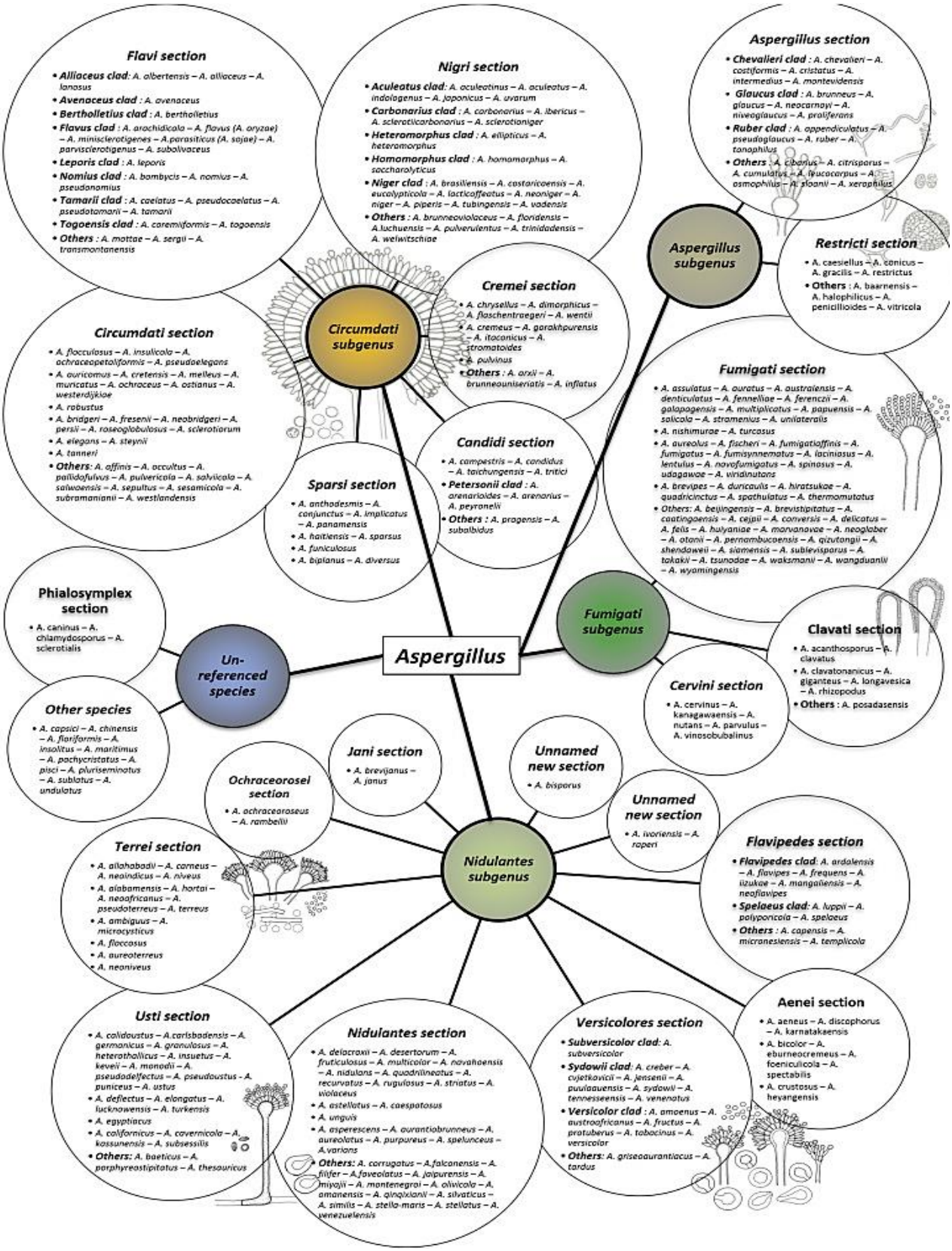



**Figura 1.** Clasificación por género y sección de las 339 especies reconocidas del género *Aspergillus* spp (4)

### III.1.2 Características morfológicas

*Aspergillus* es un hongo filamentoso con hifas hialinas, septadas, puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios), se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. Aunque conocer la forma de reproducción sexual es de gran utilidad para estudios taxonómicos, fisiológicos y de reproducción, las enfermedades causadas por estos hongos se presentan cuando el hongo se reproduce asexualmente (5).

La cabeza característica de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular, posee partes bien diferenciadas: célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio); conidióforo (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula), vesícula (extremo apical hinchado), presencia o ausencia de métulas; disposición de las fiálides o métulas sobre la vesícula y conidios (asexual) o ascosporas (sexual). Las cabezas aspergilares se pueden denominar uniseriadas en donde sobre la vesícula se disponen las fiálides y posteriormente las células conidiógenas y en algunas otras especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas estas cabezas se denominan biseriadas (6,7).

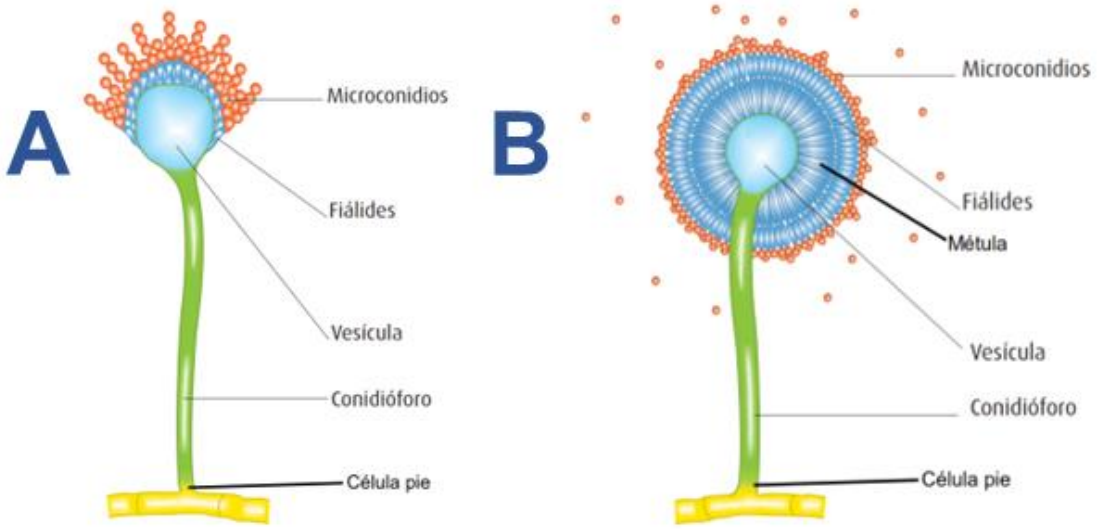



**Figura 2.** Características del género *Aspergillus* spp. **A.** Cabeza aspergilar uniseriada de *A. fumigatus*; **B.** Cabeza aspergilar biseriada de *A. niger.* Tomado y adaptado de Bonifaz, 2020 (1).

Otra parte fundamental es la pared celular, la cual es una estructura con gran plasticidad, que da la forma a la célula, controla la permeabilidad y protege a la célula de los cambios osmóticos. Además, de estas funciones, es el lugar de interacción con el medio externo (8); por su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el huésped, algunos componentes son inmunogénicos y estimulan respuestas celulares y humorales durante la infección. Esta pared celular presenta un componente fibrilar (quitina), y otro amorfo (la asociación de glucanos o mananos con proteínas). Estos componentes son útiles para el diagnóstico de aspergilosis por parte del laboratorio.

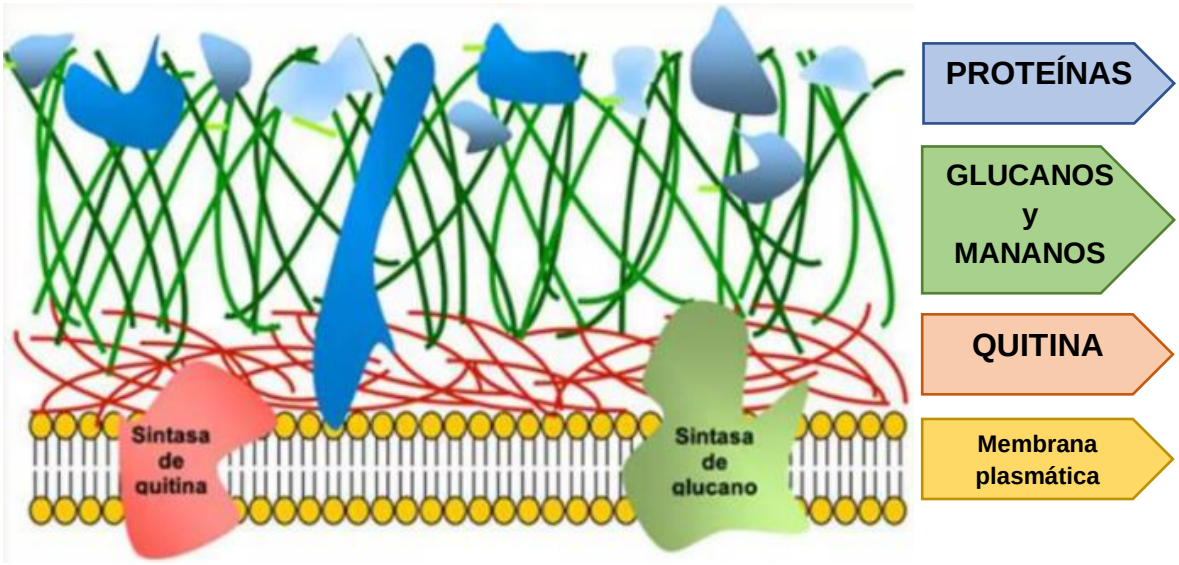



**Figura 3.** Composición de la pared celular de los hongos (9).

### III.1.3 Ciclo de vida

Pueden distinguirse cuatro fases en el ciclo de vida de *Aspergillus*:

1. Crecimiento vegetativo: Tubo germinativo primario salida de la espora y salida de la rama desde la hifa (10).
2. Reproducción asexual: Durante esta fase algunas hifas producen conidióforos (esporas asexuales) que se extienden verticalmente y forman vesículas multinucleadas en sus extremos, lo cual dará lugar a las conidias mediante división nuclear.
3. Reproducción sexual: Se caracteriza por la formación de un cleistotecio o cuerpo de fructificación y la producción de células de Hülle, las cuales se cree que proveen de un soporte nutritivo al cleistotecio, los cuales contienen las esporas sexuales conocidas como ascosporas.
4. Ciclo parasexual: Se presenta con alternancia de fases de haploides y diploides se observa en la figura 4 (11,12).

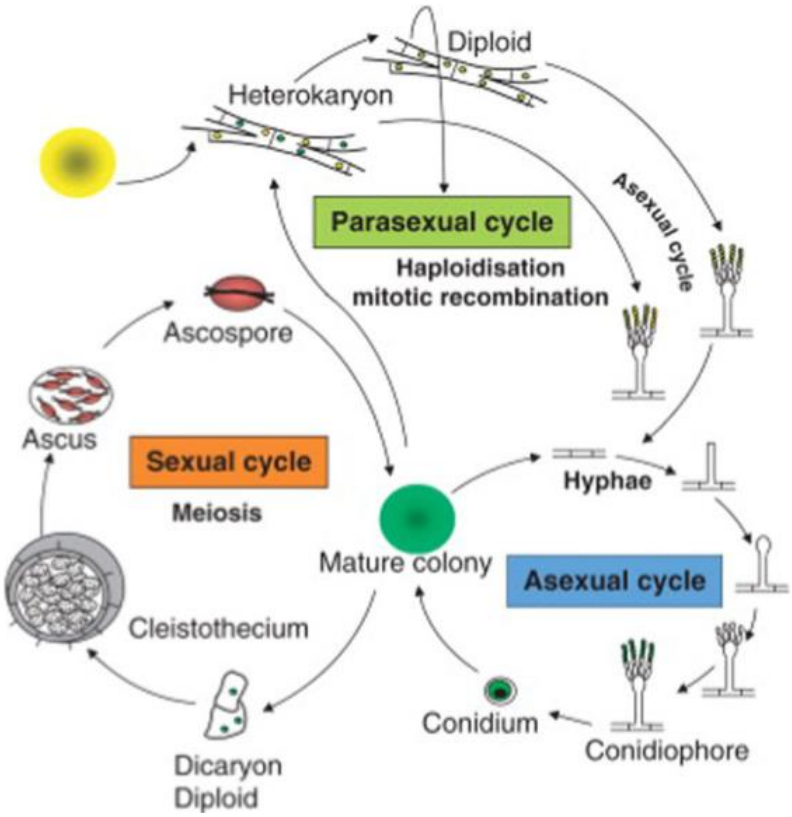



**Figura 4.** Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* como modelo para la biología celular y vías de desarrollo (12).

Este hongo tiene un ciclo biológico muy simple en el cual se forman esporas para su reproducción y tras la germinación de estas esporas se forman las hifas que serán las formas invasivas del hongo. La simplicidad del ciclo biológico favorece una alta capacidad del hongo para la esporulación y, como consecuencia, la presencia de concentraciones altas de esporas en el aire (13).

### III.1.4 Factores de virulencia

Existen factores de virulencia comunes del género *Aspergillus* que facilitan la invasión del huésped. *Aspergillus* puede secretar toxinas como gliotoxina que son capaces de actuar en el momento crucial de la patogénesis, cuando el hongo coloniza el epitelio mucoso e interacciona con el huésped. Estas toxinas pueden ralentizar el movimiento ciliar y lesionar el epitelio del tracto respiratorio. Otros factores de virulencia actúan en etapas posteriores de la interacción entre el

microorganismo y el huésped, interfiriendo en la capacidad de defensa del sistema inmune del huésped (14). La virulencia de este hongo es multifactorial (figura 5), asociada a su estructura, su capacidad de crecimiento y adaptación a condiciones de estrés, sus mecanismos de evasión del sistema inmunológico y su capacidad de causar daño al huésped (15).

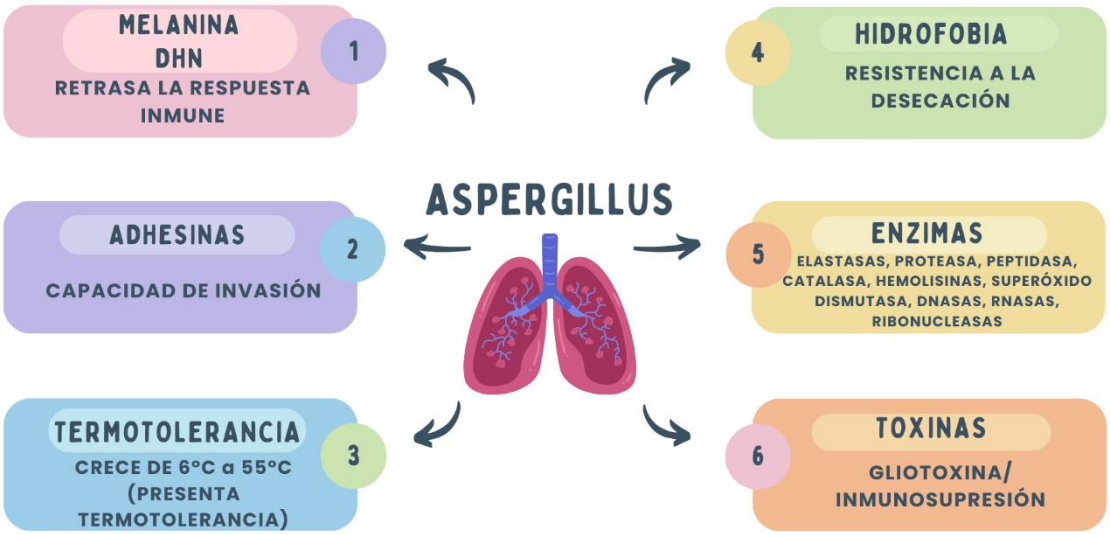



**Figura 5.** Factores de virulencia comúnmente descritos de *Aspergillus* spp.

### III.1.5 Factores de patogenicidad

*Aspergillus* es un ejemplo de lo que denominamos "patógeno oportunista", es decir, que suele afectar a pacientes con factores predisponentes. Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentran:

- Su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y, su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos (16).
- El pequeño tamaño de sus conidias que permite que sean aspiradas y que pueda causar infección pulmonar y de senos paranasales. La eliminación de conidias inhaladas tiene lugar por células epiteliales de la vía aérea y fundamentalmente por macrófagos alveolares. Éstos realizan el aclaramiento

de las conidias y tras reconocer determinados antígenos fúngicos de la pared celular, secretan mediadores inflamatorios que favorecen el reclutamiento de neutrófilos y la activación de la inmunidad celular, determinantes en la eliminación de hifas y en la constitución de la respuesta inmunológica (16,17).

- Su capacidad de crecer a 37ºC es lo que le hace idóneo para afectar al ser humano.
- Hipersensibilidad. Esta puede ser congénita y en estos casos, *Aspergillus* actúa como lo harían otros antígenos ambientales, por ejemplo, polvo o pólenes ocasionando desde una rinitis alérgica, hasta un asma crónico severo y los pacientes presentan concentraciones elevadas de IgE. En otros casos, las personas pueden hacerse hipersensibles a los hongos de este género si trabajan en sitios con altos niveles de contaminación por el agente, como puede ocurrir en los silos donde se almacenan granos en malas condiciones de humedad y temperatura, en estos casos se incrementa la concentración de IgG (18).
- La producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células de los mamíferos como las micotoxinas (elastasa, restrictocina, fumigatoxina). Se ha demostrado el potencial hepatotóxico y cancerígeno de muchos metabolitos como las aflatoxinas y ocratoxinas de diversas especies de *Aspergillus*; y otras, como la gliotoxina que han mostrado, en estudios de laboratorio, tener un efecto inmunosupresor (16).

*Aspergillus* puede colonizar, al producir varias enzimas. Sin embargo, pese a la diversidad de substancias potencialmente patógenas, las infecciones humanas suelen requerir factores predisponentes.

## III.2 Aspectos epidemiológicos

*Aspergillus* es un hongo que crece en un amplio rango de temperatura (6°C - 55°C) y una humedad relativa baja; se distribuye ampliamente en el ambiente suelo, aire, agua, plantas (es ubicuo), así mismo, causan el deterioro de muchos productos alimenticios, como son, vegetales, alimentos ricos en carbohidratos, fibras, pan, dulces, alimento de aves, granos, alimentos enlatados (son saprofitos), (19,20).

### III.2.1 Distribución geográfica

Es un hongo muy aeróbico y por tanto está presente en ambientes con mucho oxígeno, su distribución geográfica es mundial. Existen importantes variaciones temporales y geográficas (1,21).

Las micosis sistémicas parecen estar cambiando debido a los cambios ambientales globales, a nuevas prácticas agrícolas, al incremento del uso de fungicidas, la migración humana y el turismo de aventura. La exposición ambiental es uno de los factores predisponentes para desarrollar infecciones fúngicas (22).

Frecuentemente se aíslan en el aire, tierra, plantas y materia orgánica en descomposición sobre todo los que tienen carbohidratos y fibras. Esto hace que sea el hongo aéreo más frecuente debido a que puede crecer en un gran intervalo de temperaturas (21).

### III.2.2 Epidemiología de México

Las especies de *Aspergillus* son muy diversas y al tener una amplia distribución es difícil establecer con claridad las especies presentes en México. Sin embargo, se han hecho diversos estudios donde se han revelado datos de la variabilidad del medio ambiente.

En 2019 se realizó un muestreo durante diferentes estaciones del año (invierno, primavera y verano) en 18 sitios del norte de México en un clima semi-árido incluyendo zonas rurales y urbanas de los estados de Durango y Coahuila, los cuales tuvieron en común una alta presencia de *Bipolaris, A. fumigatus, Alternaria y A. niger*, representando el 80 % de todos los géneros encontrados (22).

### III.2.3 Fuente de infección

Las especies oportunistas de *Aspergillus* son ubicuas y logran ocupar el primero o segundo lugar en los hongos contaminantes. Es posible que las infecciones adquiridas en hospitales sean esporádicas o que estén asociadas a la exposición al polvo durante las obras de restauración o construcción de edificios. Se ha rastreado el origen de brotes ocasionales de infección cutánea relacionados a dispositivos médicos contaminados (1).

### III.2.4 Vías de entrada

Las vías de entrada de las especies de *Aspergillus* son el tracto respiratorio a través de la inhalación de conidios, las lesiones cutáneas, heridas quirúrgicas, la córnea y el oído. Por lo general, la infección se sitúa en la puerta de entrada y puede quedar localizada o diseminarse por contigüidad (23).

Algunas especies del género *Aspergillus* son parte de la flora habitual de diversas zonas del cuerpo como orofaringe, fosas nasales, piel, saco lagrimal, oído y tubo gastrointestinal, por lo que, su aislamiento debe tener correlación clínica para poder establecer que se encuentra como agente patógeno (1).

### III.2.5 Formas de parasitación

La forma de parasitación se lleva a cabo básicamente en 4 etapas, cada una tendrá factores importantes para poder continuar la siguiente etapa (figura 6).

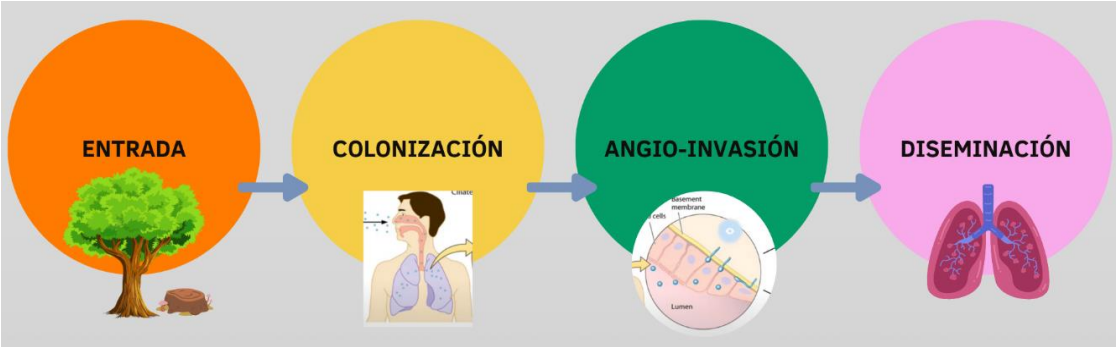



**Figura 6.** Etapas básicas de la fisiopatología

*Aspergillus,* al ser un organismo cosmopolita, se encontrará en casi todo el medio ambiente, y así el huésped podrá ser colonizado a través de la vía respiratoria. Aunque la inhalación de estas esporas por el ser humano es muy frecuente; las estimaciones sugieren que una persona promedio puede inhalar hasta 200 conidios por día (24), habitualmente no producen ninguna enfermedad, al ser eliminadas eficientemente por el sistema inmune. Sin embargo, en algunos huéspedes, por el grado de inmunosupresión en el que se encuentran, las esporas tienen mayor facilidad para alcanzar el tracto respiratorio inferior y, su tamaño reducido permite que se depositen en los alvéolos (14).

Para conocer a detalle la forma en que *Aspergillus* logra convertirse en un patógeno oportunista, a continuación, se desglosarán las fases conocidas en modelos estudiados:

### III.2.5.1 Entrada

Cabe mencionar que esta descripción es para el tracto respiratorio. Tras la inhalación, los conidios se encuentran con la mucosa de las vías respiratorias y las células epiteliales que pueden secretar compuestos antimicrobianos, contribuyendo a eliminar los patógenos inhalados. La pared de los conidios es rica en carbohidratos y ésta puede ser fácilmente reconocida para facilitar su destrucción por macrófagos y neutrófilos. Los macrófagos alveolares son las principales células fagocíticas residentes del tracto respiratorio y un componente crítico de la defensa del huésped contra los conidios ya que fagocitan los conidios (24,25).

### III.2.5.2 Colonización

El modelo de desarrollo de la aspergilosis invasiva comienza una vez que el conidio logra entrar al alveolo. El conidio se adhiere al epitelio, y en pacientes inmunocompetentes, las células fagocíticas, como macrófagos alveolares o neutrófilos, los contendrán tras reconocer determinados antígenos fúngicos de la pared celular, y mediante fagocitosis y liberar sustancias reactivas de oxígeno, lograrán eliminarlos. En pacientes inmunosuprimidos, estos conidios generan el desarrollo de hifas que liberan toxinas y permiten la degradación del tejido pudiendo así llegar al lumen vascular (15).

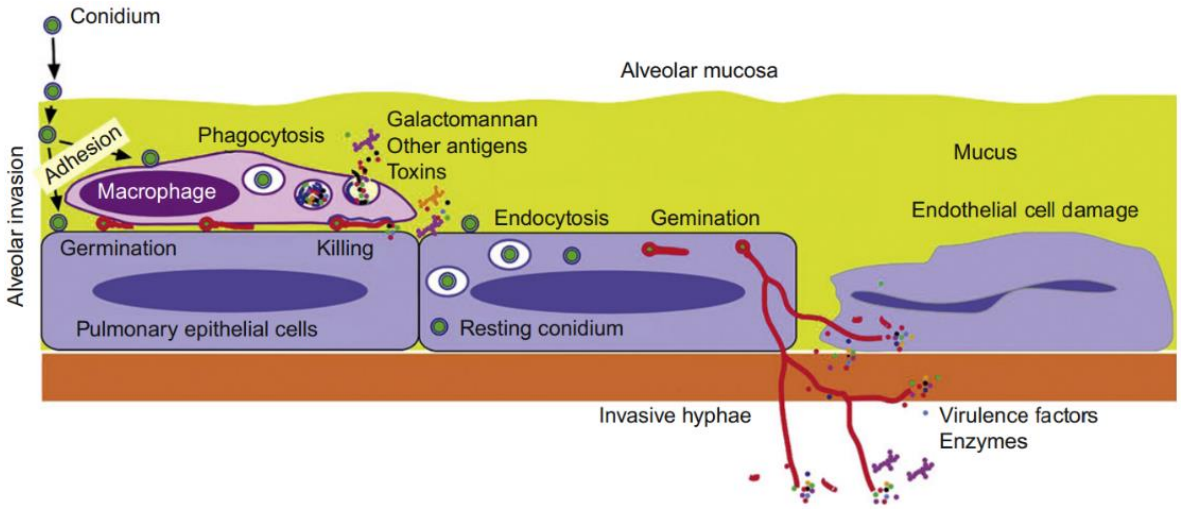



**Figura 7.** Formas de parasitación de vías respiratorias: Primer paso de colonización e invasión del epitelio pulmonar (15).

### III.2.5.3 Angio-invasión

La angio-invasión se da cuando las hifas logran llegar al lumen vascular y ahí secreten factores de virulencia que propician la activación de una cascada de inflamación que destruye el tejido, pudiendo provocar hemoptisis en algunos pacientes, también habrán fragmentos de hifas circulantes en el torrente sanguíneo dando lugar al siguiente paso para una diseminación (15).

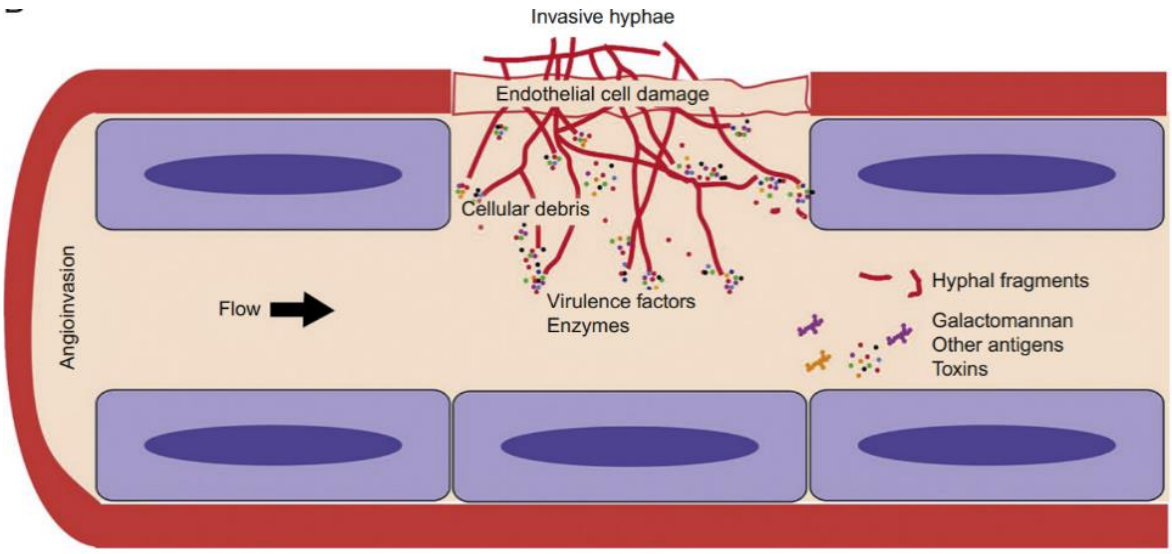



**Figura 8.** Formas de parasitación de vías respiratorias: Invasión de capilares sanguíneos y diseminación hematógena de fragmentos de hifas, galactomanano y otras moléculas (15).

### III.2.5.4 Diseminación

Las hifas circulantes tendrán la oportunidad de llegar a cualquier órgano y poder colonizarlo, repitiendo el mismo mecanismo, pero ahora del lumen vascular al órgano (15).

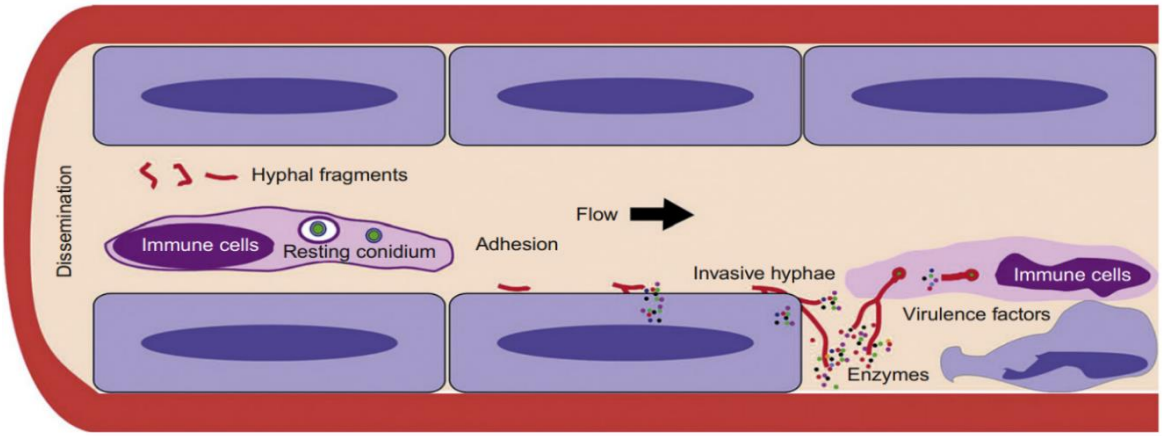



**Figura 9.** Formas de parasitación de vías respiratorias: Difusión y primer paso de invasión de órganos profundos (15).

Los modelos animales y los estudios *in vitro* han demostrado que los neutrófilos se adhieren a las hifas de los hongos y se degranulan, lo que provoca la muerte de los hongos mediante mecanismos oxidativos y no oxidativos (24). Sin embargo, el estado inmunológico del paciente es fundamental para determinar el desarrollo o no de alguna forma clínica de importancia. En general, los pacientes inmunosuprimidos son susceptibles. La neutropenia es un factor de riesgo primario para diseminación. Dos casos típicos de inmunosupresión son, pacientes con uso de corticoides en quienes se da un fallo en la actividad fagocitaria, hay aumento de la cantidad de neutrófilos para controlar la colonización, pero no se logra fagocitar al agente, debido al fallo provocado por la terapia. El otro caso, es por agotamiento inducido por quimioterapias. Permitiéndole a *Aspergillus* escapar de la fagocitosis con un desarrollo excesivo de hifas y diseminándose a través, de los mecanismos mencionados anteriormente (24).

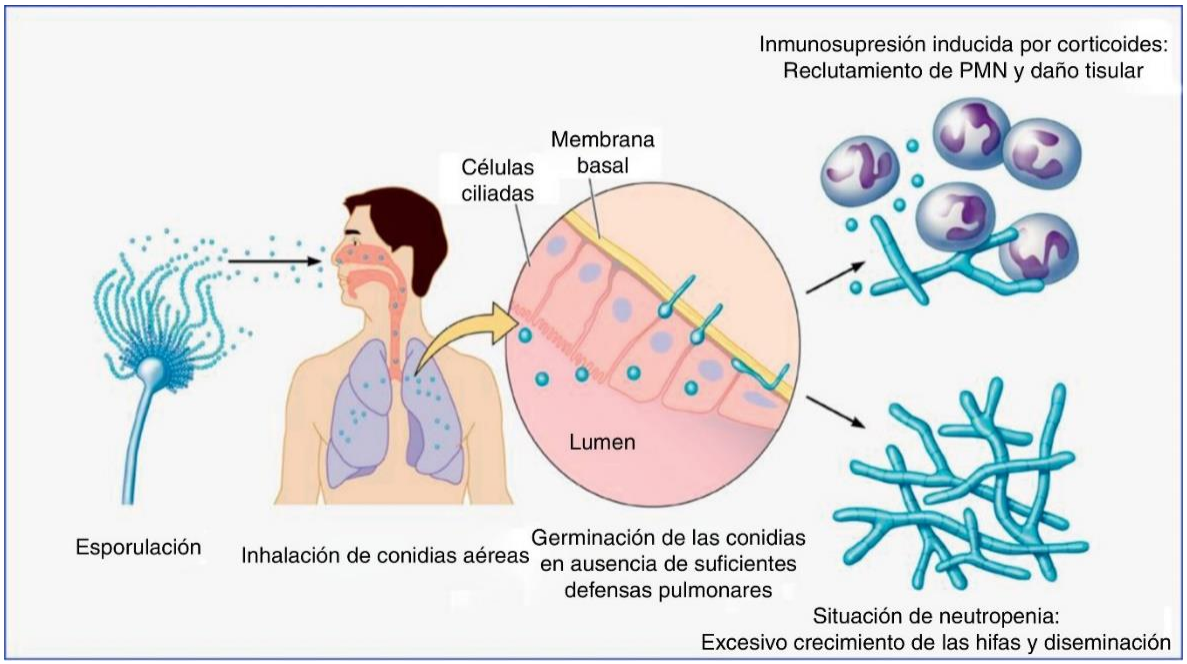



**Figura 10.** Vía de entrada de *Aspergillus* por inhalación imagen tomada y adaptada de Dagenais y Keller (24).

Como se puede analizar *Aspergillus* spp., pasó de ser considerado un patógeno oportunista de poca importancia médica y agente responsable de enfermedades alérgicas, a ser considerado actualmente como uno de los hongos patógenos más relevante en el aire  causal de casos clínicos de importancia (26).

### III.2.6 Factores de predisposición

Si el sistema inmunológico es normal, la infección es contenida y es probable que nunca cause una enfermedad. Sin embargo, el riesgo de desarrollar una forma clínica de importancia depende del estado general de salud y del grado de exposición; en general estos factores confieren vulnerabilidad y aumentan la probabilidad de desarrollar formas invasivas (27):

1. *Inmunosupresión*: Neoplasias sólidas (sobre todo pulmonares), neoplasias hematológicas (que induzcan neutropenia), VIH-SIDA (poco frecuentes).

2. *Citopenias*: Personas con procedimientos como quimioterapia, radioterapia; enfermedad granulomatosa crónica.
3. *Cavidades pulmonares*: Por colonizaciones previas (tuberculosis, histoplasmosis, etc.).
4. *Asma o fibrosis quística*: Pueden presentar respuestas alérgicas.
5. *Tratamientos farmacológicos*: Tratamientos post cirugía de trasplante de órgano sólido trasplante de médula ósea, corticosteroides durante un tiempo prolongado (1,26,28).

Sobre la prevención y tratamiento de infecciones relacionadas a pacientes con cáncer publicada en 2008, categoriza a los pacientes en diferentes niveles de riesgo para la presentación de alguna complicación infecciosa:

- **Riesgo Bajo:** quimioterapia estándar, (esquema para la mayoría de los tumores sólidos). Neutropenia con duración estimada < a 7 días.
- **Riesgo intermedio:** trasplante autólogo de células hematopoyéticas, linfoma, leucemia linfocítica crónica (LLC), mieloma múltiple (MM), esquema de tratamiento con análogos de purinas: fluoradavina, neutropenia de 7- 10 días.
- **Riesgo alto:** trasplante alogénico de células hematopoyéticas, leucemia mieloide aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos, síndromes de falla medular en la edad pediátrica, neutropenia con duración estimada > a 10 días, enfermedad-injerto contra huésped, tratamiento con anti-TNF (Factor de Necrosis Tumoral) (29).

## III.3 Aspergilosis

El término *aspergilosis* involucra una serie de enfermedades, causadas por cualquier especie patógena y oportunistas del género *Aspergillus*.

Las patologías son muy diversas e incluyen micotoxicosis, reacciones alérgicas colonización e invasión en individuos inmunocompetentes, pero también enfermedades sistémicas con altas tasas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, como la aspergilosis invasiva (AI) que usualmente es mortal (1,30).

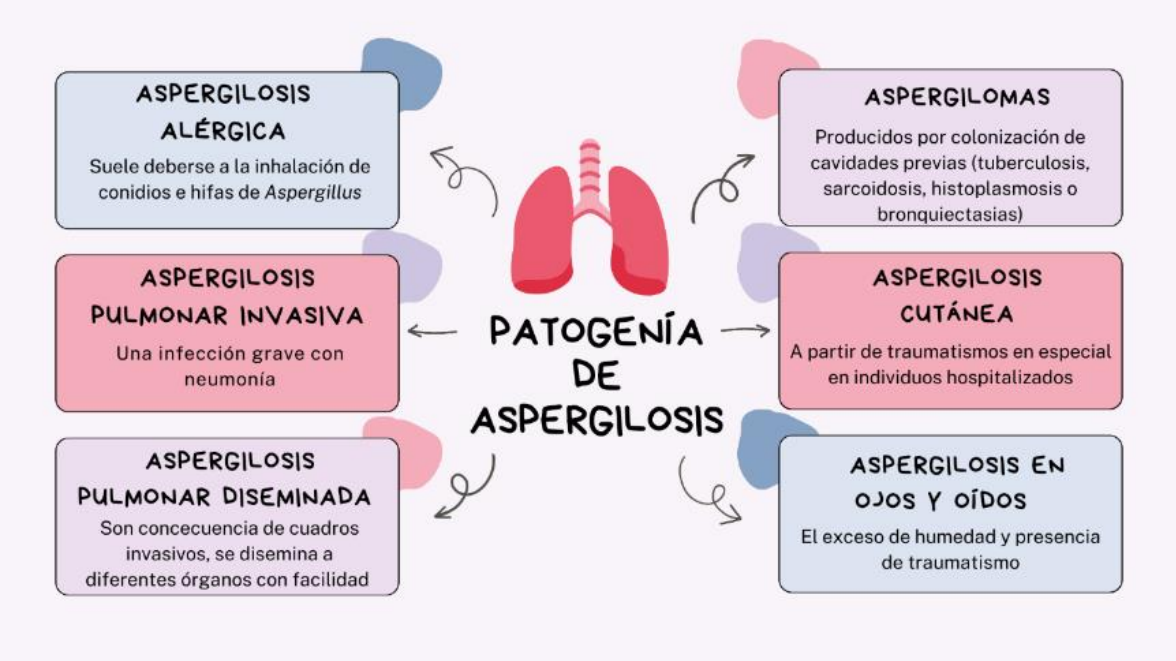



**Figura 11.** Explicación patogénica de las formas clínicas de importancia (1).

La sintomatología clínica de la aspergilosis pulmonar conlleva episodios recurrentes de obstrucción bronquial en pacientes asmáticos, con fiebre, malestar, expectoración de esputo mucoso oscuro, eosinofilia y en ocasiones hemoptisis. Los hallazgos radiológicos suelen mostrar infiltrados parenquimatosos (habitualmente en lóbulos superiores), atelectasias por impacto mucoso y signos característicos de bronquiectasias (afección que daña las vías respiratorias de los pulmones y dificulta la expulsión de mucosidad), también los pacientes muestran signos de obstrucción de la vía aérea (17).

## III.4 Tratamiento

Por años, la terapia de elección fue la anfotericina, aunque con pobres resultados y alta toxicidad en su formulación desoxicolato. En los últimos años se han producido notables avances en las opciones terapéuticas con los nuevos triazoles que han cambiado la historia de la enfermedad, las formulaciones lipídicas de anfotericina con relativa baja toxicidad y la nueva familia de equinocandinas que también han sido evaluadas como opciones terapéuticas de la AI.

En el siguiente cuadro se describen los antifúngicos que se utilizan en la práctica clínica para el tratamiento, ya que son activos contra *Aspergillus* spp.

**Cuadro 1.** Recomendaciones terapéuticas para el tratamiento de aspergilosis (31).

| Diagnóstico | Tratamiento de Primera Línea | Comentario |
|---|---|---|
| **Aspergilosis invasiva** | Voriconazol de 6 mg/kg IV cada 12 horas el primer día, seguido de 4 mg/kg IV cada 12 horas; dosis oral de 200 mg cada 12 horas. | Se consideran formas invasoras con afección a órganos como: API, sinusales invasoras, traqueobronquial, cerebral, cardiaca (endocarditis, pericarditis y miocarditis), cutánea, peritonitis, osteomielitis y artritis séptica. |
| **Infecciones oculares por Aspergillus (Endoftalmitis y queratitis)** | Anfotericina B intraocular con vitrectomía parcial. | Se debe iniciar tratamiento sistémico, tratamiento local con inyección intravítrea e intervención quirúrgica con vitrectomía parcial. |
| **Profilaxis contra Aspergilosis invasora** | Posaconazol 200 mg VO cada 8 horas. | Se ha demostrado eficacia de la profilaxis en pacientes de alto riesgo como son: neutropenia con LMA, síndrome mielodisplásico, enfermedad de injerto contra hospedero. |
| **Aspergiloma** | Ni tratamiento, ni intervención quirúrgica. | Es incierto el papel que desempeña el tratamiento farmacológico en Aspergiloma. |
| **Aspergilosis pulmonar cavitaria crónica** | Itraconazol o Voriconazol | Es necesario tratamiento a largo plazo. |
| **Aspergilosis Broncopulmonar alérgica** | Itraconazol | Los corticoesteroides son la parte fundamental del tratamiento. Itraconazol funciona como ahorrador de corticoides. |

## III.5 Especies frecuentemente aisladas de casos clínicos

Es importante resaltar que taxonómicamente, el género *Aspergillus* spp., incluye cuatro subgéneros y un subgénero sin referencia, que a su vez se subdividen en numerosas secciones (descritos en el punto *III. 1.1 Características morfológicas*). Dos especies relacionadas entre sí, que son parte de la misma sección y que son prácticamente indistinguibles mediante métodos morfológicos se designan como especies **crípticas.**

Se considera que, 95% de las aspergilosis son ocasionadas por tres especies principales: *Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* (1). Sin embargo, *Aspergillus fumigatus*, es responsable de aproximadamente el 90% de los casos. Otras especies, como *A. nidulans* y *A. terreus* se aíslan cada vez con más frecuencia, dependiendo de factores geográficos, tipo de huésped o prescripción de antifúngicos, incrementando su papel como agentes etiológicos (32,33). En 2011 en una revisión se describió la frecuencia de aislamientos de *Aspergillus* descritas de importancia clínica relevante (34).

**Cuadro 2.** Distribución de especies de *Aspergillus* según la identificación basada en secuencias nucleotídicas de vigilancia de infecciones asociadas a trasplantes (34).

| Secciones | Frecuencia (%) | Identificación basada en secuenciación nucleotídica | Frecuencia (%) |
|---|---|---|---|
| **Fumigati** | 147/218 (67.4) | *A. fumigatus* | 139/147 (93.9) |
| | | *A. lentulus* | 4/147 (2.7) |
| | | *A. udagawae* | 3/147 (2.0) |
| | | *A. pseudofischeri* | 1/147 (0.8) |
| **Flavi** | 29/218 (13.2) | *A. flavus* | 29/29 (100) |
| **Nigri** | 19/218 (8.7) | *A. niger* | 13/19 (68) |
| | | *A. tubingensis* | 6/19 (32) |
| **Terrei** | 11/218 (7.4) | *A. terreus* | 11/11 (100) |
| **Usti** | 6/218 (2.7) | *A. calidoustus* | 6/6 (100) |
| **Versicolor** | 5/218 (2.3) | *A. versicolor* | 3/5 (60) |
| | | *A. sydowii* | 3/5 (40) |
| **Nidulantes** | 1/218 (0.5) | *A. tetrazonus* | 1/1 (100) |

En los laboratorios de micología clínica, la identificación de especies de *Aspergillus* habitualmente se basa en la determinación de características morfológicas macroscópicas y microscópicas, como el color, la forma de los conidios, las esporas y las estructuras miceliales. Como se mencionó en el párrafo anterior, este abordaje no permite discriminar entre las especies crípticas, y la identificación correcta a nivel de especie es clínicamente relevante, ya que algunas especies crípticas presentan resistencia a los antifúngicos utilizados en el tratamiento de la aspergilosis.

### III.5.1 Especies crípticas intrínsecamente resistentes

En cuanto a la resistencia, existen puntos de corte interpretativos disponibles que distinguen entre aislamientos susceptibles y resistentes. Si bien, no se han establecido puntos de corte para las especies de *Aspergillus* spp., recientemente se propusieron puntos de corte para Anfotericina B para *A. nigri*, isavuconazol para *A. flavus, A. fumigatus, A. nidulans, A. terreus*, itraconazol para *A. flavus, A. fumigatus, A. nidulans* y *A. terreus*, posaconazol y voriconazol para *A. fumigatus y A. nidulans* por EUCAST, mientras que, CLSI propuso solo para voriconazol en *A. fumigatus* (35,36). La actividad *in-vitro* de los agentes antifúngicos en *Aspergillus* distintos a *A. fumigatus* se compara a menudo con la de *A. fumigatus*. Para algunas especies, los datos clínicos o de animales experimentales respaldan la interpretación de la CMI de agentes antifúngicos específicos. Sin embargo, para algunos fármacos como la anfotericina B (AmB), falta una correlación entre la susceptibilidad *in-vitro* y la eficacia *in-vivo* (34). Especies como *A. calidoustus* (*Aspergillus* sección Usti ) y *A. lentulus* (sección Fumigati), muestran una susceptibilidad disminuida a varios antifúngicos (37). Para comprender mejor la presencia de resistencias, detallamos algunas especies de importancia clínica en cada una de las secciones.

### III.5.1.2 Susceptibilidad disminuida en especies de la Sección de *Aspergillus* Fumigati

Aunque *A. fumigatus* es generalmente susceptible a las principales clases de agentes antifúngicos, recientemente se han identificado varias especies hermanas que exhiben una susceptibilidad reducida a una o más clases de antifúngicos. *A. udagawae* muestra una susceptibilidad reducida a anfotericina B y voriconazol, mientras que *A. fumigatiaffinis* y *A. viridinutans* muestran una susceptibilidad reducida a anfotericina B y a todos los azoles activos contra *A. fumigatus*. Por otro lado, *A. lentulus* muestra una susceptibilidad reducida a anfotericina B, a todos los azoles activos contra *A. fumigatus* y a caspofungina (34).

### III.5.1.3 Susceptibilidad disminuida en especies de la Sección de *Aspergillus* Flavi

La especie más representativa de esta sección es *A. flavus*, la cual es reconocida como la segunda causa más común de IA en muchos centros. El estudio de vigilancia TRANSNET mostró que el 13.2% de los casos de IA probados y probables se debían a *A. flavus*, lo que se confirmó mediante identificación basada en secuenciación nucleotídica. Los aislamientos clínicos de *A. flavus* generalmente son muy susceptibles a los antifúngicos de uso común, como polienos, triazoles y equinocandinas (34,38)

### III.5.1.4 Susceptibilidad disminuida en especies de la Sección de *Aspergillus* Nidulanti

Un análisis basado en secuenciación nucleotídica de una colección internacional de especies de *Aspergillus* pertenecientes a la sección Nidulanti mostró que, 6/12 *Emericella quadrilineata* (anamorfo *Aspergillus tetrazonus*) se identificaron incorrectamente como *A. nidulans* según la morfología macroscópica y microscópica. *A. tetrazonus* y *A. nidulans* son especies estrechamente relacionadas y pueden aparearse entre sí. Curiosamente, a pesar de la estrecha relación, se han

encontrado diferencias significativas en su susceptibilidad *in vitro*. La concentración mínima inhibitoria (CIM) media de anfotericina B para *A. tetrazonus* es de 0.5 mg/L en comparación de la CIM de 2.5 mg/L para *A. nidulans*. Por el contrario, *A. nidulans* fue más susceptible a la caspofungina que *A. tetrazonus* (CMI media de 0.3 mg/L y 1.8 mg/L, respectivamente) (34,38,39).

### III.5.1.5 Susceptibilidad disminuida en las especies de la Sección de *Aspergillus* Usti

Un estudio reciente que analizó la secuencia nucleotídica de 34 aislamientos clínicos, que habían sido identificados previamente como *A. Ustus*, sobre la base de exámenes morfológicos, mostró que estos, pertenecían casi exclusivamente a *A. calidoustus* (especie recientemente descrita, genéticamente distinta y que puede crecer a temperaturas más altas). Las pruebas de susceptibilidad *in-vitro* mostraron que los azoles no son activos contra *A. calidoustus* ya que éstos cuentan con una CIM ≥8 mg/L(34,40). Esto es consistente con la experiencia clínica, ya que se han informado casos de falla a la terapia con azoles. Las CIM para anfotericina fue de 1 a 2 mg/L, que es relativamente alta (40) Las CIM de caspofungina fue variable, oscilando entre 0.25 y 4 mg/L. Los informes constantes sobre la falta de actividad de los azoles contra *A. calidoustus* y los fracasos del tratamiento indican que es intrínsecamente resistente a los triazoles y que la terapia con azoles debe evitarse en los casos en que se recupere esta especie (34).

### III.5.1.6 Susceptibilidad disminuida en las especies de la sección de *Aspergillus* Terrei

Los aislamientos de *A. terreus* muestran, *in-vitro*, CIM más altas para anfotericina B que *A. fumigatus* (34,39). Los estudios en animales respaldan la falta de eficacia de este antifúngico contra *A. terreus*, mientras que itraconazol, posaconazol y caspofungina demostraron ser efectivos. Se ha demostrado que la susceptibilidad reducida a anfotericina B se ha asociado con un bajo contenido de ergosterol en la membrana; otros han sugerido que una producción significativamente mayor de

catalasa en *A. terreus* en comparación con *A. fumigatus* puede ser un factor importante (34).

### III.5.1.7 Susceptibilidad disminuida en las especies de la sección de *Aspergillus* Nigri

Ahora se sabe que los *"Aspergillus* negros*",* anteriormente identificados como *A. niger*, muestran en realidad, ser una amplia variedad de especies. Nuevos enfoques moleculares han demostrado que existe una alta biodiversidad, pero que los taxones son difíciles de reconocer basándose únicamente en sus caracteres fenotípicos. (34,41). En un estudio reciente de 19 aislamientos de *Aspergillus* de la sección Nigri, se encontró que 6 fueron *A. tubingensis* (100% de identidad con *A. tubingensis* NRRL 4875) y 13 fueron *A. niger sensu* estricto (39).

Según la susceptibilidad a los azoles, se distinguieron tres patrones de susceptibilidad diferentes en la sección Nigri, es decir, CMI bajas, altas y un tercer grupo que muestra un efecto paradójico poco común de los azoles. Sin embargo, estos grupos no coincidieron con los límites de las especies, lo que dificulta su interpretación como una propiedad intrínseca o adquirida. También se han observado diferencias sutiles en la susceptibilidad *in-vitro* en algunas de las nuevas especies hermanas, por ejemplo, *A. tubingensis* y *A. foetidus* muestran CMI de azoles ligeramente más altas en comparación con *A. niger* sensu estricto (34).

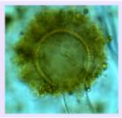
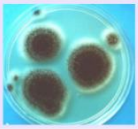
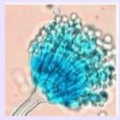
Como podemos percatarnos, la identificación a nivel de especie de un aislamiento de *Aspergillus* recuperado de una muestra clínica (especialmente de un sitio estéril de un paciente inmunocomprometido) es fundamental para la selección adecuada del tratamiento antifúngico. (42).

## III.6 Identificación morfológica de las especies de *Aspergillus* a partir del desarrollo en cultivo

A diferencia de las bacterias e incluso de las levaduras, para las cuales existen diferentes métodos de identificación, incluyendo pruebas bioquímicas manuales, o hasta las automatizadas, en el caso de los hongos filamentosos, la identificación se ha basado históricamente en la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas; y las especies de Aspergillus no son la excepción.

- Examen macroscópico: Velocidad de crecimiento de la colonia, textura, grado de esporulación, forma, tamaño, color, anverso y reverso.
- Examen microscópico: Es necesario realizar una impronta a partir del cultivo en agar y una tinción con azul de algodón de lactofenol para poder observar a detalle las características como, forma de la vesícula, en las cabezas aspergilares, disposición de las fiálides y poder determinar si son uniseriadas o biseriadas, también observar la presencia o ausencia de color, dimensiones, formas y textura del conidióforo la y presencia de células Hülle (1,7).

**Cuadro 3.** Características microscópicas y macroscópicas de *Aspergillus* spp.

| SECCIÓN/ ESPECIES | CULTIVO EN PLACA | DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA | DESCRIPCIÓM MICROSCOPICA | |
|---|---|---|---|---|
| **FLAVI** *(A. flavus, A. nominus, A. parasiticus, A. tamarii)* | | **Frente:** Inician de color blanco, después cambian de verde amarillento a verde oliva. **Reverso:** Incoloro, a veces puede ser amarillo o marrón. |  | Presenta estipetes espiculados y conidios ornamentados. Cabeza aspergilar uniseriada o biseriada. Los conidios se organizan de forma radiada. |
| **NIGRI** *(A. niger, A. tubingensis, A. japinicus)* |  | **Frente:** Colonias granulosas y el color va del marrón al negro. **Reverso:** Va de incoloro a amarillo apálido. | | Conidióforos largos y lisos. Los conidios son ornamentados de color negro o café, organizados de forma radiada. Cabeza aspergilar principalmente biseriada, algunas especies uniseriada. |
| **TERREI** *(A. terreus, A. alabamensis, A. pseudoterreus)* | | **Frente:** Colonias algodonosas ocacionalemente pulvelurentas de color marrón terracota. **Reverso:** Tonos amarillentos |  | Las hifas pueden dar origen a conidios accesorios. La cabeza aspergilar es biseriada. Los conidios se organizan de forma columnar. |
| **FUMIGATI** *(A. fumigatus*, A. lentulus, A. udagawae, A. felis, A. hiratsukae, A. fumigatiaffini, A. fischeri)* | | **Frente:** Colonias inicialmente aterciopeladas pueden tornarse pulverulentas finas. Inicialmente blancas luego verde o gris con bordes claros. **Reverso:** variable | | Conidióforos cortos lisos, vesícula en forma de clava. La cabeza pequeña uniseriada, las fiálides se ubican sobre los dos tercios superior de la vesícula. Los conidios se organizan de forma columnar. |

La tinción de azul de algodón de lactofenol es de gran importancia en la micología. A pesar de ser una tinción simple posee características tintoriales que permiten observar los detalles de los componentes fúngicos. El principio de la tinción comienza con el fenol que destruye la flora acompañante actuando como desinfectante, el ácido láctico permite conservar las estructuras fúngicas y el azul de algodón que tiñe la pared del hongo (quitina), permitiéndonos la observación de las estructuras fúngicas.

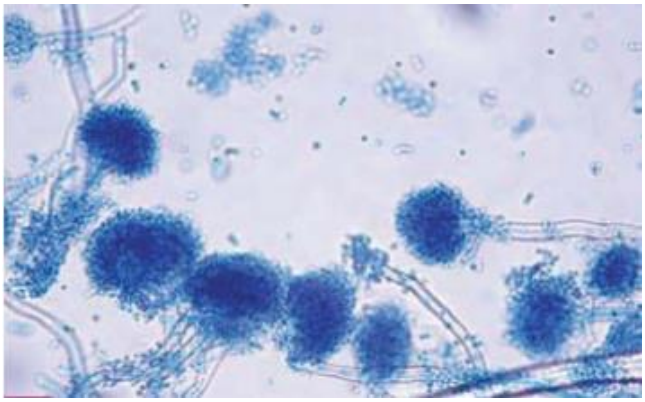


**Figura 12.** *Aspergillus fumigatus* tinción azul de algodón de lactofenol

### III.6.1 Limitantes de la identificación basada en las características morfológicas:

Aunque las técnicas rutinarias pueden dar o brindar una amplia información del microorganismo en cuestión, se deben considerar ciertas limitantes:

1. Se requiere de tiempo para la maduración del hongo, lo que le permitirá la expresión de los cuerpos fructíferos y con esto posteriormente llevar a cabo la identificación.

2. Requiere un micólogo con alta experiencia para reconocer las características de cada especie.

3. Existencia de especies morfológicamente indistinguibles (especies crípticas).

### III.6.2 Identificación molecular de las especies de *Aspergillus* spp.

La identificación molecular es considerada el estándar de oro. Se basa en la amplificación y secuenciación de blancos génicos. En la actualidad, esto ha completado la identificación y ha incrementado el número de especies y subespecies conocidas (43).

Las recomendaciones actuales para la identificación a nivel de especie dentro de las secciones de *Aspergillus* spp., incluye la secuenciación nucleotídica de la región del rDNA del gen 18S, también denominado SSU (*Small Subunit*), el gen 28S o LSU (*Large Subunit*), la región espaciadora interna transcrita ITS1 e ITS 2 por sus siglas en inglés *Internal Transcribed Spacer* y el gen 5.8S (37).

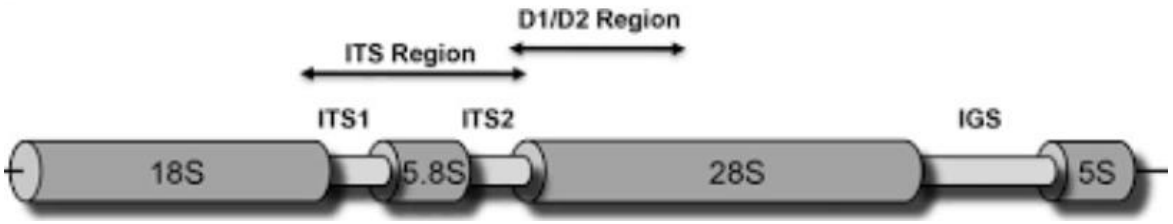



**Figura 13.** Representación esquemática de las regiones estudiadas del rDNA y sus cebadores para secuenciación (44).

Las regiones 18S, 5.8S, 28S están relativamente conservadas entre los hongos (44). Se ha encontrado que las secuencias entre el 18S-5.8S (ITS1) y la secuencia entre el 5.8S-28S (ITS2) son los marcadores más adecuados para el análisis filogenético y taxonómicos de hongos y otros eucariontes, debido a sus secuencias variables (45). Sin embargo, en el caso de las especies de *Aspergillus,* se recomienda el uso de genes adicionales como, β-tubulina o calmodulina como marcadores de identificación secundarios. Es a través de la secuenciación de estos genes que es posible identificar las especies crípticas dentro de las diferentes secciones de *Aspergillus* spp. (37), tal es el ejemplo de las especies dentro de las secciones Fumigati, Usti, Nigri y Terrei (42).

Desafortunadamente, la secuenciación es un proceso que requiere tiempo, de personal con alta experiencia, así como de equipos costosos, lo que limita su uso en los laboratorios clínicos (37).

### III.6.3 Otras tecnologías para la identificación

La identificación molecular al ser una técnica de acceso limitado ha llevado a la búsqueda de nuevas tecnologías de identificación que proporcionen resultados en corto tiempo, sean fáciles de realizar y no requiera de personal con alto entrenamiento.

## III.7 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight o ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo)

La espectrometría de masas surgió a principios del siglo XX, cuando el físico inglés J. J. Thompson construyó el primer prototipo de espectrómetro de masas. Durante muchos años la espectrometría se restringió al estudio de las sustancias termoestables y de bajo peso molecular. En los 40, tras reducir notablemente el tamaño del instrumento, aparecieron los primeros espectrómetros de masas comerciales. En 1948, Cameron construyó el analizador tipo TOF (Time of Flight). Pero no fue hasta los años 80, cuando Tanaka et al., inventaron la técnica MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization) que permitía analizar compuestos orgánicos sin su destrucción durante la fase de ionización, lo que la llevó a conseguir el Premio Nobel. En los 90` se desarrollaron las primeras bibliotecas de espectros de referencia y softwares para la identificación bacteriana. La espectrometría de masas MALDI, se combinó con el tiempo de vuelo (TOF MS) para convertirse en MALDI-TOF MS, que pronto se convirtió en una técnica muy utilizada. En 1994, Caín et al., demostraron que el uso del ácido α-ciano-4-hidroxicinámico como matriz, permitía una identificación bacteriana rápida, sin embargo, en aquella época se utilizaban bacterias pretratadas. Debido a una innovación adicional, hoy en día las colonias bacterianas se pueden aplicar directamente a la placa MALDI sin ningún

tratamiento previo especial antes del análisis (46–48) Las aplicaciones MALDI-TOF MS más simples prueban colonias de bacterias o levaduras sin una preparación complicada y utilizando consumibles mínimos, lo que proporciona una identificación rápida y de bajo costo (46,47).

### III.7.1 Fundamento de MALDITOF MS

MALDI-TOF/MS permite el análisis de proteínas ribosomales en el rango de 2-20kD, rango en el que se encuentran la mayor parte de las proteínas ribosómicas que ofrecen un perfil especie específico (49).

Cualquier espectrómetro de masas tiene 3 elementos principales: la fuente de ionización, el analizador y el detector. En el caso de MALDI-TOF, la fuente de ionización es un láser con longitud de onda de 337 nm, que produce la ionización y desorción de la muestra con la ayuda de una matriz orgánica (ácido α-ciano-4-hidroxi-trans-cinámico [HCCA], la más usada). Para ello, la colonia se deposita sobre la placa MALDI (la cual cuenta con la capacidad de analizar hasta 96 muestras en una misma corrida) y se trata con ácido fórmico para lograr la extracción de proteínas, esta mezcla se expone a una matriz orgánica fotosensible y se deja secar al aire por unos segundos. A continuación, la placa se introduce al equipo MALDI-TOF, el cual hace incidir el rayo láser sobre la muestra. La matriz absorbe y después transmite la energía del láser a la muestra, facilitando su ionización. El segundo elemento de MALDI-TOF es el analizador. Tras la ionización, las proteínas ionizadas se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico y pasan por un analizador. El analizador tipo TOF separa las proteínas ionizadas en relación con su radio masa/carga (m/z). Este radio determina el tiempo que tarda una proteína ionizada en alcanzar el detector (tiempo de vuelo). Como es de esperar las proteínas ionizadas más pequeñas vuelan más rápido, mientras que, las de mayor masa tardan más en alcanzar el detector. Finalmente, una vez que el detector reconoce la llegada de las proteínas, éste las registras y genera un espectro de

masas, el cual se comparará con espectros especie-específicos de referencia contenidos en la biblioteca de equipo y es así como, lograr la identificación(48,50).

Una de las partes más importantes para lograr un buen desempeño en la identificación, es la constitución de la biblioteca, entre más robusta sea ésta, más posibilidades existirán de lograr la identificación. Es fundamental que los laboratorios clínicos utilicen las mismas condiciones de cultivo que fueron utilizadas para la creación de las bibliotecas (tiempo de incubación, tipo de medio de cultivo, técnica de extracción; etc.), ya que estas condiciones pueden influir en el espectro de proteínas que se obtiene y, por lo tanto, en el desempeño final del equipo.

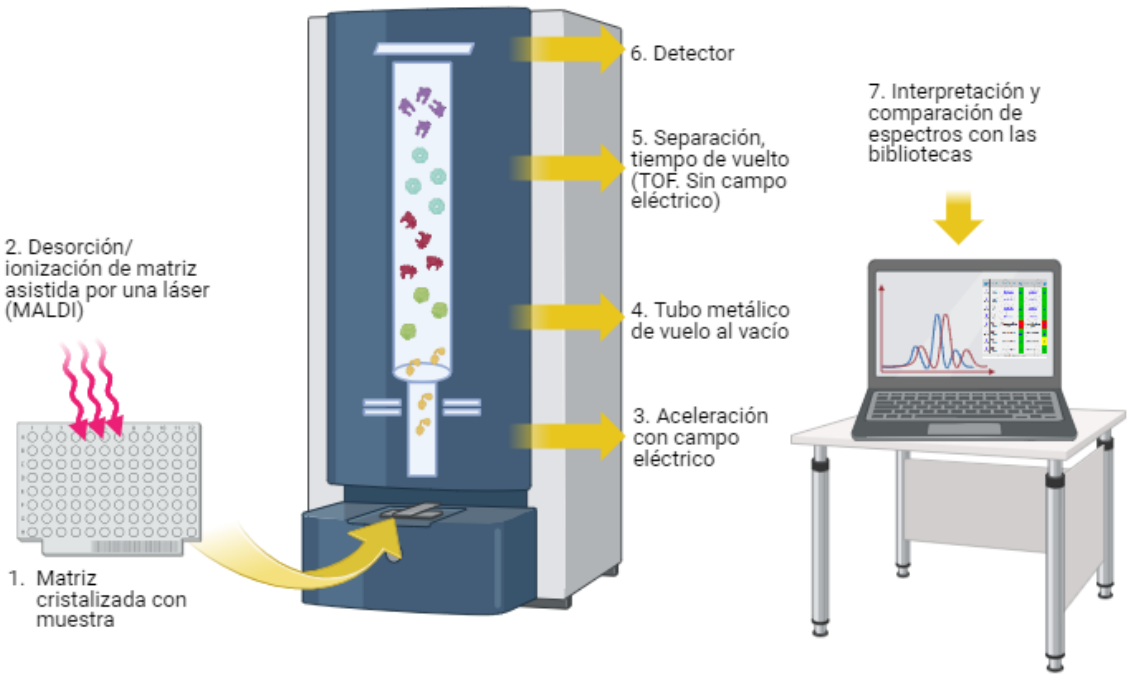



**Figura 14.** Principio de identificación microbiana por MALDI-TOF MS (50).

Esta tecnología ha demostrado ser rápida, precisa y de fácil manejo; en el caso de aislamientos bacterianos comunes, la identificación se logra en menos de 5 min, en comparación a las 24h requeridas con los métodos convencionales (46). Sin duda alguna esta tecnología ha venido a revolucionar la identificación microbiana en los laboratorios de microbiología clínica.

## III.8 Plataformas comerciales de MALDI-TOF

Actualmente, existen diferentes plataformas comerciales de MALDI-TOF en el mercado, con el mismo fundamento, la diferencia radica en la biblioteca que cada una utiliza.

- VITEK MS
- VITEK MS PRIME
- Axima SARAMIS (Shimadzu / AgnosTec, Duisburg, Germany)
- ASTA MicroIDSys (ASTA Inc., Suwon, Korea)
- Andromas (Andromas SAS, Paris, France)
- Xiamen Microtyper (China)
- MALDI Biotyper SIRIUS
- MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany)

Las plataformas actualmente disponibles en nuestro país son, MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) y VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) (48).

## III.9 MALDITOF en la identificación de bacterias

En 2009 se publicó, el que, probablemente fue uno de los artículos clave para dar a conocer de forma general el potencial de MALDI-TOF. En él, se analizaron 1660 aislamientos (incluidos 45 géneros y 109 especies), incluyendo bacterias Gram positivas, Gram negativas, aerobias y anaerobias. MALDI-TOF (Bruker Daltonics) con su biblioteca Biotyper FFLv2.0 identificó el 95.5% de los aislamientos. De estos, el 84.1% produjeron la misma identificación de especie mediante MALDI-TOF y el 11.3% produjo la misma identificación a nivel de género. Los valores de puntuación para la identificación fueron modificados a los propuestos por el fabricante: una puntuación de ≥1.9 indicó identificación de especie, una puntuación de 1.7- 1.89 indicó identificación de género y una puntuación ≤1.7 indicó no identificación. Se consideró que un aislamientos estaba correctamente identificado mediante MALDI-TOF si 2 de 4 espectros tenían una puntuación de 1.9 para la identificación de especie o 1.7 para la identificación de género. En este trabajo, los autores refirieron la importancia de contar con bibliotecas amplias, tanto en el número de géneros y especies incluidos como en el número de espectros representando una misma especie (51). Sin embargo, la modificación en los scores para establecer una identificación es de considerarse ya que al establecer estos criterios no recomendados por el fabricante puede sesgar los resultados obtenidos.

Un estudio realizado en España en 2010 mostró una correlación del 100% entre MALDI-TOF y la metodología convencional en la identificación, a nivel de especie, de bacterias Gram negativas y del 87.7% en la identificación de bacterias Gram negativas incluyendo diferentes especies de *Yersinia, Aeromonas, Plesiomonas*, *Brucella, Francisella, Achromobacter, Stenotrophomonas, Burkholderia*. Al igual que en otros estudios, los problemas de identificación se dieron principalmente por la falta de espectros en la biblioteca, más que a limitaciones del método (52).

En otro estudio analizaron 561 asilados bacterianos poco frecuentes provenientes de muestras clínicas (105 asilados *Enterobacteriaceae* [11 géneros], 29 bacilos Gram negativos no fermentadores [6 géneros], 74 organismos fastidiosos [9 géneros], 64 cocos Gram positivos [13 géneros], 9 bacilos Gram positivos [5 géneros] y 280 bacterias anaerobias estrictas [8 géneros]. Como estándar de oro utilizaron la secuenciación del gen ARNr 16S. De los 281 aislamientos aerobios evaluados, el 95.7% (269/281) fue correctamente identificados a nivel de género o especie. El porcentaje de identificación correcta más alto se observó en el grupo de las enterobacterias, mientras que, el porcentaje más bajo se observó en el grupo de bacilos Gram positivos (56% de identificación correcta a nivel de género y especie, 22% sólo a nivel de género y no se obtuvo identificación en el 22% restante (53).

Se han planteado algunas limitaciones que podían tener trascendencia clínica, como la incapacidad para diferenciar entre *Escherichia coli* y *Shigella* o la dificultad para diferenciar serovariedades de *Salmonella entérica*. Estudios más recientes sugieren que es posible salvar estas limitaciones al utilizar programas informáticos como FlexAnalysis y ClinProTools (Bruker Daltonics GmbH, Alemania), con los que se han identificado picos específicos que permiten diferenciar *E. coli* y *Shigella* en el 90% de los casos. Otros autores lograron la identificación correcta de 60/64 aislamientos de *E. coli* y 110/116 aislamientos de *Shigella* cuando incrementaron el número y variedad de perfiles de *E. coli* y *Shigella* presentes en la biblioteca de referencia (54,55).

Por otro lado, esta es una de las tecnologías más prometedoras, actualmente disponibles, para la identificación de patógenos microbianos directamente de cultivos de sangre positivos. Se ha demostrado un valor predictivo positivo del 60-80% para diferentes especies de microorganismos. Este abordaje permite obtener resultados de manera más rápida, permitiendo así la implementación rápida del tratamiento, reduciendo el tiempo de internamiento en las unidades de cuidados intensivos, duración de la hospitalización y tasas de mortalidad (56).

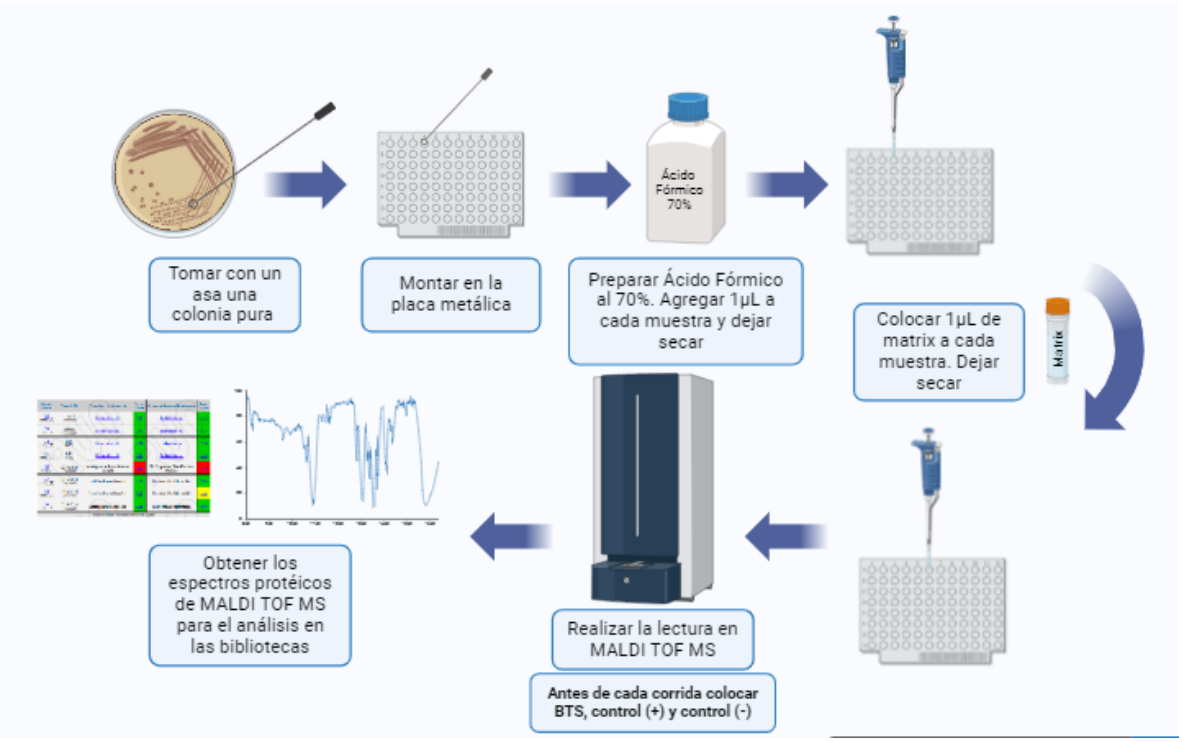



**Figura 15.** Flujo de trabajo para la identificación por depósito directo sobre la placa (46).

## III.10 MALDITOF en la identificación de levaduras

En la identificación de levaduras, MALDI TOF ha mostrado, desde un principio, resultados excelentes, diferenciando incluso especies difíciles de discriminar por métodos convencionales, como lo es el caso de las especies del complejo *Cándida parapsilosis* (52).

Un estudio reciente analizó 6,192 aislamientos de levaduras, las cuales se agruparon en 42 especies diferentes; *Candida albicans* fue la especie recuperada con mayor frecuencia (68.6%) seguida de *C. glabrata* (10.2%), *C. tropicalis* (5.3%), *C. parapsilosis* (5%), *and C. krusei* (2.5%). Estas 5 especies representaron más del 90% de las levaduras aisladas. El 90.87% de los aislamientos (5,627/6,192) se identificaron a nivel de especie (score ≥ 2) en el primer intento, en el segundo intento se identificaron 490/565 aislamientos no identificados al inicio, alcanzando un 98.8%

de las identificaciones. Dentro del complejo *C. glabrata*, la identificación de *C. glabrata* y *C. bracarensis* fue exitosa en el 96.5% y 100% de los aislamientos, respectivamente; solo una *C. nivariensis* no pudo ser identificada. *C. guilliermondii, C. famata* y *C. palmioleophila*, bioquímicamente similares, se identificaron sin ambigüedades mediante MALDI-TOF MS en el 83.3%, 100% y 100% de los casos respectivamente. Las especies crípticas como *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* dentro del complejo *C. parapsilosis* se diferenciaron sin ambigüedades. En el caso de *C. metapsilosis y C. orthopsilosis* (complejo *C. parapsilosis*), MALDI tuvo problemas para identificar correctamente algunos de los aislamientos, los cuales requirieron de secuenciación. Las especies estrechamente relacionadas, *C. albicans* y *C. dubliniensis* fueron las más difíciles de distinguir, de hecho, el 7.4% de los aislamientos de *C. dubliniensis* requirieron secuenciación nucleotídica debido al bajo score (<2). Seis aislamientos no se pudieron identificar, tres (C. *pruinosa, Rhodotorula dairenensis* y *Trichosporon faecale), l*os cuales no se encontraban en la biblioteca, mientras que, de los otros tres (*C. nivariensis, Geotrichum candidum* y *Trichosporon inkin*), la biblioteca solo contaba con una o dos referencias (56).

Otro estudio evaluó el desempeño de MALDI-TOF en la identificación de especies que se aíslan con mayor frecuencia en la clínica. Se evaluaron 100 aislamientos y las lecturas se realizaron con un espectrómetro de masas Microflex LT y el software Flex Control (versión 3.0, Bruker Daltonics). La identificación convencional se realizó con métodos estándar, mientras que las discordancias se resolvieron por secuenciación de los ITS1 e ITS2. MALDI-TOF mostró 97% de identificaciones correctas a nivel de género y 96.5% a nivel de especie (57).

Un estudio reciente realizado en México analizó 304 levaduras (*Cándida* spp. y *Cryptococcus* spp.) aisladas de micosis superficiales y profundas. Se realizaron tres tipos de identificación, por pruebas micológicas y asimilación de carbohidratos (VITEK® 2YST ID-card); identificación proteómica por MALDI-TOF MS e identificación por secuenciación de ITS. Se obtuvo una sensibilidad de 94.6%

(IC95%: 86.2 - 96.4%) y especificidad de 99% (IC95%: 92.9 - 99.3%) para MALDI-TOF (58).

Para el caso de levaduras, dado la complejidad de las paredes celulares, en comparación con las bacterias, se requiere de un proceso de extracción en tubo con ácido fórmico y acetonitrilo, lo cual toma aproximadamente 15 min.

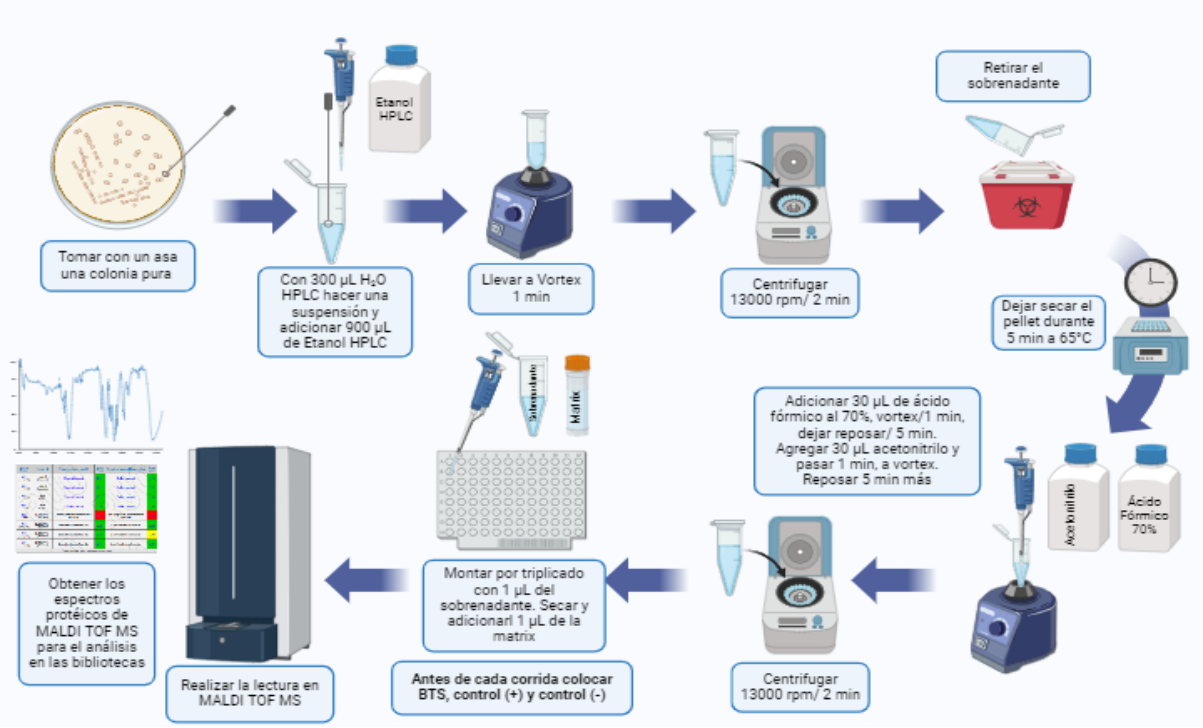



**Figura 16.** Flujo de trabajo para la identificación de levaduras por el método de extracción en tubo.

## III.11 MALDI-TOF en la identificación de hongos filamentosos

La adaptación de MALDI-TOF para la identificación de hongos filamentosos ha sido mucho más lenta debido a la dificultad de romper su pared celular para lograr la extracción de proteínas, así como a la falta de representación de especies de importancia clínica en las bibliotecas. Estos factores han obligado a investigadores a desarrollar y evaluar nuevos métodos de extracción de proteínas fúngicas y a crear sus propias bibliotecas en las que han incluido más especies de hongos filamentosos y un mayor número de espectros de cada especie, lo cual, ha sido crucial para alcanzar mayor eficacia en la identificación. El esfuerzo de esta tarea ha sido grande, sin embargo, esto ha permitido la identificación rápida de hongos filamentosos en los laboratorios clínicos (52,59).

Un problema adicional en el caso de la identificación de hongos filamentosos por MALDI-FOT, es la existencia de diferencias significativas en los espectros de proteínas obtenidos en función de la antigüedad de los cultivos. La solución a esto pasa con la creación de bibliotecas amplias y complejas que incorporen espectros de proteínas a partir de cultivos con diferente antigüedad. Sin embargo, se recomienda que la identificación se realice en los primeros dos días de desarrollo para evitar el exceso de producción de esporas o de melanina que, en el caso de los hongos negros dificultan su identificación. Algunos fabricantes recomiendan la extracción tras un cultivo de un día en caldo, aunque esto repercute en un retraso de 24 h en la emisión del resultado (52).

En un estudio, seleccionaron 83 hongos no dematiáceos y no dermatofitos de diferentes géneros (*Acremonio, Aspergillus, Beauveria, Crisosporio, Fusarium, Lichtheimia, Mucor, Paecilomyces, Penicillium, Rizopus, Scedosporio, Esquizofilo, Escopulariopsis, Trichoderma, Trichuro*), los cuales fueron identificados mediante caracterización fenotípica y análisis de secuencia de la región ITS. La preparación de los aislamientos se realizó conforme a las recomendaciones del fabricante (cultivo en medio líquido). La adquisición y el análisis de los espectros de masas se realizó mediante el MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonik) utilizando el software MALDI Biotyper (versión 3.0) con la biblioteca Filamentous Fungi versión 1.0 (Bruker

Daltonik). MALDI Biotyper identificó correctamente 65/83 asilados (78.3%) a nivel de género y 45/83 aislamientos (54.2%) a nivel de especie; 18/83 aislamientos (21.7%) no fueron identificados (60).

Becker y col., Decidieron comparar el método de identificación basado en morfología vs MALDI TOF. Analizaron 390 hongos filamentos donde el 95,4 % (372/390) fueron identificados correctamente a nivel de especie por MALDI-TOF MS con puntuaciones variables que oscilaron entre 1.22-2.62, y solamente el 85,6 % (334/390) tuvieron una puntuación por encima del límite de confiabilidad del fabricante con la FFLv3.0 (61).

El uso de MALDI-TOF MS para la identificación de hongos filamentosos se ha retrasado debido a la reducida diversidad de espectros fúngicos en las bibliotecas comerciales (59). Sabemos que existe una creciente literatura sobre la utilidad de MALDI-TOF en la identificación de hongos filamentosos. Sin embargo, el proceso aún carece de estandarización (62).

## III.12 Bibliotecas utilizadas para la identificación de hongos filamentosos por MALDI-TOF

Las tasas de identificación de hongos varían según la biblioteca utilizada y la variedad de los aislamientos utilizados (63). Actualmente, se cuenta con tres tipos de bibliotecas, 1. Bibliotecas comerciales, que han demostrado tener sus limitaciones, dado que incluyen espectros de hongos que de sólo una parte de los cientos de patógenos humanos, animales y vegetales ya reconocidos (63,64). 2. Bibliotecas creadas por los propios usuarios (bibliotecas comerciales suplementadas con espectros caseros) que han demostrado que mejoran sustancialmente el porcentaje de identificaciones correcta tanto a nivel de género como de especie (65); y 3. Bibliotecas en línea de libre acceso, por ejemplo, la biblioteca del CDC, la biblioteca de los Institutos Nacionales de Salud en los Estados Unidos (NIH) y la biblioteca de identificación de espectros de masas MSI creadas por investigadores internacionales (fue desarrollado en colaboración entre Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, la Universidad de la Sorbona y la colección BCCM/IHEM/Sciensano en Bruselas), para mejorar la identificación de los hongos filamentosos (59,66).

La primera biblioteca de espectros de hongos (diseñada para análisis de espectros obtenidos mediante MALDI-TOF Biotyper) fue publicada en 2013 por investigadores de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) de América del Norte, contenía espectros de 294 cepas de 152 especies y 76 géneros. Esta biblioteca no solo contenía el doble de cepas que la biblioteca de Bruker (Filamentous Fungi Library 1.0) disponible simultáneamente, sino que también simplificó el método de preparación de muestras. La biblioteca NIH se creó extrayendo los hongos directamente del medio agar en lugar de utilizar medio de cultivo en caldo, el método utilizado para generar la biblioteca de Bruker (63).

Más tarde, en 2014, investigadores europeos publicaron tomando en cuenta que MALDI TOF se basa principalmente en una biblioteca extensa con espectros de referencia, se construyó una biblioteca interna que contenía 760 cepas representando 472 especies en 390 aislamientos clínicos comparando MALDI-TOF

con el método de identificación clásico basado en observaciones morfológicas. Se utilizaron un total de 390 aislamientos de hongos filamentosos clínicos en los dos hospitales durante el período de un año indicado. Primeramente, usando la biblioteca interna, 10 aislamientos no pudieron ser reconocidos, debido a que no estaban presentes espectros en la biblioteca; también 3 más no pudieron ser identificados (un *Acremonium* estricto, una *Alternaria infectoria* y un *Mucor hiemalis*) a pesar de que estas especies si contaban con espectro en la biblioteca. De las 377 identificaciones interpretables restantes, 372 (95,4 % del total de muestras) fueron identificadas correctamente a nivel de especie por MALDI-TOF MS con puntuaciones variables que oscilaron entre 1.22 y 2.62 (61,67).

En 2017, se creó e implementó en línea la primera aplicación web (MSI1) para permitir a los micólogos de todo el mundo identificar espectros de masas de hongos obtenidos por MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics Bremen, Alemania). Esta aplicación, en su primera versión contenía 11,815 espectros representando a 938 especies pertenecientes a 246 géneros, representando a 1913 cepas. Esta biblioteca se estableció como un sistema de identificación en línea y se hizo accesible para la comunidad de micología médica de manera gratuita (63). En 2019, esta biblioteca fue actualizada a su versión MSI2, que está actualmente disponible en https://msi.happy-dev.fr, esta nueva versión, contiene representadas más de 1300 especies pertenecientes a 358 géneros (64).

En 2018 en la Universidad de Manitoba, Winnipeg, MB, Canadá, evaluaron el rendimiento de MALDI-TOF Bruker Microflex para la identificación de aislamientos clínicos y cepas de referencia de hongos. Se utilizaron 3 bibliotecas para comparar el rendimiento de estas: MALDI Biotyper FFLv1.0, Bruker; la biblioteca de NIH y la MSI1. Todos los aislamientos fueron identificados previamente por secuenciación la cual se centró en la región ITS2 del ARNr. Para ciertas cepas se secuenciaron genes adicionales, incluido del gen parcial de la β-tubulina o factor de elongación 1α. La biblioteca MSI demostró la tasa más alta tasa de identificaciones a nivel de especie 72.0% (159/221) en comparación con las bibliotecas NIH que obtuvo 19.5% (30/221/) y Bruker 13.6% (43/221). El 22.6% de hongos permanecieron sin

identificar a nivel de especie por ninguna de las 3 bibliotecas, esto debido principalmente a limitaciones de la biblioteca o espectros imperfectos. Las razones de este número relativamente alto de cepas no identificadas fue la falta de espectros de referencia en las bibliotecas o, en 12 casos, un procedimiento de extracción que resultó en la ausencia de picos espectrales (63). Para la extracción de proteínas se realizó en tubo, razón que puede explicar el bajo rendimiento de la biblioteca de Bruker.

Lau y col., en 2020 analizaron el rendimiento de 2 bibliotecas, con 421 aislamientos clínicos. Utilizaron la biblioteca de los Institutos Nacionales de salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) que logró una identificación del 88.9% (370/421) en comparación a la biblioteca más actualizada de Bruker (FFLv3.0) que solo logró identificar 0.7% (3/421) a nivel de especie (59). En este ensayo utilizaron la última versión de la biblioteca de Bruker, sin embargo, el rendimiento no fue el esperado, al tener una biblioteca más robusta la tasa de identificación sería mejor. Cabe destacar que ellos realizaron una extracción con medio sólido, una técnica diferente al establecido por Bruker, lo que puede explicar el bajo rendimiento de la FFLv3.0.

En 2021 en Francia, Normand et al., evaluaron 633 aislamientos, correspondientes a 124 especies y 26 géneros de hongos filamentosos no dermatofitos. Dentro de este grupo se establecieron 273 aislamientos de *Aspergillus* de 39 especies. Evaluaron el rendimiento de FFLv3.0 (Bruker Daltonics), MSI1 y MSI2. Las tasas de identificación a nivel de especie fueron 27.1%, 69.23% y 89.74% respectivamente. El rendimiento de identificación a nivel de especie de la aplicación MSI2 fue significativamente mejor que las otras. Con el resto de los 633 aislamientos la aplicación MSI2 tuvo un mejor rendimiento de identificación a nivel de especie que MSI-1 y FFLv3.0, alcanzando un 83.25% de identificaciones correctas, en comparación con el 63.19% (MSI1) y el 21.8% (Bruker con un umbral de 2.0). La aplicación MSI2 funcionó especialmente bien para las especies de *Aspergillus* y *Fusarium*, incluidas muchas especies crípticas, alcanzando un 90 % de identificaciones correctas para las especies de *Aspergillus* y un 78 % para las especies de *Fusarium*, en comparación con el 69 % y el 43 % con MSI1 (64).

En 2022 en Ontario Canadá, evaluaron el rendimiento de la biblioteca Filamentous Fungi v3.0 de Bruker y la MSI2. Este es el estudio más reciente que se tiene registrado con las bibliotecas más actualizadas disponibles. También examinaron otras dos variables, el efecto del medio de cultivo y el tiempo de incubación sobre la precisión de la identificación de hongos. Bruker logró la identificación correcta, a nivel de especie, del 85.7% de *Aspergillus,* 90% de *Mucorales,* y 94.4% de los *Fusarium* a nivel de complejo (62).

A pesar de estas limitantes el sistema MALDI-TOF MS se perfila como una herramienta altamente precisa, útil para la identificación de cepas clínicamente relevantes (63). En la actualidad, las bibliotecas continúan incorporando nuevos espectros con el objetivo generar bibliotecas cada vez más robustas. Por ejemplo, la Filamentous Fungi Library 2.0 de MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) comprendía 152 especies de hongos filamentosos pertenecientes a 58 géneros. Sin embargo, la biblioteca más actualizada, Filamentous Fungi Library 4.0 de MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), contiene 856 espectros compuestos por cepas de referencia, clínicas y ambientales, estos espectros fueron obtenidos a partir de cultivos en medio líquido. Agregando finalmente 312 espectros nuevos, con un total de 247 especies y 27 cepas identificadas a nivel de género. Así como la última versión de MSI2 que contiene más de 1300 especies.

La importancia de contar con una biblioteca robusta es fundamental, puede mejorar la identificación desafortunadamente la elaboración y la validación de estas bibliotecas es compleja y en muchas ocasiones no está al alcance de muchos usuarios. Así como utilizar una técnica de extracción de proteínas que nos permita tener espectros de calidad al momento de ser analizados.

Con estos antecedentes y problemáticas nos planteamos la siguiente pregunta de investigación.

# IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Las infecciones fúngicas invasivas causadas por las especies de *Aspergillus* spp., tienen altas tasas de mortalidad. Recientemente, se ha descrito la existencia de especies cripticas, hermanas de la misma sección y que morfológicamente pueden ser indistinguibles, algunas con resistencia intrínseca a los antifúngicos comunes utilizados en la práctica clínica. Por lo que, es fundamental conocer la especie particular responsable de la infección para establecer el tratamiento adecuado en el menor tiempo posible. La identificación de las especies de *Aspergillus* spp., se basa históricamente en las características morfológicas, macro y microscópicas, pero esta identificación no siempre es confiable.

En nuestro país no se han realizado estudios comparativos de las bibliotecas disponibles para la identificación de *Aspergillus* spp., por lo que nos planteamos la pregunta

¿Cuál será el desempeño de las bibliotecas Filamentous Fungi Library v4.0 y MSI2 en la identificación de especies de *Aspergillus* spp.?

## V. JUSTIFICACIÓN

El estándar de oro en la identificación de las especies de *Aspergillus* spp., es el análisis molecular de genes como β-tubulina y calmodulina. Sin embargo, este tipo de procedimientos se encuentra disponible solo en unos cuantos laboratorios de referencia. Por otro lado, MALDI-TOF es una herramienta que ha venido a revolucionar el diagnóstico microbiológico, permite la identificación de bacterias y levaduras en tan solo unos cuantos minutos y, cada vez ha ido reemplazando los métodos de identificación convencionales.

Para los hongos filamentosos, el uso de MALDI-TOF ha sido mucho más limitado. Se ha descrito que la robustez de la biblioteca, entre otros factores, que se utilizan para la identificación juega un papel importante en el desempeño de esta herramienta. Bruker Daltonics recientemente actualizó la biblioteca FFLv3.0 a la FFLv4.0 por lo que se espera que su desempeño se vea significativamente mejorado. La biblioteca de libre acceso MSI se actualizó de su versión 1 a la 2 recientemente, por lo que también se espera mejoría en las tasas de identificación correcta de estas especies. Si bien la implementación de esta herramienta en el laboratorio clínico traerá grandes beneficios, hay que conocer el desempeño de estas bibliotecas antes de usarlas de manera rutinaria en la identificación de los microorganismos, ya que puede llevar a la implementación de tratamientos inadecuados y tener un impacto negativo en el desenlace de los pacientes.

## VI. HIPÓTESIS

El desempeño de FFLv4.0 de Bruker Daltonics Bremen, Germany será similar a la de MSI2 en la identificación de las especies de *Aspergillus* spp., por la tecnología MALDI-TOF MS a partir de cultivo en medio líquido.

# VII. OBJETIVOS

## VII.1 Objetivo general

- ✓ Determinar el desempeño las bibliotecas FFLv4.0 y MSI2 en la identificación de las especies de *Aspergillus* por la tecnología MALDI-TOF MS a partir de cultivo en medio líquido.

## VII. 2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar las tasas de identificación correcta a nivel de género y especie por ambas bibliotecas
- ✓ Determinar las tasas de aislamientos sin identificación por ambas bibliotecas
- ✓ Determinar el porcentaje de error en la identificación que tienen ambas bibliotecas.

# VIII. MATERIAL Y MÉTODO

## VIII.1 Tipo de estudio

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo observacional descriptivo.

## VIII.2 Población de estudio

Se utilizaron un total de 228 aislamientos de *Aspergillus* spp., recuperados de muestras de pacientes hospitalizados en el INCMNSZ desde el mes de octubre de 2014 a abril de 2021, e identificados inicialmente por morfología macroscópica y microscópica. Como estándar de oro para la identificación a nivel de sección y especie se realizó mediante métodos moleculares (construcción de árboles filogenéticos a partir de la secuencia de los genes β-tubulina y calmodulina).

### VIII.2.1 Criterios de inclusión

- ✓ Todos los aislamientos microbiológicos identificados como *Aspergillus* spp. a partir de métodos moleculares y construcción de árboles filogenéticos.

### VIII.2.2 Criterios de exclusión

- ✓ *Aspergillus* spp., contaminados con otro tipo de microorganismo.

## VIII.3 Variables

### VII.3.1 Dependiente

- ✓ Espectros de proteínas.

### VII.3.2 Independiente

- ✓ Aislamientos microbiológicos de *Aspergillus* spp.
- ✓ Bibliotecas FFLv4.0 y MSI2

## VIII.4 Técnicas e instrumentos

### VII.4.1 Cepas de referencia

- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922

### VIII.4.2 Recuperación de los aislamientos de *Aspergillus* spp. desde el cepario

Los aislamientos de *Aspergillus* spp. Se extrajeron del cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica y se sembraron en agar Sabouraud, se incubaron a 30°C entre 24-96 horas, nos aseguramos de la pureza de los aislamientos y realizamos una segunda resiembra en las mismas condiciones previamente mencionadas.

### VIII.4.3 Equipo MALDI-TOF y bibliotecas utilizadas

Para la generación de los espectros utilizamos el equipo MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics Bremen, Germany). Los espectros fueron analizados con la biblioteca Filamentous Fungi Library v4.0 (del mismo fabricante) y con la biblioteca MSI2 v2.0

## VIII.5 Procedimiento

### VIII.5.1 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó a partir de cultivo en caldo, se eligió este procedimiento de extracción debido a que fue el método usado por el fabricante (Bruker Daltonics Bremen Germany) para la generación de su Filamentous Fungi Library.

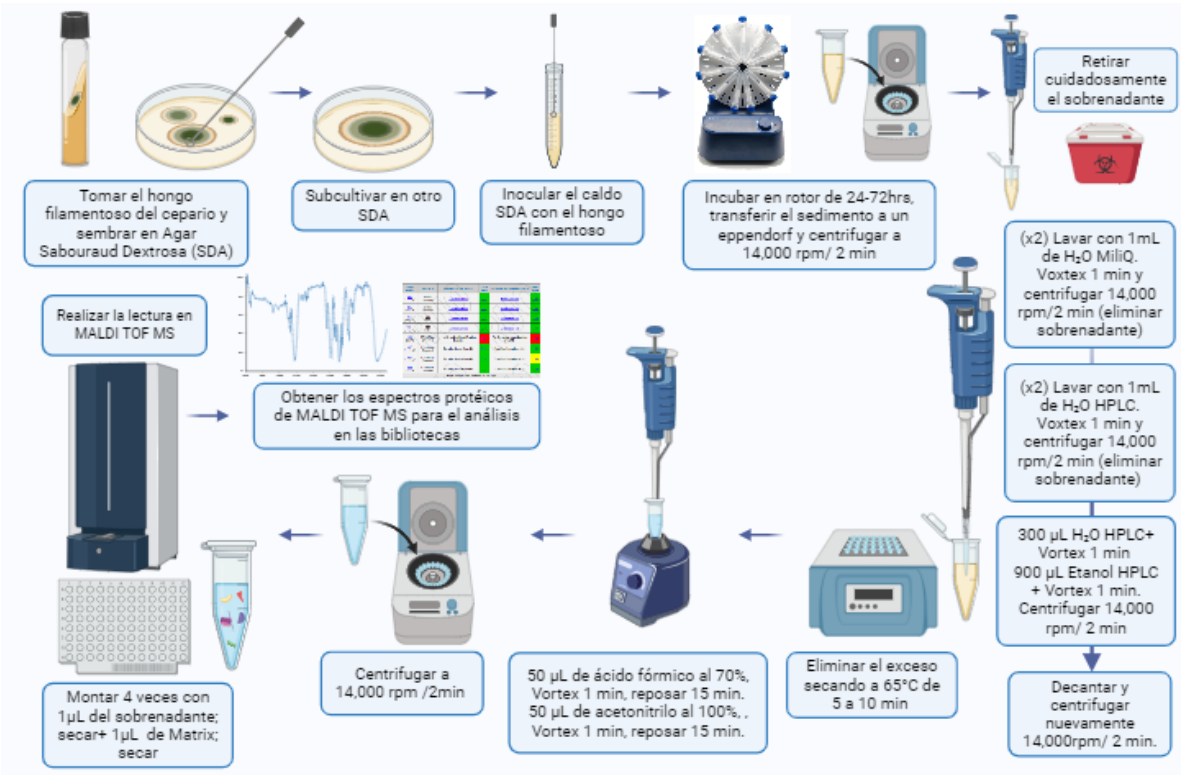



**Figura 17.** Proceso de identificación por MALDI-TOF MS

### VIII.5.2 Interpretación de resultados

Los scores utilizados para la identificación a nivel de sección y especie fueron los establecidos por cada biblioteca siendo los siguientes:

**Cuadro 4.** Criterios de interpretación establecidos por Bruker Daltonics Bremen, Germany.

| Rango de Scores | Interpretación |
|---|---|
| **2.00-3.00** | Identificación correcta a nivel de especie |
| **1.70-1.99** | Identificación correcta a nivel de sección o género |
| **0.00-1.69** | Identificación no posible |

**Cuadro 5.** Criterios de interpretación establecidos por MSI2

| Índice | Interpretación | Prueba realizada |
|---|---|---|
| **A** | Identificación correcta a nivel de especie | (1st score>22 and 1st-2nd>8) o (1st>20 but<=22 and 1st-2nd>2) |
| **B** | Identificación correcta a nivel de sección o género | (1st score>22 and 2nd score >20 and 1st-2nd <8) or (1st>20 but<=22 and 1st-2nd>2) |
| **C** | Identificación no posible | (1st and 2nd score <20) |

### VIII.5.3 Definiciones

- ✓ Se definió como identificación correcta cuando la FFLv4.0 o MSI2 identificaron a *Aspergillus* con un score ≥2 o A índex y la identificación molecular correspondía a la misma especie.

## VIII.6 Análisis estadístico

- ✓ Se calculó la precisión de identificación de ambas bibliotecas FFLv4.0 y MSI2.
- ✓ Se calculó la concordancia entre la FFLv4.0 y MSI2 para la identificación a nivel de sección y especie.
- ✓ Se utilizó análisis estadístico descriptivo, frecuencias y proporciones.

# IX. RESULTADOS

Se analizaron 228 aislamientos de *Aspergillus* spp., recuperados de muestras de pacientes del INCMNSZ de octubre de 2014 hasta abril de 2021. En el cuadro 6 se muestra el desglose de las secciones y especies involucradas, cabe recordar que estos aislamientos fueron identificados previamente mediante secuenciación parcial del gen β- tubulina y calmodulina.

**Cuadro 6.** Aislamientos de *Aspergillus* spp., analizados

| Sección | Especies | Cantidad | Total |
|---|---|---|---|
| **Fumigati** | *A. fumigatus* | 117 | **125** |
| | *A. lentulus* | 3 | |
| | ***A. hiratsukae*** | 3 | |
| | ***A. fumisynnematus*** | 2 | |
| **Flavi** | *A. flavus* | 35 | **38** |
| | *A. tamari* | 3 | |
| **Nigri** | *A. niger* | 10 | **36** |
| | ***A. costaricaensis*** | 2 | |
| | ***A. luchuensis*** | 3 | |
| | ***A. neoniger*** | 5 | |
| | ***A. phoenix*** | 2 | |
| | ***A. piperis*** | 1 | |
| | ***A. tubingensis*** | 9 | |
| | *A. welwitschiae* | 4 | |
| **Terrei** | *A. terreus* | 12 | **14** |
| | ***A. niveus*** | 1 | |
| | ***A. neoafricanus*** | 1 | |
| **Versicolor** | *A. sydowii* | 8 | **10** |
| | *A. versicolor* | 1 | |
| | ***A. creber*** | 1 | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Nidulantes** | ***A. quadrineleatus*** | 1 | **5** |
| | *A. versicolor* | 2 | |
| | *A. creber* | 2 | |
| | | | **228** |

Las especies marcadas en azul no se encuentran representadas en la Filamentous Fungi Library v4.0
Las especies marcadas en marrón no se encuentran representadas en ninguna de las 2 bibliotecas (Filamentous Fungi Library v4.0 y MSI2)

Las tasas de identificación correcta general a nivel de sección de los aislamientos de *Aspergillus* fue del 96% (219/228) para la FFLv4.0 y del 82% (186/228) para MSI2; mientras que las tasas de identificación correcta a nivel de especie fueron del 72% (165/228) para la FFLv4.0 y del 55% (126/228) para MSI2. La FFLv4.0 tuvo una tasa de identificación errónea a nivel de especie del 16% (37/228) en comparación al 6% (14/228) de MSI2. Finalmente, la FFLv4.0 no pudo identificar 4% (9/228) de los aislamientos de *Aspergillus*, mientras que MSI2 no logró identificar el 18% (42/228) de los aislamientos.

En la tabla 1 se muestra el desempeño de la FFLv4.0 y MSI2 para la identificación de cada una de las secciones de *Aspergillus.*

**Tabla 1.** Rendimiento de la FFLv4.0 y MSI2 para la identificación de cada una de las secciones de *Aspergillus* analizadas.

| Sección (Total) | MALDI Biotyper FFLv4.0 | | | | MSI2 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Identificación correcta de la sección (%) | Identificación correcta de la especie (%) | No identificados (%) | Identificaciones erróneas a nivel de especie (%) | Identificación correcta de la sección (%) | Identificación correcta de la especie (%) | No identificado (%) | Identificaciones erróneas a nivel de especie (%) |
| **Fumigati (125)** | 120 (96) | 107 (86) | 5 (4) | 3 (2) | 98 (78) | 87 (70) | 27 (22) | 2 (2) |
| **Flavi (38)** | 36 (95) | 32 (84) | 2 (5) | 0 (0) | 31 (82) | 27 (71) | 7 (18) | 0 (0) |
| **Nigri (36)** | 35 (97) | 10 (28) | 1 (3) | 24 (67) | 33 (92) | 4 (11) | 2 (6) | 9 (26) |
| **Terrei (14)** | 13 (93) | 10 (71) | 1 (7) | 2 (14) | 12 (86) | 3 (21) | 2 (14) | 2 (14) |
| **Versicolor (10)** | 10 (100) | 2 (20) | 0 (0) | 7 (70) | 7 (70) | 3 (30) | 3 (30) | 1 (10) |
| **Nidulantes (5)** | 5 (100) | 4 (80) | 0 (0) | 1 (20) | 5 (100) | 2 (40) | 0 (0) | 0 (0) |

La identificación correcta por cada sección analizada (Fumigati, Flavi, Nigri, Terri, Versicolor y Nidulantes) fue superior con FFLv4.0 en comparación con MSI2. La tasa más alta de identificación correcta a nivel de especie se observó en la sección Fumigati con un 86% (107/125) y la sección Flavi con un 84% (32/38) para FFLv4.0 en comparación con el 70% (87/125) para la sección Fumigati y el 71% (27/38) para la sección Flavi con MSI2. Cabe mencionar que *A. unguis, A. flavus* y *A. tamari* son las únicas especies que fueron correctamente identificadas por ambas bibliotecas.

La identificación errónea fue más frecuente entre las especies de la sección Nigri con FFLv4.0 (67 %, 24/36) y MSI2 (26 %, 9/36) y la sección de los Versicolor (70%, 7/10) con FFLv4.0

En los cuadros 7 y 8 se detallan los aislamientos con identificaciones erróneas a nivel de especie. Como se mencionó anteriormente, la FFLv4.0 tuvo 37 identificaciones erróneas [tres de la sección Fumigati, veinticuatro de la sección Nigri, dos de la sección Terrei, siete de la sección Versicolor y una de la sección Nidulantes] en comparación con MSI2 que tuvo solo 14 identificaciones erróneas [dos de la sección Fumigati, nueve de la sección Nigri, dos de la sección Terrei y una de la sección Versicolor].

**Cuadro 7**. Aislamientos identificados erróneamente a nivel de especie por la biblioteca FFLv4.0

| Sección | Identificación Molecular | Identificación por la FFLv4.0 |
|---|---|---|
| Fumigati | 2 *A. fumisynematus* | *A. lentulus* |
| | 1 *A. fumigatus* | *A. lentulus* |
| Nigri | 1 *A. costaricaensis* | *A. niger* |
| | 5 *A. neoniger* | *A. niger* |
| | 1 *A. piperis* | *A. niger* |
| | 9 *A. tubingensis* | *A. niger* |
| | 3 *A. luchuensis* | *A. niger* |
| | 1 *A. phoenix* | *A. niger* |
| | 4 *A. welwitschiae* | *A. niger* |
| Terrei | 1 *A. neoafricanus* | *A. terreus* |
| | 1 *A. neoafricanus* | *A. terreus* |
| Versicolor | 6 *A. sydowii* | *A. versicolors* |
| | 1 *A. creber* | *A. versicolors* |
| Nidulantes | 1 *A. quadrilineatus* | *A. nidulans* |

Las especies marcadas en azul no se encuentran representadas en la Filamentous Fungi Library v4.0.
Las especies marcadas en marrón no se encuentran representadas en la Filamentous Fungi Library v4.0 ni en la MSI2

**Cuadro 8**. Aislamientos identificados erróneamente a nivel de especie por la biblioteca MSI2

| Sección | Identificación Molecular | Identificación por la MSI2 |
|---|---|---|
| Fumigati | 1 ***A. hiratsukae*** | *A. lentulus* |
| | 1 *A. fumigatus* | *A. fisheri* |
| Nigri | 1 ***A. tubingensis*** | *A. brasiliensis* |
| | 1 ***A. tubingensis*** | *A. niger* |
| | 3 ***A. neoniger*** | *A. tubingensis* |
| | 1 ***A. costaricaensis*** | *A. tubingensis* |
| | 1 ***A. luchuensis*** | *A. tubingensis* |
| | 1 *A. niger* | *A. welwitschiae* |
| | 1 ***A. phoenix*** | *A. welwitschiae* |
| Terrei | 1 ***A. neoafricanus*** | *A. alabamensis* |
| | 1 *A. terreus* | *A. niveus* |
| Versicolor | 1 *A. sydowii* | *A. amoenus* |
| | ---- | ---- |
| Nidulantes | ---- | ---- |

Las especies marcadas en azul no se encuentran representadas en la Filamentous Fungi Library v4.0.
Las especies marcadas en marrón no se encuentran representadas en la Filamentous Fungi Library v4.0 ni en la MSI2

En el cuadro 9, se describen los aislamientos que no pudieron ser identificados. La FFLv4.0 no identificó 9 aislamientos [cinco de la sección Fumigati, dos de la sección Flavi, una de la sección Nigri y una de la sección Terrei] y MSI2 no pudo identificar 41 aislamientos [veintisiete de la sección Fumigati, siete de la sección Flavi, dos de la sección Nigri, dos de la sección Terrei y tres de la sección Versicolor].

**Cuadro 9.** Aislamientos que no pudieron ser identificados por ambas bibliotecas.

| Sección | FFLv4.0 | MSI2 |
|---|---|---|
| **Fumigati** | 3 *A. fumigatus* | 25 *A. fumigatus* |
| | 2 *A. hiratsukae* | 1 *A. hiratsukae* |
| | | 1 *A. lentulus* |
| **Flavi** | 2 *A. flavus* | 6 *A. flavus* |
| | | 1 *A. tamari* |
| **Nigri** | 1 *A. costaricaensis* | 1 *A. costaricaensis* |
| | | 1 *A. welwithschiae* |
| **Terrei** | 1 *A. terreus* | 1 *A. terreus* |
| | | 1 *A. niveus* |
| **Versicolor** | ---- | 3 *A. sydowii* |

En la Filamentous Fungi Library v4.0 no se encuentran estas especies.

# X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio utilizamos MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen Germany) para evaluar 2 bibliotecas (FFLv4.0 y MSI2) que se utilizan para la identificación de hongos filamentosos.

En nuestro estudio el desempeño de la FFLv4.0 fue mejor que el de la biblioteca MSI2 tanto en las identificaciones a nivel de sección como a nivel de especies. Nuestros resultados arrojaron una tasa de identificación correcta a nivel de sección del 96% para FFLv4.0 y 81.6% para MSI2; y una tasa de identificación correcta a nivel de especie de 72.4% y 55.2% respectivamente; MSI2 presentó una alta tasa (18.4%) de organismos que no pudo identificar a diferencia de la FFLv4.0 (4%). Nuestros resultados contrastan con lo previamente descrito para la FFLv3.0 dado que, en el estudio de Stein M y col., MSI en su versión de 2016, logró el 72% de identificaciones correctas a nivel de especie en comparación con el 13.6% alcanzado Bruker FFLv1.0 (63); así mismo, el estudio de Barker KR y col. en el que analizaron 633 hongos filamentosos incluidos principalmente *Aspergillus, Fusarium y Mucorales,* mostró que MSI alcanzó el 83.25% de identificación correctas a nivel de especie en comparación con el 21.8% alcanzado por Bruker (FFLv3.0) (62). Cabe mencionar que en ambos estudios la extracción de proteínas se realizó a partir de un cultivo en medio sólido (mismo método utilizado por MSI para la construcción de su biblioteca).

Estas diferencias pueden deberse a la mejora que sufrió la FFLv3.0 la cual contenía 175 especies y al cambiar a su versión 4, alcanzó la representación de 247 especies (59,62). Esta actualización pudo ser crucial para el aumento observado en las identificaciones correctas. Sin embargo, cabe mencionar que MSI2 contiene más de 1300 especies de 358 géneros (64), es decir, es una biblioteca más robusta, por lo que, hubiéramos esperado una tasa mayor de identificaciones correctas. Nuestros resultados muestran que el contar solo con una biblioteca robusta (una biblioteca que cuenta con los espectros de las especies que estamos analizando) no

necesariamente asegura tener un mejor desempeño en la identificación de hongos filamentosos.

Otra explicación puede ser el hecho de la existencia de diferencias intrínsecas entre aislamientos de la misma especie, pero pertenecientes a diferentes regiones geográficas, lo cual también puede impactar en el espectro que se obtiene (68). En este sentido, la biblioteca MSI2 cuenta con 80 referencias para *A. fumigatus* y 56 para el grupo *A. flavus oryzae*, y aun así, no logró identificar el 21,4% (25/117) de aislamientos de *A. fumigatus* y el 17% (6/38) del grupo *A. flavus oryzae*. Desafortunadamente desconocemos el origen de los aislamientos que se utilizaron para la construcción de ambas bibliotecas. Se ha visto una mejora en el desempeño de las bibliotecas caseras cuando estas son suplementadas con bibliotecas construidas por los usuarios a partir de sus propios aislamientos (69). Sin embargo, esto no es algo práctico para el laboratorio clínico ya que desafortunadamente se requiere de capacidad de realizar identificaciones moleculares además de personal altamente capacitado que desarrolle estas actividades.

Otro de los factores que pudo haber influido en nuestros resultados es el método de extracción de proteínas que utilizamos (extracción a partir de cultivo líquido, tal como lo recomienda el fabricante, Bruker Daltonics). (52). Se ha descrito la importancia de realizar el mismo método de extracción que se utilizó para la creación de la biblioteca, ya que esto también puede influir en los espectros obtenidos y por lo tanto en la identificación correcta. En un estudio comparativo reciente mostraron que la biblioteca de NIH logró el 92.3% de identificaciones correctas a nivel de especie, mientras que la biblioteca Bruker (FFLv3.0) logro solo el 1.9 % de las identificaciones; cabe mencionar que ambas bibliotecas contenían todas las especies analizadas y la única diferencia fue que el proceso de extracción de proteínas se realizó a partir de un cultivo en medio sólido y no en medio líquido (59). El cultivo de hongos en medio líquido rara vez se emplea en los laboratorios de micología clínica debido al mayor riesgo de contaminación por esporas del ambiente y la incapacidad de visualizar características macro y microscópicas fenotípicas (59). Mientras que la identificación en medio sólido representa una gran

ventaja, dado que ahorra tiempo, permite visualizar las características macroscópicas y detectar cultivos contaminados. Dado lo práctico y rápido del proceso a partir de cultivo sólido, la recomendación sería realizar la identificación a partir de cultivo solido probando con ambas bibliotecas, si no se obtiene resultados, realizar el cultivo en medio líquido y probar nuevamente en ambas bibliotecas. Actualmente, Bruker ha propuesto dos técnicas de extracción a partir de cultivo en medio sólido, la primera es realizando la extracción en tubo con ácido fórmico y acetonitrilo (como el descrito por MSI) y el segundo, realizando la extracción con ácido fórmico directamente sobre una placa MALDI TOF especialmente diseñada para identificación de hongos. Para las cuales se tendrá que valorar su desempeño en futuros estudios.

Por otra parte, la FFLv4.0 tuvo una tasa menor en aislamientos no identificados 3.9% (9/228), en comparación con MSI2 que no logró identificar el 18.4% (42/228) de los aislamientos. Sin embargo, tuvo una tasa de identificación errónea a nivel de especie más alta 16.2% (37/228) en comparación a MSI2 con 6.1% (14/228). Siendo para FFLv4.0 la sección Nigri con 67% (24/36), lo que puede deberse a que FFLv4.0 solo contiene espectros para *A. niger, A. japonicus* y *A. brasiliensis*, por lo tanto, el resto de las especies crípticas no pueden identificarse. *A. niger* sensu stricto fueron los únicos aislamientos correctamente identificados a nivel de especie. Los aislamientos restantes que pertenecen a otras especies crípticas (*A. tubingensis, A. luchuensis, A. welwitschiae, A. neoniger, A. phoenix, A. costaricaensis* y *A. piperis*) se identificaron erróneamente como *A. niger* con puntajes ≥2. Una explicación probable es que son especies estrechamente y se requieren métodos moleculares y la construcción de árboles filogenéticos para lograr la identificación de especies de la sección Nigri (70). Nuestros resultados muestran que FFLv4.0 requiere curación para mantener solo espectros de aislamientos identificados molecularmente. Además, de la necesidad de explorar la posibilidad de identificar proteínas en otro rango de masas, que permitan la diferenciación de las especies, lo cual es una prioridad no solo para fines epidemiológicos, sino también porque las especies crípticas de la sección Nigri pueden presentar susceptibilidad disminuida

a varios de los antifúngicos utilizados en la práctica clínica (71). Así mismo, cabe mencionar que MSI2 cuenta con espectros de varias especies de la sección Nigri, a pesar de eso, solo logró la identificación a nivel de sección. Otra sección en la que se encontró problemas de identificaciones erróneas fue la sección Versicolor 70% (7/10). De esta sección, la FFLv4.0 contiene espectros de *A. versicolor* y de *A. sydowii*, aun así, seis A. sydowii fueron identificados como A. versicolor, lo cual también fue descrito previamente para la FFLv3.0 (62). Al igual que para la sección Nigri, la FFLv4.0 requiere ser depurada para mantener solo los aislamientos que hayan sido caracterizados molecularmente.

Mantener las bibliotecas comerciales y públicas actualizadas y curadas es de suma importancia para mejorar el diagnóstico del laboratorio de microbiología clínica. Además, lo ideal sería suplementar las bibliotecas comerciales y públicas con espectros de aislamientos recuperados de todo el mundo.

Es fundamental conocer el desempeño de las bibliotecas para evitar errores en el reporte de resultados aun cuando la FFLv4.0 y MSI2 arrojen resultados con score ≥2 y/o un índice de A respectivamente a partir de un cultivo en medio líquido. Con base en nuestros resultados, los *Aspergillus* se deben reportar a nivel de sección dado que a este nivel no encontramos errores de identificación por ninguna de las dos bibliotecas. La excepción es *A. unguis, A. flavus* y *A. tamari*, los cueles fueron correctamente identificados por ambas bibliotecas, por lo que, pueden reportarse confiadamente a nivel de especie.

Aunque aún existen brechas en el uso ampliado de MALDI-TOF en la identificación de hongos filamentosos, podemos ver que existen avances importantes, lo cual tiene un gran impacto sobre todo en los laboratorios en los que se carece de personal con experiencia en micología.

# XI. CONCLUSIÓN

La FFLv4.0 tuvo un mejor desempeño que MSI2 en la identificación de los *Aspergillus* spp. analizados en este estudio a partir de cultivo en medio líquido. Sin embargo, la FFLv4.0 presentó mayores tasas de identificaciones erróneas en comparación con MSI2.

## XII. REFERECIAS


1. Bonifaz Trujillo A. Micología média básica. 6ta ed. México: Mc Graw Hill; 2020. 868 p.

2. Benjamin CR, Raper KB, Fennell DI. The Genus Aspergillus. Mycologia. mayo de 1966;58(3):500.

3. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology. el 1 de junio de 2014;78(1):141–73.

4. Gautier M, Normand AC, Ranque S. Especies de *Aspergillus hasta ahora desconocidas*. Clinical Microbiology and Infection. el 1 de agosto de 2016;22(8):662–9.

5. Portal INSST [Internet]. [citado el 30 de septiembre de 2023]. Aspergillus spp. - Agentes Biológicos - Hongo - Portal INSST - INSST. Disponible en: https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/aspergillus-spp

6. Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. 2000;17: S79-S84:6.

7. Arriola M_2020_Asperlligus_24023.pdf [Internet]. [citado el 17 de enero de 2024]. Disponible en: https://rid.unam.edu.ar/bitstream/handle/20.500.12219/3356/Arriola%20M_2020_Asperlligus_24023.pdf?sequence=1&isAllowed=y

8. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Micología. junio de 2008;25(2):78–82.

9. BIOLOGÍA y GEOLOGÍA [Internet]. 2022 [citado el 29 de noviembre de 2023]. PARED CELULAR. Disponible en: https://soclalluna.com/2o-bachillerato/2obach/bloque-iii-estructura-y-fisiologia-celular/ud03-la-celula-sus-estructuras-y-organulos/paredes-vegetales/

10. Harris SD, Momany M. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. Fungal Genetics and Biology. abril de 2004;41(4):391–400.

11. Carrau L. Análisis de expresión de parálogos del gen transportador de urea (ureaA) de Aspergillus nidulans y deleción de uno de ellos: ADN_02598.1. Facultad de Ciencias- UDELAR; 2011.

12. Scazzocchio C. Aspergillus: A Multifaceted Genus. En: Reference Module in Life Sciences [Internet]. Elsevier; 2019 [citado el 30 de septiembre de 2023]. p. B9780128096338208030. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338208030

13. García-Vidal C, Salavert Lletí M. Inmunopatología de las micosis invasivas por hongos filamentosos. Rev Iberoam Micol. el 1 de octubre de 2014;31(4):219–28.

14. Garcia-Vidal C, Carratalà J. Patogenia de la infección fúngica invasora. Enferm Infecc Microbiol Clin. el 1 de marzo de 2012;30(3):151–8.

15. Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, et al. What makes Aspergillus fumigatus a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Revista Iberoamericana de Micología. el 1 de octubre de 2010;27(4):155–82.

16. Alcalá L, Muñoz P. Aspergillus y aspergilosis.

17. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. Enferm Infecc Microbiol Clin. el 1 de abril de 2012;30(4):201–8.

18. Romero M de las M. ENFERMEDAD PULMONAR POR Aspergillus spp.: DISTRIBUCION DE ESPECIES Y SENSIBILIDAD FRENTE A ANTIFUNGICOS. Universidad Nacional del Nordeste; 2014.

19. Arenas R. Micología médica ilustrada. 6a ed. Ciudad de México: Mc Graw Hi Interamericana Editores, S.A de C.V.; 2019.

20. Salazar CL, Rua ÁL. Características morfológicas microscópicas de especies de Aspergillus asociadas a infecciones en humanos. Hechos Microbiológicos. 2012;3(2):93–6.

21. Aspergillus spp. [Internet]. Life Worldwide ES. [citado el 30 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://es.fungaleducation.org/aspergillus-spp/

22. Ignacio Sánchez-Cohen, Macías-Corral MA, González-Martínez M del R. Distribución espaciotemporal de hongos de importancia clínica en el ambiente del norte de México. REVISTA BIOMÉDICA [Internet]. el 6 de mayo de 2022 [citado el 30 de noviembre de 2023];33(2). Disponible en: https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/923

23. Gavaldà J, Ruiz I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección por Aspergillus spp. Enferm Infecc Microbiol Clin. el 1 de diciembre de 2003;21(10):571–8.

24. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. Clinical Microbiology Reviews. julio de 2009;22(3):447–65.

25. Solano C, Vázquez L. Aspergilosis invasora en el paciente con enfermedad oncohematológica. Rev Iberoam Micol. el 1 de octubre de 2018;35(4):198–205.

26. Brookman JL, Denning DW. Molecular genetics in Aspergillus fumigatus. Current Opinion in Microbiology. octubre de 2000;3(5):468–74.

27. Hrishikesh K. Aspergilosis. American Thoracic Society. 2012;186(4):2.

28. Mayo Clinic [Internet]. 2022 [citado el 30 de septiembre de 2023]. Aspergilosis-Aspergilosis - Síntomas y causas. Disponible en: https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/aspergillosis/symptoms-causes/syc-20369619

29. IMSS [Internet]. 2013. Diagnóstico de Aspergilosis Invasora en Pacientes Menores de 18 años de Edad. Disponible en: http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/640GER.pdf

30. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [Internet]. 2021 [citado el 30 de septiembre de 2023]. Aspergillosis | Types of Fungal Diseases | Fungal Diseases | CDC. Disponible en: https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/spanish/index.html

31. Rabagliati R. Actualización en el diagnóstico y manejo de aspergilosis invasora en pacientes adultos. Rev chil infectol. 2018;35(5):531–44.

32. Pemán J, Salavert M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. Enferm Infecc Microbiol Clin. el 1 de febrero de 2012;30(2):90–8.

33. González Jiménez I. Origen, desarrollo y nuevos mecanismos de resistencia a azoles en Aspergillus fumigatus [Internet] [http://purl.org/dc/dcmitype/Text]. Universidad Complutense de Madrid; 2022 [citado el 23 de enero de 2024]. p. 1. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=318324

34. Van Der Linden JWM, Warris A, Verweij PE. Aspergillus species intrinsically resistant to antifungal agents. Medical Mycology. el 1 de abril de 2011;49(Supplement_1):S82–9.

35. European committe on Antimicrobial susceptibility testing [Internet]. [citado el 20 de octubre de 2024]. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204_updatd_links_200924.pdf

36. M61. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi [Internet]. [citado el 20 de octubre de 2024]. Disponible en: https://clsi.org/media/1896/m61ed1_sample.pdf

37. 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). Medical Mycology. el 1 de octubre de 2018;56(7):838–46.

38. Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyiannis DP, et al. Patterns of Susceptibility of Aspergillus Isolates Recovered from Patients Enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. Journal of Clinical Microbiology. octubre de 2009;47(10):3271–5.

39. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular Identification of Aspergillus Species Collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. Journal of Clinical Microbiology. octubre de 2009;47(10):3138–41.

40. Varga J, Houbraken J, Van Der Lee HA, Verweij PE, Samson RA. Aspergillus calidoustus sp. nov., Causative Agent of Human Infections Previously Assigned to Aspergillus ustus. Eukaryotic Cell. abril de 2008;7(4):630–8.

41. Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. Studies in Mycology. 2007;59:129–45.

42. Balajee S, Borman A, Brandt M, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-Based Identification of Aspergillus, Fusarium, and Mucorales Species in the Clinical Mycology Laboratory: Where Are We and Where Should We Go from Here? Journal of Clinical Microbiology. abril de 2009;47(4):877–84.

43. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. Enferm Infecc Microbiol Clin. el 1 de abril de 2012;30(4):201–8.

44. Romanelli AM, Fu J, Herrera ML, Wickes BL. A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. Mycoses. 2014;57(10):612–22.

45. IDENTIFICACIÓN DE GENERO Y ESPECIE PARA HONGOS Y OTROS EUCARIOTES A PARTIR DE LA SECUENCIA ITS Y SECUENCIACIÓN CAPILAR [Internet]. [citado el 17 de enero de 2024]. Disponible en: http://labsergen.langebio.cinvestav.mx/genomics/?services=idhongos

46. Patel R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. Clinical Infectious Diseases. el 15 de agosto de 2013;57(4):564–72.

47. Zboromyrska DY. APLICACIONES DEL MALDI-TOF EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. Educación Continua en el Laboratorio Clínico. mayo de 2015;(20):87–98.

48. Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. Molecules. enero de 2020;25(20):4775.

49. Welker M, Moore ERB. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. Systematic and Applied Microbiology. el 1 de febrero de 2011;34(1):2–11.

50. Lavigne JP, Espinal P, Dunyach-Remy C, Messad N, Pantel A, Sotto A. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). el 1 de febrero de 2013;51(2):257–70.

51. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Clinical Infectious Diseases. el 15 de agosto de 2009;49(4):543–51.

52. Siller-Ruiz M, Hernández-Egido S, Sánchez-Juanes F, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. mayo de 2017;35(5):303–13.

53. Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C, García P. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. Revista chilena de infectología. abril de 2013;30(2):140–6.

54. Khot PD, Fisher MA. Novel Approach for Differentiating Shigella Species and Escherichia coli by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology. el 21 de diciembre de 2020;51(11):3711–6.

55. Paauw A, Jonker D, Roeselers G, Heng JME, Mars-Groenendijk RH, Trip H, et al. Rapid and reliable discrimination between Shigella species and Escherichia coli using MALDI-TOF mass spectrometry. International Journal of Medical Microbiology. el 1 de junio de 2015;305(4):446–52.

56. Cassagne C, Normand AC, Bonzon L, L'Ollivier C, Gautier M, Jeddi F, et al. Routine identification and mixed species detection in 6,192 clinical yeast isolates. Medical Mycology. el 1 de marzo de 2016;54(3):256–65.

57. Relloso MS, Nievas J, Fares Taie S, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, et al. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. Revista Argentina de Microbiología. el 1 de abril de 2015;47(2):103–7.

58. Bonifaz A, Montelongo-Martínez F, Araiza J, González GM, Treviño-Rangel R, Flores-Garduño A, et al. Evaluación de MALDI-TOF MS para la identificación de levaduras patógenas oportunistas de muestras clínicas. Revista chilena de infectología. diciembre de 2019;36(6):790–3.

59. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a Clinically Comprehensive Database and a Simple Procedure for Identification of Molds from Solid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology. el 21 de diciembre de 2020;51(3):828–34.

60. Schulthess B, Ledermann R, Mouttet F, Zbinden A, Bloemberg GV, Böttger EC, et al. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. J Clin Microbiol. agosto de 2014;52(8):2797–803.

61. Becker PT, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. Medical Mycology. el 1 de noviembre de 2014;52(8):826–34.

62. Barker KR, Kus JV, Normand AC, Gharabaghi F, McTaggart L, Rotstein C, et al. A Practical Workflow for the Identification of Aspergillus, Fusarium, Mucorales by MALDI-TOF MS: Database, Medium, and Incubation Optimization. Journal of Clinical Microbiology. el 3 de noviembre de 2022;60(12):e01032-22.

63. Stein M, Tran V, Nichol KA, Lagacé-Wiens P, Pieroni P, Adam HJ, et al. Evaluation of three MALDI - TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. Mycoses. octubre de 2018;61(10):743–53.

64. Normand AC, Blaize M, Imbert S, Packeu A, Becker P, Fekkar A, et al. Identification of Molds with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Performance of the Newly Developed MSI-2 Application in Comparison with the Bruker Filamentous Fungi Database and MSI-1. Journal of Clinical Microbiology. el 20 de septiembre de 2021;59(10):10.1128/jcm.01299-21.

65. Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. Cai Y, editor. PLoS ONE. el 14 de diciembre de 2011;6(12):e28425.

66. Leading International Fungal Edication [Internet]. 2019 [citado el 10 de junio de 2024]. Comparación de tres bibliotecas MALDI-ToF (MSI, Bruker, NIH) para la identificación de hongos filamentosos - Life Worldwide. Disponible en: https://en.fungaleducation.org/blog/2019/03/12/comparison-of-three-maldi-tof-libraries-msi-bruker-nih-for-identification-of-filamentous-fungi/

67. Gautier M, Ranque S, Normand AC, Becker P, Packeu A, Cassagne C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. Clinical Microbiology and Infection. el 1 de diciembre de 2014;20(12):1366–71.

68. Adams LL, Dionne K, Fisher S, Parrish N. A rapid, standardized protein extraction method using adaptive focused acoustics for identification of mycobacteria by MALDI-ToF MS. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. el 1 de noviembre de 2016;86(3):284–8.

69. M Américo F, P Machado Siqueira L, B Del Negro GM, M Favero Gimenes V, S Trindade MR, L Motta A, et al. Evaluating VITEK MS for the identification of clinically relevant Aspergillus species. Medical Mycology. el 1 de abril de 2020;58(3):322–7.

70. Massi FP, Iamanaka BT, Barbosa RL, Sartori D, Ferrranti L, Taniwaki MH, et al. Molecular analysis of Aspergillus section Nigri isolated from onion samples reveals the prevalence of A. welwitschiae. Braz J Microbiol. marzo de 2021;52(1):387–92.

71. Vidal-Acuña MR, Ruiz M, Torres MJ, Aznar J. Prevalence and in vitro antifungal susceptibility of cryptic species of the genus Aspergillus isolated in clinical samples. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). mayo de 2019;37(5):296–300.