



*Universidad Nacional del Nordeste*

*Facultad de Medicina*

---

**Evaluación de dos métodos para la determinación de la  
sensibilidad *in vitro* del complejo *Aspergillus terreus* frente a  
antifúngicos**

Tesis presentada para la obtención del título de Magíster en  
Micología Médica

---

**Autor: Bioq. Mariana Soledad Fernández**

**Director: Dra. Susana Córdoba**

Instituto de Medicina Regional-Universidad Nacional del Nordeste  
Área Micología

Resistencia, Argentina  
Octubre de 2015

*A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional*

*A Javier, por su confianza, comprensión y amor*

*A mi hija Martina, luz de mi vida, por ser mi fuente de motivación e inspiración*

*Con mucho cariño*

*Mariana*

## ***Quiero agradecer a***

*Susana, quién aceptó con mucho entusiasmo ser mi Directora de Tesis, por haberme brindando la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico y haberme guiado durante todo el desarrollo de la misma*

*Flor, por haber compartido conmigo sus conocimientos para finalizar esta tesis*

*Milí, con quien realizamos todo a la par desde hace muchos años*

*Tina, Lili y Javier, por haberme acompañado siempre con una palabra de aliento*

*Gustavo, por darme la oportunidad de realizar y formar parte de esta maravillosa carrera.*

*el Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste, al cual considero mi segundo hogar, por haberme abierto las puertas hace ya diez años..*

***Gracias!***

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<i>Historia del género Aspergillus</i> .....	4
<i>Reservorio y mecanismo de transmisión del Género Aspergillus</i> .....	5
<i>Ecología del Género Aspergillus</i> .....	6
<i>Aspergillus terreus complex</i> .....	7
<i>Aspergillus terreus complex. Estado actual del conocimiento</i> . ....	9
<i>Sensibilidad a los antifúngicos. Métodos disponibles</i> .....	11
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
<i>Aislamientos. Origen y obtención</i> .....	17
<i>Estudio in vitro de la sensibilidad a los antifúngicos</i> .....	18
Método de dilución en caldo.....	19
Método de difusión en agar .....	24
<i>Comparación entre el método de microdilución y de difusión</i> .....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
<i>Aislamientos. Origen y obtención</i> .....	28
<i>Estudio in vitro de la sensibilidad a los antifúngicos</i> .....	28
Método de microdilución en caldo .....	28
Método de difusión en agar .....	34
<i>Comparación entre el método de microdilución y de difusión</i> .....	38
Asociación entre ambos métodos. Gráficos de dispersión.....	38
Concordancia entre ambos métodos .....	39
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
<i>Sensibilidad a los antifúngicos. Método de dilución en caldo</i> .....	40
<i>Sensibilidad a los antifúngicos. Método de difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs<sup>TM</sup></i> .....	44
<i>Comparación del método de referencia con el método de difusión en agar</i> .....	46
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>49</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>50</b>
<i>ANEXO I .....</i>	<i>50</i>
<i>ANEXO II .....</i>	<i>52</i>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>54</b>

## RESUMEN

*Aspergillus terreus* comprende un complejo de hongos filamentosos pertenecientes a la familia Aspergillaceae, subgénero *Circumdati*, sección Terrei. En los últimos años se ha observado un aumento significativo de aislamientos de *A. terreus complex*, respecto de otras especies del mismo Género, ocasionando infecciones superficiales y profundas localizadas. Dichas infecciones suelen ser de difícil resolución, de pronóstico reservado a grave, en parte por las dificultades en el diagnóstico temprano e identificación correcta del microorganismo y además por la presencia de aislados menos sensibles a los antifúngicos y, en general, resistentes *in vitro* e *in vivo* a la AMB.

Los métodos de referencia M38-A2 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el E.DEF 9.3 del *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a los hongos filamentosos de manera fiable, reproducible y resultan muy útiles para la vigilancia epidemiológica. Pero la realización de dichas técnicas es engorrosa, muy laboriosa y costosa, motivos por los que su aplicación en los laboratorios es limitada. El documento M51-A del CLSI describe un método de difusión en agar para hongos miceliales con resultados cualitativos hasta 24 h antes de los resultados que se obtienen con la determinación de la CIM.

La técnica de difusión en agar usando tabletas cargadas con antifúngicos (Neo-Sensitabs™) resulta un recurso atractivo debido a su simplicidad, bajo costo y disponibilidad en el país. Pero hay pocos estudios realizados en *Aspergillus* spp.

Los objetivos del trabajo fueron correlacionar el método de difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs™ y el método de referencia de microdilución en caldo, M38-A2 del CLSI, para los aislados del complejo *A. terreus*; valorar su aplicabilidad en la rutina del

laboratorio y evaluar si el método de difusión en agar es eficaz para detectar aislados resistentes a los antifúngicos estudiados.

Para ello se trabajó con 28 aislados ambientales y 24 clínicos del complejo *A. terreus* que se encontraban almacenados en la colección de cultivos del Área de Micología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste.

Por un lado, se llevó a cabo el método de dilución en caldo según el método de referencia, M38-A2 del CLSI. Se ensayó la actividad *in vitro* del voriconazol (VRC), el itraconazol (ITC), la terbinafina (TRB) y AMB frente a estos aislados. Para el análisis se utilizaron los puntos de corte propuestos en dicho documento.

Por otro lado, se realizó el método de difusión en agar. La determinación de la sensibilidad se efectuó según el documento M51-A del CLSI y se eligieron las tabletas Neo-Sensitabs™ Rosco como reservorios de los antifúngicos a evaluar. Se utilizaron tabletas de 9 mm de diámetro, cargadas con: 10 µg de ITC, 1 µg de VRC, 10 µg de AMB y 30 µg de TRB. La lectura fue visual a las 24 y 48 h de incubación y los halos de inhibición se midieron con regla milimetrada. La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante, que utiliza los puntos de corte del CLSI.

Para conocer el grado de asociación entre el método de referencia y el método de difusión, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson para cada antifúngico y, en caso de ser posible, se realizaron los análisis de regresión lineal. Para los métodos estudiados se observaron distintas categorías de discrepancias. Para cada antifúngico, excepto TRB, se calculó el porcentaje de concordancia entre ambos métodos. Se calculó la media geométrica, moda, rango, CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub>.

La AMB mostró los valores más elevados de CIM frente a todos los aislados de *A. terreus* estudiados y la mayoría de los aislados fueron categorizados dentro de las categorías de resistentes y con sensibilidad intermedia. Además presentó los halos de inhibición más

chicos por el método de difusión, donde la mayoría de los aislados fueron categorizados como resistentes. El VRC y el ITC presentaron valores bajos de CIM en el 100% de los aislados y todos fueron categorizados como sensibles, al igual que por el método de difusión. Para la TRB, todos los aislados tuvieron valores bajos de CIM por el método de referencia y todos presentaron halos de inhibición mucho más amplios que 17 mm por el método de difusión.

El modelo de correlación lineal no pudo ser utilizado para explicar la variable halo de inhibición en función de la CIM cuando se compararon ambos métodos para la AMB, el VRC, el ITC y la TRB frente a aislados de *A. terreus complex*.

El método de difusión presentó 100% de concordancia con el método de referencia para los azoles, sin ninguna discrepancia. Las discrepancias y la baja concordancia se presentaron al analizar la AMB.

El método por difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs™ es una técnica de bajo costo, rápida y simple, fácilmente aplicable a la rutina de los laboratorios clínicos para determinar la sensibilidad de aislados del complejo *A. terreus* frente al VRC y al ITC.

Sin embargo, se propone que la AMB sólo sea estudiada mediante el MR para los aislados de este complejo, con el fin de conocer la epidemiología de la resistencia a dicha droga en cada región geográfica.



## **INTRODUCCIÓN**

### **Historia del género *Aspergillus***

*Aspergillus* es uno de los nombres más antiguos de géneros de hongos. Actualmente se lo clasifica dentro del Reino Fungi, división Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales, familia Aspergillaceae (1,2).

En 1729, el botánico florentino Micheli al observar la estructura microscópica de este hongo la llamó "*aspergillum*" (del latín *aspergar*, que significar rociar o esparcir), acorde a un dispositivo utilizado por el clero católico romano para rociar agua bendita (3). Micheli designó nueve especies, a cada una de las cuales le aplicó un extenso nombre en latín. Más tarde, en 1809, Link describió varios "tipos" diferentes de *Aspergillus* que logró aislar de vegetales en descomposición. Entre estos estaba *A. flavus*, *A. candidus* y *A. glaucus* (4,5).

La infección por *Aspergillus* fue una de las primeras enfermedades fúngicas reconocidas en el hombre y en los animales. En 1815 Mayer y Emmert describieron la infección pulmonar en un grajo (*Corvus glandarius*) (4,5) y en 1847, Sluyter la informó en un paciente (4,5). Aunque, fue en 1850 que Fresenius utilizó por primera vez el término "aspergilosis" y al microorganismo aislado le dio el nombre de *A. fumigatus* (4).

Para ese entonces, *Aspergillus* se había convertido en uno de los grupos de formas más conocidas y más estudiadas. Su prevalencia en el medio natural, su facilidad de cultivo en los medios de laboratorio y la importancia económica de varias de sus especies provocó que muchos micólogos y microbiólogos industriales fueran atraídos a su estudio.

Durante el siglo XX se empezó a reconocer a *Aspergillus* como agente de infecciones oportunistas. Así, en 1924, Cleland encontró elementos aspergiliares en un tejido pulmonar necrosado, como resultado de una herida por arma de fuego. En 1926, Lapham describió la aspergilosis como una enfermedad secundaria a la tuberculosis (4,5). Durante

este siglo se publicaron varias monografías sobre el género, pero las más completas y aún consultadas fueron las escritas por Thom & Raper en 1945 (6) y Raper & Fennel en 1965 (7), quienes subdividieron al género *Aspergillus* en 18 “grupos” (7). En 1986, Gams y col. (8) reemplazaron el nombre “grupos” por Subgénero y Secciones.

Con respecto al tratamiento, el yoduro de potasio se utilizó como terapia desde principios del siglo XX hasta el final de la segunda guerra mundial. En la década de 1940, las sulfamidas y los nuevos antibacterianos llamados "medicamentos milagrosos", fueron utilizados para tratar las infecciones por hongos con resultados inconsistentes. El descubrimiento y la formulación de los primeros antifúngicos, la nistatina y AMB, en la década de 1950 ofrecieron alguna esperanza de controlar esas infecciones.

### ***Reservorio y mecanismo de transmisión del Género Aspergillus***

Los conidios de *Aspergillus* son componentes comunes presentes en el aire, se dispersan por sí mismos tanto a cortas como a grandes distancias dependiendo de las condiciones ambientales. Pueden permanecer en suspensión por períodos prolongados y contaminar cualquier superficie (9). Cuando los conidios entran en contacto con una superficie sólida o líquida, se depositan allí y germinan si las condiciones de humedad son las adecuadas (10). Tanto el hombre como los animales están habitualmente y casi constantemente expuestos a ellos. Esta exposición es normal y por lo general no plantea efecto adverso para la salud. Sin embargo, cuando se dan ciertas condiciones, *Aspergillus* puede causar enfermedades a través de la producción de micotoxinas (11), de la inducción de respuestas alérgicas (12) o de la afección de los tejidos (5,13).

Las principales puertas de entrada de *Aspergillus* al organismo humano incluyen el tracto respiratorio, la piel, la córnea y el oído. La infección puede localizarse en la misma puerta de entrada o diseminarse (5,13).

El riesgo de infección está ligado a la concentración de los propágulos en el contexto del paciente. Muchos trabajos refuerzan esta teoría y proponen como posibles fuentes de infección, los sistemas de ventilación, las plantas ornamentales y las fuentes de agua como lavabos y duchas (9,14–22). Además, se han descrito aspergilosis invasora nosocomiales relacionadas con actividades de restauración y construcción dentro de los hospitales o en sitios cercanos a ellos (23,24), pues durante las obras se ponen al descubierto reservorios del hongo que liberan al aire elevadas concentraciones de propágulos (25–27).

### ***Ecología del Género Aspergillus***

Las especies de *Aspergillus*, se consideran entre los organismos de más amplia distribución, capaces de colonizar una gran variedad de sustratos y, en general, son frecuentes en climas tropicales y subtropicales (4,5,13). Están en el suelo, en la vegetación en descomposición, en todo tipo de desechos orgánicos: alimentos descompuestos, pinturas, bolsas de diálisis rotas, lentes de contacto blandos, paredes de refrigeradores, polvo de las construcciones, interior de los conductos de aire, alimentos enlatados abiertos, ropa vieja, reactivos químicos, cuartos de hospital (4,5,13). Además es posible aislar *Aspergillus* en las capas altas de la atmósfera, de los baños de recubrimiento de ácido sulfúrico y sulfato de cobre, de las muestras tratadas con formol, de la nieve del Antártico y de los vientos sobre el Sahara (4,5). Varias especies contaminan granos y otros alimentos con metabolitos tóxicos que son una amenaza para la salud de los seres humanos y otros animales (28).

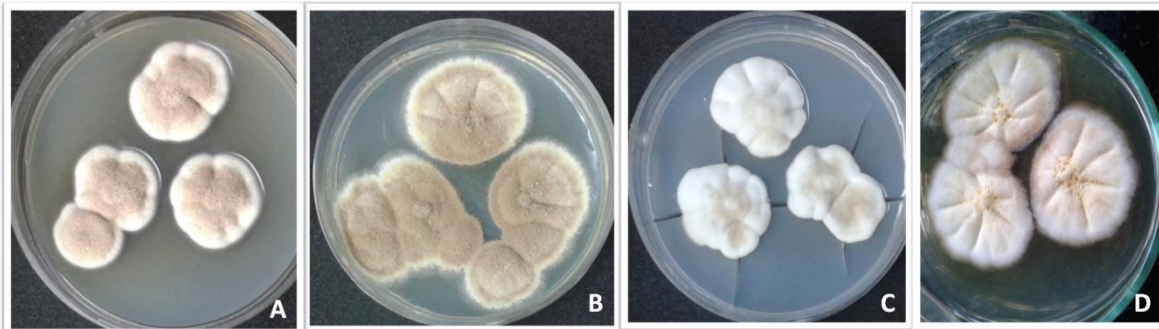
Algunas especies del Género son parte de la biota de distintas zonas del cuerpo como orofaringe, fosas nasales, piel, saco lagrimal, oído y tubo gastrointestinal (13).

### ***Aspergillus terreus* complex**

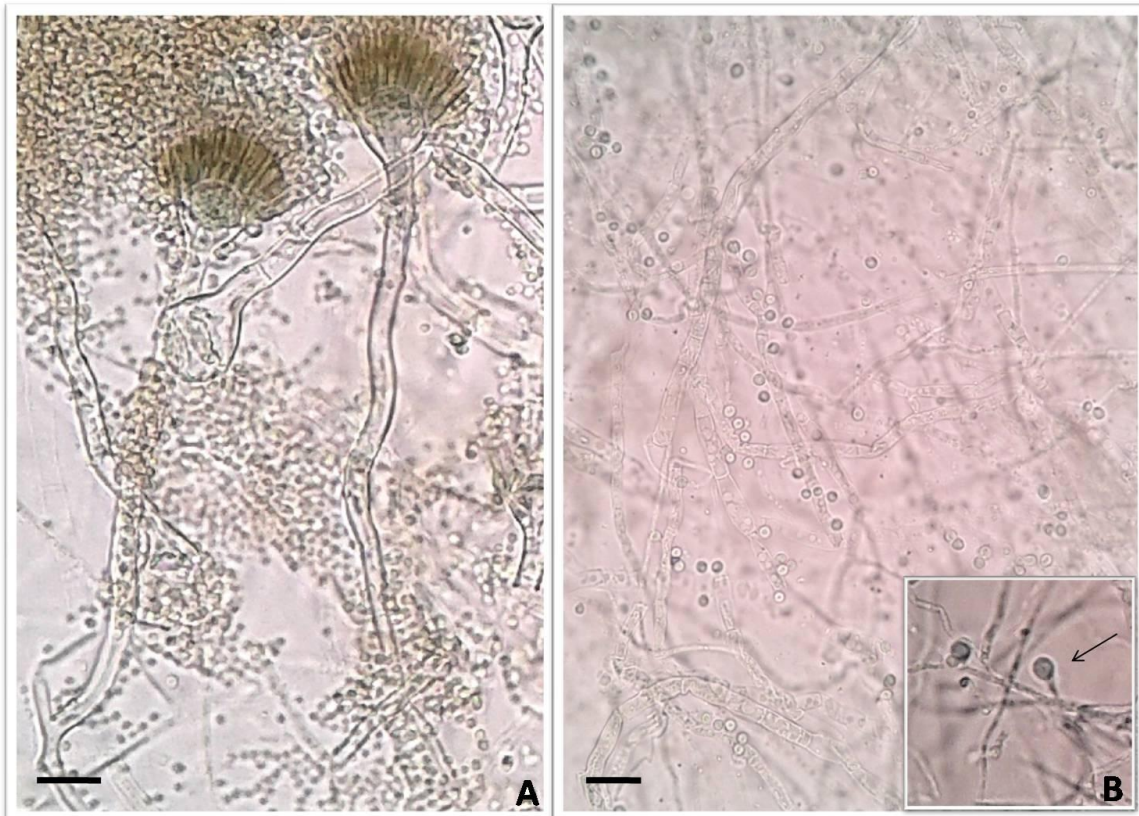
*A. terreus* fue descrito por primera vez en 1918 por Thom and Church (29). Actualmente se la clasifica dentro del subgénero *Circumdati*, sección Terrei y es la especie tipo dentro de esta sección (8). El término "complejo de especies" se ha utilizado para denominar a un grupo de especies que están estrechamente relacionadas y son casi indistinguibles por métodos morfo-fisiológicos (30). Así, el número de especies descritas dentro de la sección Terrei, y que conforman el "complejo *A. terreus*", ha crecido durante los últimos años e incluye a *A. terreus sensu stricto* (*A. terreus* s.s.), *A. neoaffricanus*, *A. pseudoterreus*, *A. floccosus*, *A. aureoterreus*, *A. hortai*, *A. niveus*, *A. neoindicus*, *A. carneus*, *A. allahabadii*, *A. ambiguus*, *A. microcysticus*, *A. alabamensis* (31–33). En el 2015, Guinea y col. (34) propusieron a *A. citrinoterreus* como nueva especie dentro de la sección Terrei.

Los miembros de este complejo presentan diversas características morfológicas. Las colonias pueden ser de color canela-café a amarillo-canela; café pálido a rosado. En agar Czapek extracto de levadura y en agar extracto de malta *A. terreus* presenta colonias desde aterciopeladas a lanosas, con centro flocoso en algunos aislamientos (Fotografía 1). En la micromorfología se observan hifas hialinas septadas, conidióforos largos, hialinos y lisos que se dilatan en el ápice para formar una vesícula sub-esférica cuya zona fértil da origen a 2 tipos de estructuras (biseriado), una de ellas son las fiálides que son células conidiógenas que originan cadenas de esporas mitóticas llamadas conidios, y la otra se alinean bajo las fiálides y son llamadas métulas. Las métulas y fiálides cubren las  $\frac{3}{4}$  partes de la vesícula (Fotografía 2A). Los conidios son globosos a ligeramente elípticos, de pared lisa y de 1,5-2,4  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fotografía 2A). La vesícula, fiálides y métulas, junto con los conidios, forman lo que se conoce como "cabeza conidial", la cuál es bien compacta y columnar. *A. terreus* produce, además, células hialinas globosas de

pared gruesa que nacen a los lados de la hifa denominadas aleuroconidios o células accesorias (Fotografía 2B) (7,28,35).



**Fotografía 1.** Colonias de algunos de los integrantes del complejo *Aspergillus terreus*. A-D: Colonias en agar Czapek extracto de levadura (CYA), incubadas durante 7 días a 25 °C. A: *A. carneus*; B: *A. terreus sensu stricto*; C: *A. aureoterreus*; D: *A. alabamensis*.



**Fotografía 2.** A: Conidióforos que nacen de célula pie, cabeza aspergilar, conidios, 400X. B: Aleuroconidios, 400X. Barras de escala = 10µm.

*A. terreus* se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente. Se lo aísla con frecuencia de suelos desérticos, de suelos con vegetación, del abono, y como

contaminante en productos vegetales como el maíz almacenado, la cebada y el maní (36). Es una especie económicamente importante ya que los aislamientos de este hongo se utilizan en la industria de la fermentación (37) y para la producción de enzimas (38). Por otro lado, *A. terreus* produce una serie de metabolitos secundarios, algunos de los cuales tienen propiedades valiosas para la humanidad, incluyendo la lovastatina, un medicamento utilizado para bajar el colesterol (39) y la ciclosporina A (40), entre otras.

### ***Aspergillus terreus* complex. Estado actual del conocimiento.**

Desde la década del 80 las infecciones intrahospitalarias han emergido como una complicación muy importante, tanto en individuos inmunocomprometidos como inmunocompetentes, debido a un aumento de los trasplantes de órganos y de médula ósea, a la aparición de nuevos fármacos antineoplásicos y antimicrobianos de amplio espectro y al desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas, que hacen al paciente susceptible a la invasión por cualquier microorganismo (41–44). Así la infección fúngica, se ha convertido en una infección nosocomial grave y relativamente frecuente, con alta morbi-mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, sobre todo en personas con neoplasias hematológicas (42,44,45).

Actualmente, las infecciones causadas por hongos del género *Aspergillus* son la causa más común de infección fúngica oportunista en humanos, después de las infecciones por levaduras (44,46). Alrededor de 40 especies dentro del género *Aspergillus* se han asociado a enfermedad en seres humanos (47), pero las más frecuentes como causantes de cuadros patológicos son siete, donde *A. fumigatus* es la más importante (48). Sin embargo, la incidencia de otras especies como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. glaucus* y *A. versicolor*, ha ido en aumento en los últimos años (5,13,47–50).



El complejo *A. terreus* ha emergido como patógeno oportunista ocasionando infecciones superficiales como onicomicosis (51–53), infecciones en pacientes quemados (54), infecciones cutáneas primarias (55,56), queratitis (57), otomicosis (58), endoftalmitis (59,60), así como infecciones profundas localizadas tales como endocarditis (61), bursitis (62), osteomielitis (63,64). Es el tercer hongo que coloniza las vías aéreas de los pacientes con fibrosis quística y puede ser responsable de aspergilosis invasora en hospedadores inmunocomprometidos (65–67). Además, al ser un hongo ambiental, presente en el medio hospitalario como numerosos estudios lo demuestran (16–19), se lo ha descrito como agente de aspergilosis invasora nosocomial, relacionadas con plantas ornamentales en salas de internación de pacientes con neutropenia, receptores de trasplante o enfermedades hematológicas (20) y con renovaciones edilicias dentro del hospital (68).

Esta emergencia se ve reflejada en el aumento significativo de aislamientos de *A. terreus*, respecto de otras especies del Género, observado en los últimos años (69,70).

Numerosos estudios han demostrado que *A. terreus*, posee valores altos de CIM a la AMB (71–74), esto parece correlacionarse con lo sucedido *in vivo* cuando se utiliza dicha droga en el tratamiento de aspergilosis invasora debido a *A. terreus* (75,76).

El uso de nuevas drogas para el tratamiento de la aspergilosis invasora optimizó la respuesta clínica obtenida frente a las infecciones producidas por *A. terreus*. Entre estas drogas, el voriconazol (VRC) demostró ser la más efectiva, *in vivo* e *in vitro*, frente a esta especie (77–79) y es considerada la droga de primera elección para las infecciones por *Aspergillus* spp. (80). Por otro lado, *A. terreus* tiene bajos valores de CIM para los demás azoles como el posaconazol (POS) y el itraconazol (ITC) y para la terbinafina (TRB), la caspofungina (CAS) y la micafungina (MIC) (81–84).

Sin embargo se debe considerar que la adquisición de resistencia a los azoles ya ha sido documentada entre especies de este Género (85–88). En Estados Unidos y en algunos países de Europa se han informado aislados clínicos de *A. terreus* que muestran una CIM elevada frente al ITC y al VRC (71,89–91).

### ***Sensibilidad a los antifúngicos. Métodos disponibles***

Los métodos de referencia M38-A2 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)(92) y el E.DEF 9.3 del *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (93) permiten determinar la CIM frente a los hongos filamentosos de manera fiable, reproducible y resulta muy útil para la vigilancia epidemiológica. Los estudios de sensibilidad del Género *Aspergillus* generalmente se determinan empleando estos métodos (74,86,94,95) pero la realización de dichas técnicas es engorrosa, muy laboriosa y costosa, motivo por los que su aplicación en los laboratorios es limitada.

En 2009 el CLSI desarrolló y publicó un método de difusión en agar para hongos miceliales frente a la AMB, la CAS, el ITC, el POS y el VRC. En 2010 se aprobó dicho documento (M51-A) y es el que se encuentra vigente (96). El método provee resultados cualitativos hasta 24 h antes de los que se obtienen con la determinación de la CIM.

La técnica de difusión en agar utilizando tabletas Neo-Sensitabs™ cargadas con antifúngicos ([www.rosco.dk](http://www.rosco.dk)) resulta un recurso atractivo debido a su simplicidad, bajo costo y disponibilidad en el país. Pero la mayoría de los estudios en los cuales se emplearon las tabletas fueron en *Candida* spp. (97,98). En *Aspergillus* spp. se realizaron varios trabajos utilizando discos cargados con antifúngicos para evaluar la sensibilidad (99–101), sin embargo son escasas las publicaciones en las que se utilizan dichas tabletas frente a las especies de este Género (102,103).



## **JUSTIFICACIÓN**



Este trabajo surgió en base a mi experiencia de trabajo en el área de Micología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste realizando monitoreos ambientales en distintos hospitales de las ciudades de Corrientes y Resistencia, donde *A. terreus complex* aparecía en segundo o tercer lugar de frecuencia, después de *A. flavus complex*, *A. niger complex* y *A. sydowii complex* (18). En simultáneo, la incidencia de aislamientos de este hongo, principalmente en onicomicosis, aumentó cinco veces en el 2010 respecto del 2007 (51). Como las infecciones por *A. terreus complex* suelen ser de difícil resolución, de pronóstico reservado a grave, en parte por las dificultades en el diagnóstico temprano e identificación del microorganismo y además por la presencia de aislados menos sensibles a los antifúngicos y resistentes, *in vitro* e *in vivo*, a la AMB, resultó importante correlacionar el método de difusión en agar utilizando tabletas Neo-Sensitabs™ con el método de referencia para los aislados del complejo *A. terreus*. Con el propósito de contar con un método sencillo que sea aplicable a la rutina de los laboratorios asistenciales y poder contribuir, en menor tiempo, en la orientación para la implementación de terapias antimicóticas eficaces y vigilar la aparición de resistencia a los antifúngicos.

## **HIPÓTESIS**





- Los resultados obtenidos con el método de difusión en agar utilizando tabletas Neo-Sensitabs™ se correlacionan con los obtenidos por el método de referencia M38-A2 CLSI para cepas de *A. terreus complex*.
- Con el método por difusión en agar utilizando tabletas Neo-Sensitabs™ se pueden detectar aquellos aislados que fueron resistentes a alguno de los antifúngicos estudiados.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales:**

-  Comparar los resultados de la CIM obtenidos según el método de referencia con los obtenidos por el método de difusión en agar en un conjunto de aislados de *A. terreus complex*.
-  Evaluar su aplicabilidad en la rutina del laboratorio.

### **Objetivos Específicos:**

-  Determinar la CIM de los aislados clínicos y ambientales de *A. terreus complex* frente a cuatro antifúngicos.
-  Determinar la sensibilidad de los aislados clínicos y ambientales de *A. terreus complex* mediante el método de difusión en agar.
-  Comparar los resultados y determinar la concordancia entre ambos métodos.
-  Evaluar si el método de difusión en agar es eficaz para detectar aislados resistentes a los antifúngicos estudiados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Aislamientos. Origen y obtención***

**Aislamientos ambientales:** se trabajó con aislados del complejo *A. terreus* que se encontraban almacenados en la colección de cultivos del Área de Micología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Los mismos habían sido obtenidos en muestreos realizados en el aire y en la superficies de unidades críticas (salas de oncología, unidad de quemados, Unidad de Terapia Intensiva (UTI) y quirófanos) de hospitales de la ciudad de Corrientes Capital y de Resistencia (Chaco, Argentina), en el aire externo de las zonas aledañas a los hospitales y en espacios públicos, en árboles y en tierra de ambas ciudades.

Corrientes y Resistencia se encuentran ubicadas en una región subtropical sin estación seca entre los 58°50' LO - 27°28' LS y 58°59' LO - 27°27' LS, respectivamente.

**Aislamientos clínicos:** se trabajó con aislados del complejo *A. terreus* que se encontraban almacenados en la colección de cultivos del Área de Micología del Instituto de Medicina Regional de la UNNE, los mismos habían sido derivados al Área de Micología de dicho Instituto.

Antes de ser ingresados a la colección de cultivo, todos los aislados fueron identificados por sus características macro y micromorfológicas utilizando claves taxonómicas (7,104,105) y 44/52 aislados fueron tipificado por métodos moleculares. Se amplificó la secuencia parcial del gen Calmodulina (*calM*) y se envió para su secuenciación al Departamento de Ecología, Genética y Evolución- Servicio de Secuenciación y Genotipificado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. El gen  $\beta$ -tubulina (*benA*) fue amplificado y secuenciado por el

Departamento de Micología - Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina, sólo para los aislados del complejo *A. terreus* distintos a *A. terreus* s.s. Las secuencias de *calM* y *benA* fueron almacenadas en el `European Nucleotide Archive` (ENA). Los números de acceso son LN734824-LN734863 y LN890300-LN890307, disponibles en <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN734824-LN734863> y <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/LN890300-LN890307>, respectivamente.

Los 52 aislados se repicaron en agar Papa Dextrosa con cloranfenicol 250 mg/L (APD/CAF) (**Ver ANEXO I**) y se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 7 días o hasta que se obtuvo una adecuada conidiación del hongo, en general, luego de 48 h de incubación, para luego realizar el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos.

### ***Estudio in vitro de la sensibilidad a los antifúngicos***

La misma se determinó empleando el método de referencia de microdilución en caldo, M38-A2 del CLSI (92) y el método de difusión en agar basado en el documento M51-A del CLSI (96) pero utilizando tabletas Neo-Sensitabs™ Rosco (106). Todo el procedimiento se realizó en cabina de seguridad biológica Clase IIA.

Si bien, TRB está indicada en *tinea pedis*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, pitiriasis versicolor y onicomycosis (107), se la incluyó en este trabajo ya que la mayoría de los aislamientos clínicos de *A. terreus complex* estudiados fueron aislados de lesiones en uñas.

**Preparación del inóculo:** tanto para realizar el método de dilución en caldo como el de difusión en agar, se preparó una suspensión inicial de conidios a partir del cultivo obtenido

en APD/CAF según el documento M38-A2 (92), ya que el M51-A (96) y el 3.15.0 de Neo-Sensitabs™ Rosco (106) se basan en ese documento para preparar el inóculo.

Para ello, las colonias se cubrieron con 1 mL de solución salina estéril (CINa 0,85%) y se preparó la suspensión raspando suavemente la colonia con un *tip* de pipeta o un hisopo estéril. Para facilitar la preparación del inóculo, se adicionó 100 µL de Tween 20. La mezcla resultante de conidios y fragmentos de hifas se transfirió a un tubo estéril y se dejó sedimentar durante 3 a 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril y se homogeneizó con vórtex durante 15 segundos. La densidad de la suspensión se leyó en un espectrofotómetro (Labsystems Multiskan Multisoft, Basingstoke, UK) a 530 nm de longitud de onda y la densidad óptica se ajustó a 0,09-0,13 de absorbancia, lo que equivale aproximadamente a 0,4 a  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

Todas las suspensiones de los inóculos fueron preparadas el día del ensayo y utilizadas dentro de los 30 minutos de su preparación.

**Cuantificación del inóculo:** a partir del inóculo inicial se realizó una dilución 1:10 en agua destilada estéril, de esa dilución se sembró 0,01 mL en agar Sabouraud glucosa (**Ver ANEXO I**). Las placas se incubaron a 28° C durante 36 a 48 h y se observaron cada 24 h hasta ver colonias. Luego se calculó el número de UFC/mL.

**Método de dilución en caldo (MR):** la CIM y la interpretación de los resultados se realizaron según el método de referencia, M38-A2 del CLSI (92).

*-Medio de cultivo:*

Como medio de cultivo para determinar la CIM se utilizó RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Argentina) con L-glutamina y rojo fenol como indicador de pH, sin bicarbonato;

tamponado a pH 7,0 con ácido 3-N-morfolino propano sulfónico 0,165 M (MOPS, Sigma-Aldrich, Argentina) (**Ver ANEXO I**). El mismo se esterilizó por filtración, con filtros de membrana de porosidad 0,22  $\mu\text{m}$  (New Technologies S.A., Argentina).

*-Antifúngicos:*

Se ensayó la actividad *in vitro* del VRC (Pfizer, Argentina), del ITC, de la TRB y de la AMB (todos de Sigma-Aldrich, Argentina). Los antifúngicos evaluados fueron adquiridos como drogas puras y mantenidos al vacío, refrigerados y en desecación. El rango final de concentración de todas las drogas fue de 16 a 0,0313  $\mu\text{g/mL}$ .

*Preparación de las soluciones stock de los antifúngicos.* Las soluciones *stock* se prepararon a concentraciones 100 veces superiores a la máxima concentración ensayada (1600  $\mu\text{g/mL}$ ). Las cantidades necesarias para preparar las soluciones fueron pesadas en balanza analítica calibrada. Las soluciones de todos los antifúngicos ensayados se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO, Anedra, Argentina). Las mismas fueron fraccionadas en viales estériles y mantenidas en *freezer* a - 70 °C hasta el momento de ser utilizadas.

*Preparación de las diluciones de los antifúngicos.* Las disoluciones de los antifúngicos se prepararon siguiendo el método de las diluciones dobles seriadas aditivas (92). A partir de la solución *stock* se realizaron una serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada (**Ver ANEXO II**). Posteriormente se realizó una dilución 1:50, tomando 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo y transfiriendo ese volumen a otro tubo que contenía 4,9 mL de RPMI. La concentración de antifúngico quedó, de esta forma, al doble de la concentración final deseada (de 32 a 0,06  $\mu\text{g/mL}$ ).

*Preparación de las placas de antifúngicos (Ver ANEXO II).* Se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos, fondo en U, estériles (Greiner Bio-One, EE.UU.). Las mismas se cargaron con 100  $\mu\text{L}$  de la solución del antifúngico correspondiente. A cada columna le

correspondió una dilución de la droga, la columna 1 se cargó con la dilución más concentrada y así, sucesivamente, en concentración decreciente hasta la columna 10. Las columnas 11 y 12 se cargaron con 100  $\mu$ L de RPMI sin antifúngico, y correspondieron a las columnas control de crecimiento (CC) y control de esterilidad (CE), respectivamente. Una vez cargadas, fueron envueltas con papel *film* o con papel de aluminio, para las placas con AMB, para evitar la evaporación. Se las conservó en *freezer* a - 70 °C hasta su uso.

*-Inoculación e incubación de las placas:*

El día del ensayo las placas de antifúngicos fueron retiradas del *freezer* a - 70 °C y dejadas a temperatura ambiente hasta su completa descongelación.

En cada microplaca se procesaron 8 cepas, 5 de *A. terreus complex* y las 3 cepas control utilizadas. Cada fila, de la A a la E, correspondió a un aislamiento distinto y de la F a la H, a las cepas control. En cada pocillo de las columnas 1 a la 11, se inocularon 100  $\mu$ L de la suspensión del inóculo diluido en RPMI. La columna 11 sin antifúngico, correspondió a la columna CC. En los pocillos de la columna 12, sin antifúngico, sólo se cargó 100  $\mu$ L de RPMI y correspondió a la columna CE (**Ver Anexo II**).

Al inocular las placas, las concentraciones de los pocillos se diluyeron a la mitad, en consecuencia, la concentración final de los antifúngicos resultó entre 16  $\mu$ g/mL a 0,03  $\mu$ g/mL para todos los antifúngicos ensayados.

Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 48 h sin agitación.

*-Lectura de los resultados de CIM:*

El crecimiento en cada pocillo fue comparado visualmente con el desarrollo en el pocillo CC, utilizando la siguiente escala numérica:

0, ópticamente claro ( $\approx$  100 % de inhibición)



- 1, ligeramente turbio ( $\approx$  80 % de inhibición)
- 2, disminución prominente de la turbidez ( $\approx$  50 % de inhibición)
- 3, leve disminución de la turbidez
- 4, sin reducción de la turbidez.

Se consideró como punto final para la AMB y los triazoles la menor concentración que impidió cualquier crecimiento discernible visualmente a las 48 h (puntuación 0 o 100 % de inhibición) y para la TRB la concentración de antifúngico que produjo una inhibición del 80 % en el crecimiento visual a las 48 h (puntuación 1).

*-Interpretación de los resultados de CIM:*

Si bien los puntos de corte clínicos para categorizar los hongos miceliales no han sido establecidos, para el análisis se utilizaron los puntos de corte propuestos en el documento M38-A2 (92) (Tabla 1).

Por otra parte, se hizo un análisis en paralelo de acuerdo al punto de corte epidemiológico (PCE) especie-específico propuesto por Espinel-Ingroff y col. (108,109), para la AMB, el VRC y el ITC frente a *A. terreus* (Tabla 1). El PCE divide a los aislados como *wild-type* (WT) y no-WT (110,111).

Para este análisis se tuvieron en cuenta las siguientes definiciones:

Población WT: es la subpoblación de aislados/CIM en una combinación de especies-drogas, sin mecanismos adquiridos de resistencia detectables.

PCE: se calcula teniendo en cuenta la distribución normal de la CIM, y se define como el mayor valor de la CIM de la cepa WT sensible. Permiten identificar a aquellas cepas con sensibilidad reducida o alertar tempranamente sobre cambios en los patrones de sensibilidad de los organismos a la droga que está siendo evaluada.

**Tabla 1.** Puntos de corte utilizados para interpretar los valores de CIM\*

Droga antifúngica	PC M38-A2 (µg/mL) (92)			PCE (µg/mL) (108,109)
	S	I	R	
Anfotericina B				4
Itraconazol	≤ 1	2	≥ 4	1
Voriconazol				1

\*Método de referencia M38-A2 del CLSI, lectura a las 48 h. PC: puntos de corte; PCE: puntos de corte epidemiológicos; S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente.

*-Control de calidad:*

Como cepas de control de calidad se incluyeron *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 y *A. flavus* ATCC 204304.

Con respecto a la combinación TRB/*Aspergillus* spp. no hay datos de referencia de los rangos de CIM para las cepas control de calidad, como tampoco han sido establecidos los puntos de corte para este antifúngico frente a este hongo. Por ese motivo, se determinó 20 veces la CIM de TRB frente a la cepa control *A. terreus* ATCC MYA-3633, en diferentes días para establecer el rango control del procedimiento.

El inóculo de *A. flavus* ATCC 204304 y el de *A. terreus* ATCC MYA-3633 se los preparó según el documento M38-A2 (92). El procedimiento es el mismo que se utilizó para preparar los inóculos de los aislamientos de *A. terreus complex* estudiados.

Los inóculos de las levaduras utilizadas como control de procedimiento fueron preparados como lo indica el documento M27-A3 del CLSI (112) **(Ver Anexo II)**.

*-Presentación de los datos:*

Se calculó la media geométrica, rango, CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> (CIM a la cual el 50% y el 90% de los aislados fueron inhibidos respectivamente)

**Método de difusión en agar (MT):** la determinación de la sensibilidad por difusión en agar se realizó según el documento M51-A del CLSI (96) y se eligieron las tabletas Neo-Sensitabs™ Rosco, como reservorios de los antifúngicos a evaluar, pues la técnica se basa en el documento M51-A del CLSI tanto en el desarrollo de la prueba como en la interpretación de los resultados (96,106).

*-Medio de cultivo:*

Como medio de cultivo se utilizó agar Mueller-Hinton (MH-Britania, Argentina) no suplementado (pH 7,2-7,4), es decir sin el agregado adicional de glucosa ni de azul de metileno (**Ver ANEXO I**).

*-Tabletas:*

Se utilizaron tabletas Neo-Sensitabs™ Rosco de 9 mm de diámetro con 10 µg de ITC, 1 µg de VRC, 10 µg de AMB y 30 µg de TRB.

*-Inoculación e incubación de las placas:*

Se utilizaron placas de Petri estériles de 9 cm con 20 mL del medio de cultivo utilizado.

El inóculo ajustado sin diluir se sembró por inundación, dentro de los 15 minutos de haber leído la densidad óptica. Se inundó la placa de MH con 0,5 mL de dicho inóculo, se dejó en contacto 5 minutos y se extrajo el líquido excedente con una pipeta estéril. Las placas fueron colocadas en estufa a 37° C durante 10 minutos boca abajo y con las tapas ligeramente abiertas para permitir el secado del excedente de líquido que hubiera quedado. Las tabletas se colocaron sobre la superficie del agar de la placa previamente inoculada con la ayuda de una pinza estéril, dejando 20 mm desde el borde de la placa y 40 mm entre las tabletas. En cada placa se colocaron como máximo 3 tabletas. Luego las placas se incubaron a 35 ± 2° C durante 48 h.

*-Lectura e interpretación de los resultados:*

La lectura fue visual y se utilizó una regla para medir el diámetro del halo externo de la zona de inhibición. La misma se realizó a las 24 h y 48 h<sup>1</sup> para evaluar si hay diferencias categóricas entre las lecturas (96,106). El diámetro del halo de inhibición del VRC, del ITC y de la TRB se midió hasta el punto más próximo en el que hay una reducción importante en el crecimiento (80%), ignorando el efecto de arrastre o *trailing* alrededor del borde de la zona de inhibición o la presencia de hifas que se extendieron en la zona de inhibición cuando estos efectos fueron observados. Por el contrario, al testear a la AMB se consideró una inhibición completa (100%) del crecimiento.

Para interpretar los resultados se utilizaron los puntos de corte propuestos en el documento 3.15.0 de Neo-Sensitabs™ Rosco (106) y son los que se establecen en el documento M51-S1 del CLSI (113). El documento de Rosco sólo da valores para la categoría sensible (106). Debido a esto, únicamente con el fin de facilitar el análisis de la concordancia categórica entre ambos métodos, se emplearon los criterios de interpretación utilizados por Espinel-Ingroff y col. (100) donde asignan valores a las categorías de sensibilidad intermedia y resistente (Tabla 2).

**Tabla 2.** Categorías utilizadas para interpretar los resultados del método de difusión en agar utilizando tabletas Neo-Sensitabs™

Tabletas Neo-Sensitabs™	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	S	I	R
Anfotericina B, 10 µg	≥ 15	14-13	≤ 12
Itraconazol, 10 µg	≥ 17	16-14	≤ 13
Voriconazol, 1 µg			

S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente; mm: milímetros

<sup>1</sup> El documento 3.15.0 de Rosco establece que para el género *Aspergillus* la lectura debe realizarse a las 24 h, no hace diferencia para las distintas especies. El documento M51-A del CLSI indica que para especies del género *Aspergillus* distintas a *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger*, la lectura debe realizarse a las 48 h.

*-Control de calidad:*

Como cepas de control de calidad se incluyó a *C. krusei* ATCC 6258 (96,106). Cada vez que se utilizó un nuevo lote de placas, frente a la AMB, el ITC y el VRC. Los resultados de los halos de inhibición de esta levadura fueron comparados con los intervalos establecidos en el documento de referencia, con el fin de validar las pruebas.

Con respecto a la TRB no hay datos de referencia de los rangos del diámetro del halo de inhibición de las cepas control de calidad para *Aspergillus* spp., como tampoco han sido establecidos los puntos de corte para este antifúngico. Por ese motivo, se realizaron 20 repeticiones de difusión en agar con TRB y las cepas control *C. krusei* ATCC 6258 y *A. terreus* ATCC MYA-3633 en diferentes días para establecer el rango control del procedimiento.

El inóculo de *A. terreus* ATCC MYA-3633 se lo preparó según el documento M38-A2 (92) y para inocular la placa se lo utilizó sin diluir, al igual que los inóculos de los aislamientos de *A. terreus complex* estudiados. El inóculo de la levadura utilizada como control de procedimiento fue preparado como lo indica el documento M27-A3 del CLSI (112) (**Ver Anexo II**).

*-Presentación de los resultados:*

Se estableció rango de los diámetros de inhibición y se calculó la media aritmética y desviación estándar del total de los aislados frente a cada droga probada.

La significancia estadística de las diferencias en los diámetros de los halos de inhibición se determinó mediante el estudio de la *t* de *Student*, considerándose un nivel de significación de  $p < 0,01$ .

### **Comparación entre el método de microdilución y de difusión**

Para conocer el grado de asociación entre el método de referencia y el método de difusión, primero se debió comprobar si existe tendencia lineal en la relación entre las dos variables. Para esto se utilizaron los diagramas de dispersión o nube de puntos para cada una de las drogas evaluadas, donde se representó en el eje X el log<sub>2</sub> de las CIM (variable X: variable independiente o predictiva) y en el eje de las Y los diámetros de inhibición de cada aislamiento (variable Y: variable dependiente o de criterio). Luego, sólo si la tendencia lineal fue comprobada, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson para cada antifúngico y se realizaron los correspondientes análisis de regresión lineal.

Por otro lado, se determinó la concordancia categórica entre ambos métodos. Se observaron distintas categorías de discrepancias basadas en los puntos de corte presentados en la Tabla 1 y 2:

- Discrepancias *muy mayores* (DMM): se calcularon sobre el número de aislados que fueron clasificados como sensibles por el MT y como resistentes por el MR.
- Discrepancias *mayores* (DM): se determinaron por el número de aislados resistentes por el MT y sensibles por el MR.
- Discrepancias *menores* (Dm): se definieron cuando por uno de los métodos los aislados se categorizaron como sensible o resistente, y por el otro con sensibilidad intermedia.

## **RESULTADOS**

### ***Aislamientos. Origen y obtención***

Se estudiaron 52 aislados del complejo *A. terreus*, 28 ambientales y 24 clínicos, los cuales se muestran en la Tabla 3<sup>2</sup>.

En ninguna de las tablas que se presentan a continuación se individualizó a *A. terreus* s.s., *A. alabamensis*, *A. aureoterreus*, *A. carneus* y *A. terreus complex*, ya que la sensibilidad *in vitro* de estos aislados, por ambos métodos, fue muy similar entre sí.

### ***Estudio in vitro de la sensibilidad a los antifúngicos***

#### **Método de microdilución en caldo**

En la Tabla 4 se observan la distribución de los valores de CIM de la AMB, el VRC, el ITC y la TRB frente a los 52 aislados de *A. terreus complex* estudiados por el MR.

En la Tabla 5 se observan los valores de CIM de la AMB, el VRC y el ITC para las cepas control de calidad. Todos los valores se encontraban dentro del rango establecido en los documentos de referencia.

---

<sup>2</sup> Todos los aislamientos obtenidos de raspado de uña de mano y pie fueron considerados los agentes etiológicos ya que se cumplieron los requisitos mínimos aceptados para el diagnóstico de onicomicosis causada por un hongo filamentoso no dermatofítico (133). El aislamiento obtenido del lavado broncoalveolar fue de un caso de aspergillosis probable. Los aislamientos recuperados de pacientes quemados fueron considerados como colonizantes.

**Tabla 3.** Aislados de *Aspergillus* sección Terrei estudiados en este trabajo (n = 52)

IMR-MF	Especie	<i>calM</i> <sup>a</sup> <i>benA</i>	Origen	IMR-MF	Especie	<i>calM</i> <sup>a</sup> <i>benA</i>	Origen
202	<i>A. terreus s.s</i>	LN734824	aire externo	679	<i>A. terreus s.s</i>	LN734845	aire externo
208	<i>A. terreus s.s</i>	LN734825	aire externo	694	<i>A. terreus s.s</i>	LN734846	tierra
482	<i>A. terreus s.s</i>	LN734826	aire externo	714	<i>A. t. complex</i> <sup>b</sup>	-	uña de pie
549	<i>A. terreus s.s</i>	LN734827	aire interno hospital	715	<i>A. terreus s.s</i>	LN734847	uña de pie
550	<i>A. terreus s.s</i>	LN734828	aire interno hospital	717	<i>A. terreus s.s</i>	LN734848	árbol
563	<i>A. t. complex</i> <sup>b</sup>	-	uña de mano	719	<i>A. terreus s.s</i>	LN734849	tierra
565	<i>A. terreus s.s</i>	LN734829	uña de mano	721	<i>A. terreus s.s</i>	LN734850	uña de mano
592	<i>A. terreus s.s</i>	LN734830	aire externo	724	<i>A. terreus s.s</i>	LN734851	uña de pie
598	<i>A. terreus s.s</i>	LN734831	uña de pie	727	<i>A. terreus s.s</i>	LN734852	tierra
604	<i>A. t. complex</i> <sup>b</sup>	-	uña de pie	728	<i>A. terreus s.s</i>	LN734853	tierra
625	<i>A. terreus s.s</i>	LN734832	piel de quemado	760	<i>A. terreus s.s</i>	LN734854	aire externo
626	<i>A. t. complex</i> <sup>b</sup>	-	uña de pie	774	<i>A. terreus s.s</i>	LN734855	aire interno hospital
629	<i>A. terreus s.s</i>	LN734833	piel de quemado	812	<i>A. terreus s.s</i>	LN734856	aire interno hospital
630	<i>A. terreus s.s</i>	LN734834	piel de quemado	829	<i>A. terreus s.s</i>	LN734857	aire externo
647	<i>A. terreus s.s</i>	LN734835	uña de pie	22	<i>A. terreus s.s</i>	LN734858	aire externo
650	<i>A. terreus s.s</i>	LN734836	uña de pie	554	<i>A. terreus s.s</i>	LN734859	aire interno hospital
651	<i>A. terreus s.s</i>	LN734837	BAL	597	<i>A. terreus s.s</i>	LN734860	uña de pie
652	<i>A. terreus s.s</i>	LN734838	uña de pie	627	<i>A. terreus s.s</i>	LN734861	piel de quemado
659	<i>A. terreus s.s</i>	LN734839	uña de pie	718	<i>A. terreus s.s</i>	LN734862	árbol
662	<i>A. terreus s.s</i>	LN734840	uña de pie	723	<i>A. terreus s.s</i>	LN734863	uña de pie
665	<i>A. terreus s.s</i>	LN734841	uña de pie	448	<i>A. alabamensis</i>	LN890300.1	aire interno hospital
666	<i>A. terreus s.s</i>	LN734842	uña de pie	644	<i>A. alabamensis</i>	LN890301.1	tierra
667	<i>A. t. complex</i> <sup>b</sup>	-	uña de pie	517	<i>A. alabamensis</i>	LN890305.1	aire interno hospital
672	<i>A. terreus s.s</i>	LN734843	tierra	815	<i>A. aureoterreus</i>	LN890302.1	aire interno hospital
673	<i>A. terreus s.s</i>	LN734844	tierra	524	<i>A. carneus</i> <sup>b</sup>	-	tierra
830	<i>A. t. complex</i> <sup>b</sup>	-	aire externo	722	<i>A. t. complex</i> <sup>b</sup>	-	aire interno hospital
							aire externo

<sup>a</sup> Número de acceso en *European Nucleotide Archive (ENA)* de los resultados obtenidos por secuenciación parcial del gen Calmodulina (*calM*) y  $\beta$ -tubulina (*benA*), respectivamente. <sup>b</sup> Aislados que fueron identificados sólo en base su macro y micromorfología. n: número; IMR-MF: Instituto de Medicina Regional-Micología Filamentosos. Colección de cultivos; BAL: lavado broncoalveolar; *A. t.*: *A. terreus*; *s.s*: *sensu stricto*



**Tabla 4.** Distribución de los valores de CIM del voriconazol, el itraconazol, la terbinafina y la anfotericina B frente a los 52 aislados de *Aspergillus terreus complex* obtenidos por el método de referencia\*

Aislados (no. testeados)	Droga	MG	No. de aislados con CIM (µg/mL)									
			≤ 0,03	0,06	0,125	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0	
Clínicos (24)	AMB	1,89							6	<u>15</u>	<b>2</b>	1 <sup>a</sup>
	VRC	0,28			2	<u>16</u>	<b>6</b>					
	ITC	0,21	3	3	<u>7</u>	4	<b>7</b>					
	TRB	0,11	3	7	<u>6</u>	<b>8</b>						
Ambientales (28)	AMB	1,90							9	<u>13</u>	<b>5</b>	1 <sup>a</sup>
	VRC	0,38			1	9	<b>18</b>					
	ITC	0,18	1	5	7	<u>11</u>	<b>4</b>					
	TRB	0,07	8	<u>7</u>	<b>10</b>	3						

\*Método de referencia M38-A2 del CLSI, lectura a las 48 h. AMB: anfotericina B; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol; TRB: terbinafina. no.: número; MG: Media Geométrica. Los valores subrayados corresponden a la CIM<sub>50</sub> y los valores en negrita a la CIM<sub>90</sub>. <sup>a</sup> Valores de CIM de AMB por encima del punto de corte epidemiológico (PCE = 4 µg/mL), los cuales corresponden a un aislado de *A. terreus complex* de origen clínico (uña de pie) y a *A. terreus s.s* de origen ambiental.

**Tabla 5.** Valores de CIM de la anfotericina B, del voriconazol y del itraconazol para las cepas control de calidad

Drogas antifúngicas	Cepas Control de Calidad (CIM µg/mL*)		
	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
AMB	2	0,5-2	1
VRC	0,5	0,03-0,125	0,25-0,5
ITC	0,25	0,06-0,125	0,25

\*CIM (Concentración inhibitoria mínima) obtenidas por el método de referencia M38-A2 del CLSI, lectura a las 48 h. AMB: anfotericina B; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol

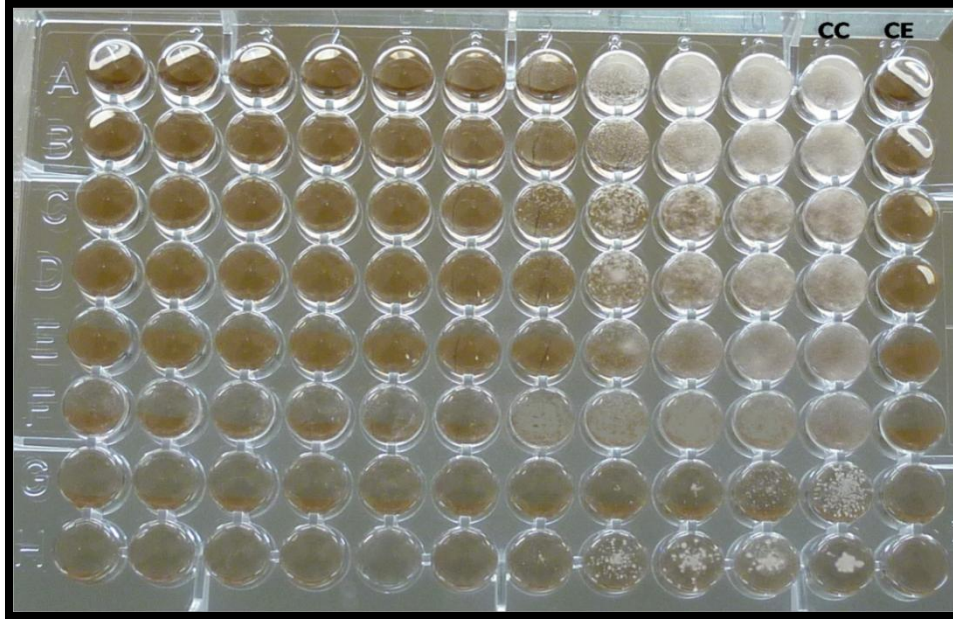
Para la TRB no han sido establecidos los puntos de corte y tampoco hay datos de referencia de los rangos de CIM de las cepas control de calidad para *Aspergillus* spp. En la Tabla 6 se muestra el rango control del procedimiento para el MR obtenidos al evaluar las cepas control *A. terreus* ATCC MYA-3633 y *C. krusei* ATCC 6258 frente a la TRB.

**Tabla 6.** Valores de CIM de terbinafina para las cepas control de calidad

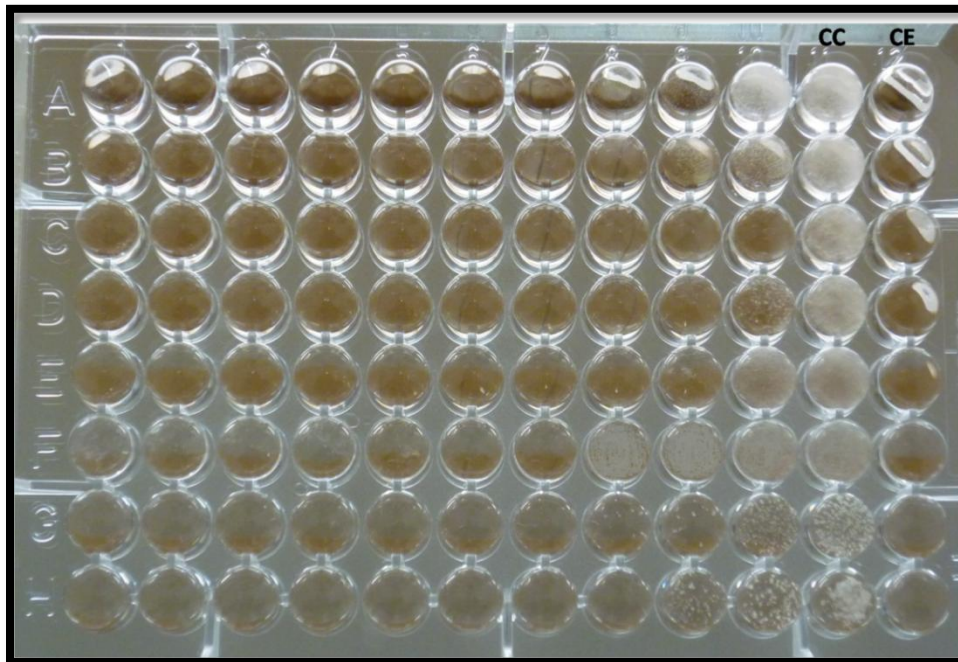
Cepas Control de Calidad	Rango de CIM <sup>a</sup> (µg/mL) (24 h/48 h)
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	4 - ≥ 6 / 8 - ≥ 16
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC MYA-3633	≤ 0,03 / ≤ 0,03 - 0,06

<sup>a</sup> CIM (Concentración inhibitoria mínima) fue determinada por el método de referencia, M38-A2 del CLSI, con lectura a las 24 h y 48 h

En las Fotografías 3 - 6 se muestra la CIM obtenida por el MR de la AMB, el ITC, el VRC y la TRB frente a algunos de los aislados de *A. terreus* estudiados.

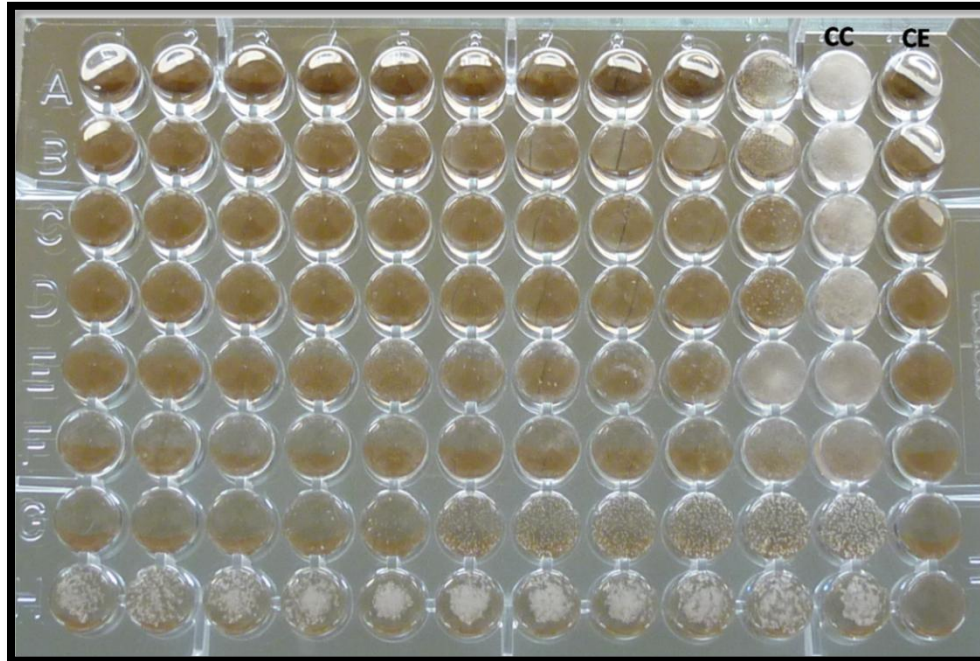


**Fotografía 3.** Placa de microdilución para determinación de CIM de voriconazol por el método de referencia M38-A2. CE: Control de esterilidad, CC: Control de crecimiento. Fila A-E: *Aspergillus terreus* con CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 0,25; 0,25; 0,5; 0,25 y 0,25, respectivamente. Fila F-H: *Aspergillus flavus* ATCC 204304 (CIM 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (CIM 0,03 $\mu\text{g/mL}$ ) y *Candida krusei* ATCC 6258 (CIM 0,125 $\mu\text{g/mL}$ )

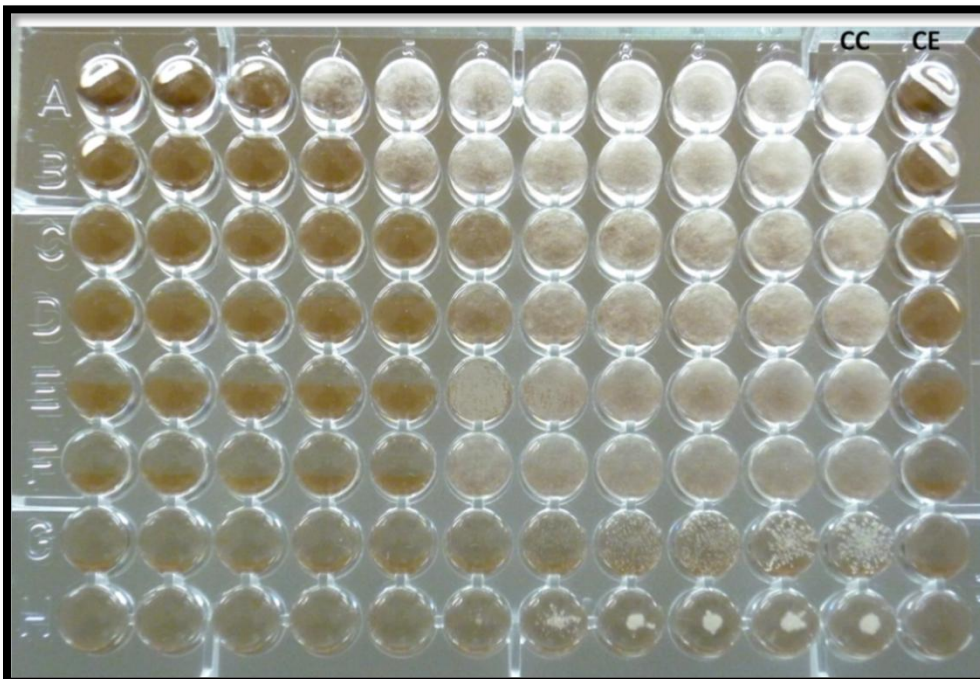


**Fotografía 4.** Placa de microdilución para determinación de CIM de itraconazol por el método de referencia M38-A2. CE: Control de esterilidad, CC: Control de crecimiento. Fila A-E: *Aspergillus terreus* con CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 0,06; 0,125;  $\leq 0,03$ ; 0,06; y 0,06, respectivamente. Fila F-H: *Aspergillus flavus* ATCC 204304 (CIM 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (CIM 0,03 $\mu\text{g/mL}$ ) y *Candida krusei* ATCC 6258 (CIM 0,06 $\mu\text{g/mL}$ )





**Fotografía 5.** Placa de microdilución para determinación de CIM de terbinafina por el método de referencia M38-A2CE: Control de esterilidad, CC: Control de crecimiento. Fila A-E: *Aspergillus terreus* con CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )  $\leq 0,03$  desde la fila A-D, y de 0,06 en la E. Fila F-H: *Aspergillus terreus* ATCC MYA-3633 (CIM 0,06  $\mu\text{g/mL}$ ), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (CIM 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ), *Candida krusei* ATCC 6258 (CIM  $\geq 16\mu\text{g/mL}$ )



**Fotografía 6.** Placa de microdilución para determinación de CIM de anfotericina B por el método de referencia M38-A2. CE: Control de esterilidad, CC: Control de crecimiento. Fila A-E: *Aspergillus terreus* con CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de 8; 2; 1; 1 y 1, respectivamente. Fila F-H: *Aspergillus flavus* ATCC 204304 (CIM 1 $\mu\text{g/mL}$ ), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (CIM 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ) y *Candida krusei* ATCC 6258 (CIM 1 $\mu\text{g/mL}$ )

**Método de difusión en agar**

En la Tabla 7 se observan los datos de la actividad antifúngica de la AMB, el VRC, el ITC y la TRB frente a los 52 aislados de *A. terreus complex* estudiados por el MT.

El aislado IMR-MF 524, identificado morfológicamente como *A. carneus* no creció en la placa de difusión a las 24 h, pero sí a las 48 h.

**Tabla 7.** Halos de inhibición obtenidos por el método de difusión en agar de la anfotericina B, el voriconazol, el itraconazol y la terbinafina frente a los 52 aislados de *Aspergillus terreus*

Aislados (no. testeados)	Tableta antifúngica <sup>a</sup>	Halo de inhibición <sup>b</sup> (mm)					
		24 h			48 h		
		Rango	MA	DS	Rango	MA	DS
Clínicos (24)	AMB	11-15	12,88	1,36	9-13	9,88	1,36
	VRC	25-44	31,29	4,80	25-44	30,29	5,05
	ITC	20-28	22,50	1,96	18-28	21,79	2,32
	TRB	42-60	49,58	5,31	41-60	47,12	5,94
Ambientales (28)	AMB	11-15	12,36	1,52	9-13	9,39	1,17
	VRC	23-38	30,61	3,27	22-38	29,11	3,69
	ITC	18-25	21,64	2,10	18-25	20,68	2,04
	TRB	38-68	49,82	6,76	36-66	46,54	6,95

<sup>a</sup> La concentración de las drogas para el ensayo con tabletas Neo-Sensitabs™ fueron: anfotericina B 10 µg/tableta, voriconazol 1 µg/tableta, itraconazol 8 µg/tableta, terbinafina 30 µg/tableta. <sup>b</sup>Halos de inhibición obtenidos a partir del método de difusión en agar usando tabletas Neo-Sensitabs™, con lectura a las 24 h y 48 h. no.: número; AMB: anfotericina B; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol; TRB: terbinafina; MA: Media Aritmética; DS: Desviación estándar

En la Tabla 8 se observan los valores de los diámetros de los halos de inhibición de la AMB, el VRC y el ITC para la cepa control de calidad. Todos los valores se encontraban dentro del rango establecido en el documento de referencia.

**Tabla 8.** Diámetros de halos de inhibición de la anfotericina B, del voriconazol y del itraconazol para la cepa control de calidad

Cepa Control de Calidad y drogas antifúngicas <sup>a</sup>	Rango de diámetro del halo de inhibición <sup>b</sup> (mm)	
	24 h	48 h
<b><i>Candida krusei</i> ATCC 6258</b>		
AMB	19-23	17-20
VRC	33-35	30-35
ITC	24-26	23-27

<sup>a</sup> La concentración de las drogas para el ensayo con tabletas Neo-Sensitabs<sup>TM</sup> fueron: anfotericina B 10 µg/tableta, voriconazol 1 µg/tableta, itraconazol 8 µg/tableta. <sup>b</sup>Halos de inhibición obtenidos a partir del método de difusión en agar usando tabletas Neo-Sensitabs<sup>TM</sup>, con lectura a las 24 h y 48 h. AMB: anfotericina B; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol

Para la TRB no han sido establecidos los puntos de corte y tampoco hay datos de referencia de los rangos del diámetro del halo de inhibición de las cepas control de calidad para *Aspergillus* spp. En la Tabla 9 se muestra el rango control del procedimiento para el MT obtenidos al evaluar las cepas control *A. terreus* ATCC MYA-3633 y *C. krusei* ATCC 6258 frente a la TRB.

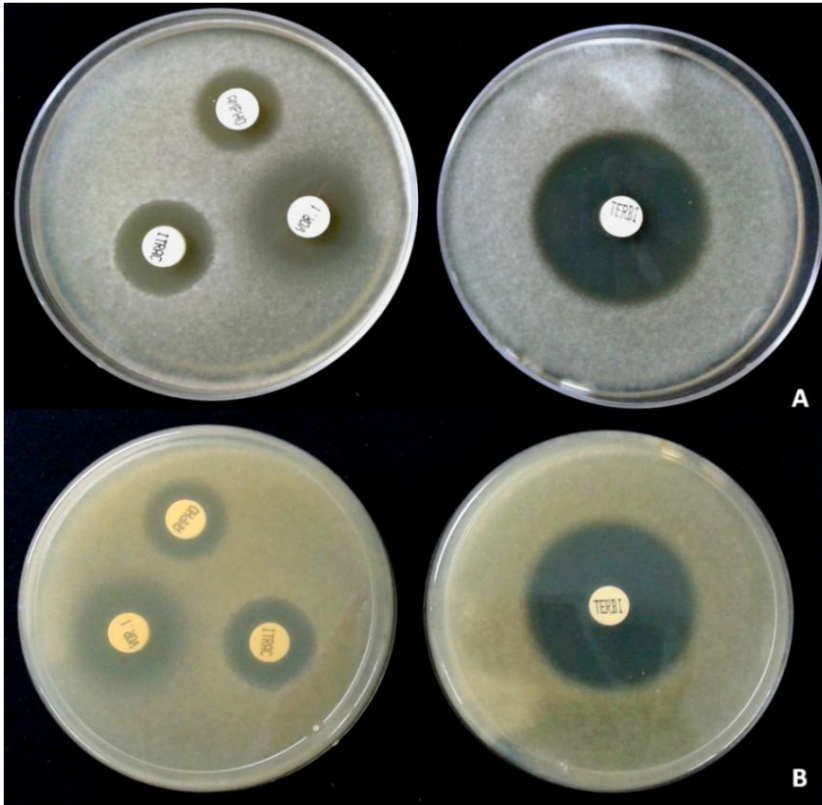
**Tabla 9.** Diámetros de halos de inhibición de terbinafina para las cepas control de calidad

Cepas Control de Calidad	Rango de los halos de inhibición <sup>a</sup> (mm) (24 h / 48 h)
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	12 - 18 / 12 - 17
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC MYA-3633	41 - 46 / 34 - 37

<sup>a</sup> Halos de inhibición obtenidos a partir del método de difusión en agar usando tabletas Neo-Sensitabs<sup>TM</sup> de terbinafina 30 µg/tableta, con lectura a las 24 h y 48 h

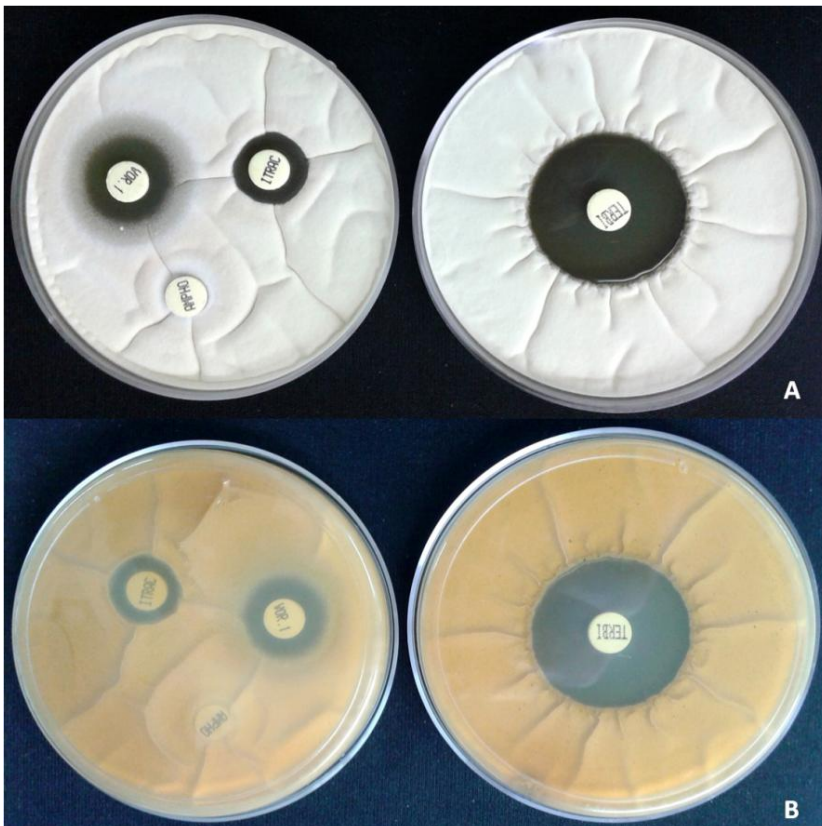
En las Fotografías 7 - 9 se muestran los halos de inhibición obtenidos por el MT de la AMB, el ITC, el VRC y la TRB frente a uno de los aislados de *A. terreus* estudiado y la cepa control de calidad *C. krusei* ATCC 6258.





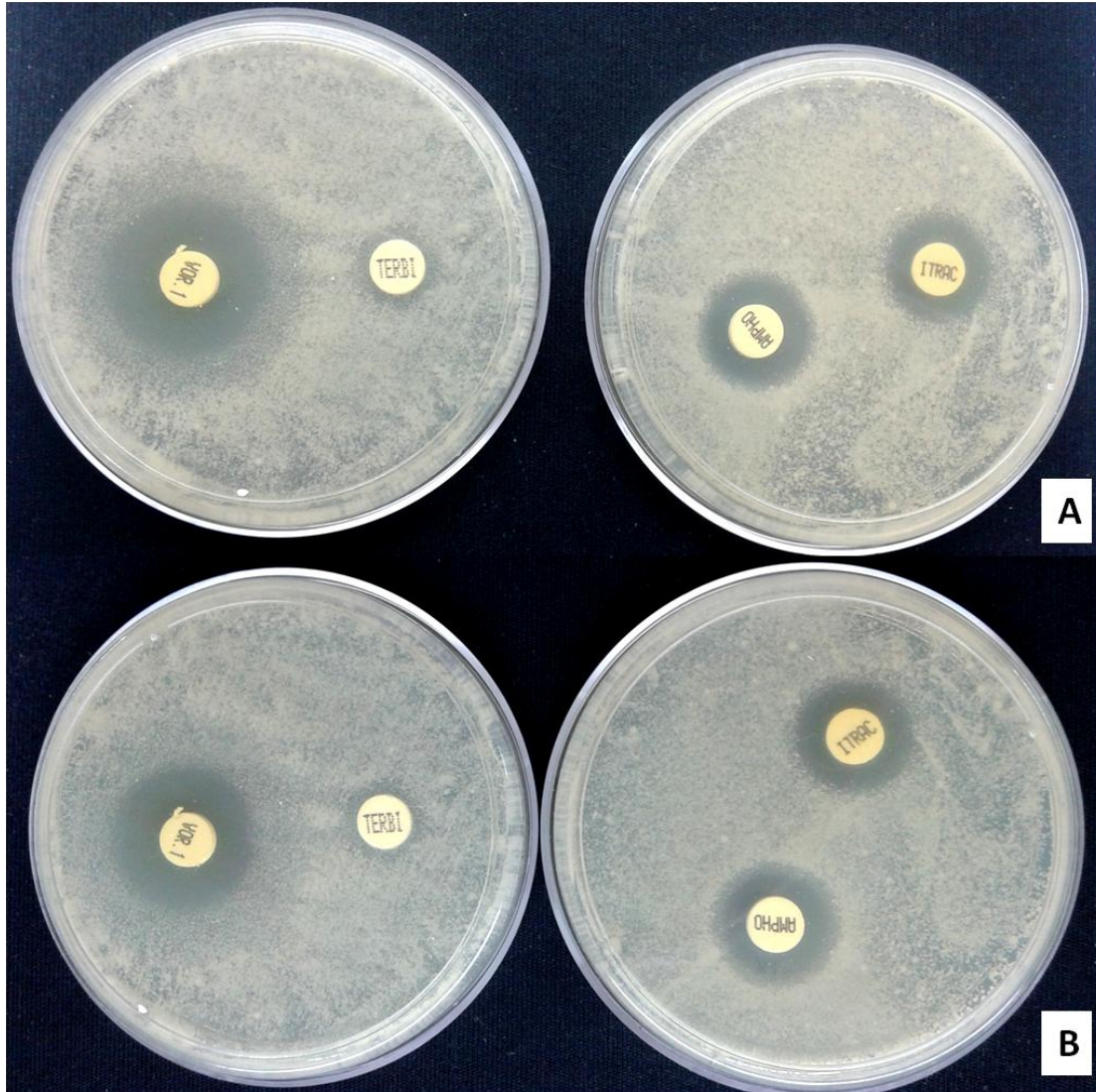
**Fotografía 7.** Difusión en agar con las tabletas Neo-Sensitabs™ de anfotericina B 10 µg/tableta, voriconazol 1 µg/tableta, itraconazol 8 µg/tableta y terbinafina 30 µg/tableta frente a uno de los aislados de *Aspergillus terreus* estudiado. A,B: Lectura a las 24 h, anverso y reverso, respectivamente.

VOR. 1: Voriconazol, AMPHO: Anfotericina B, TERBI: Terbinafina, ITRAC: Itraconazol.



**Fotografía 8.** Difusión en agar con las tabletas Neo-Sensitabs™ de anfotericina B 10 µg/tableta, voriconazol 1 µg/tableta, itraconazol 8 µg/tableta y terbinafina 30 µg/tableta frente a uno de los aislados de *Aspergillus terreus* estudiado. A,B: Lectura a las 48 h, anverso y reverso, respectivamente.

VOR. 1: Voriconazol, AMPHO: Anfotericina B, TERBI: Terbinafina, ITRAC: Itraconazol.



**Fotografía 9.** Difusión en agar con la tabletas Neo-Sensitabs<sup>TM</sup> de anfotericina B (10 µg/tableta), voriconazol (1 µg/tableta), itraconazol (8 µg/tableta) y terbinafina (30 µg/tableta) frente a la cepa control de calidad *Candida krusei* ATCC 6258. A: Lectura a las 24 h. B: Lectura a las 48 h. VOR. 1: Voriconazol, AMPHO: Anfotericina B, TERBI: Terbinafina, ITRAC: Itraconazol.

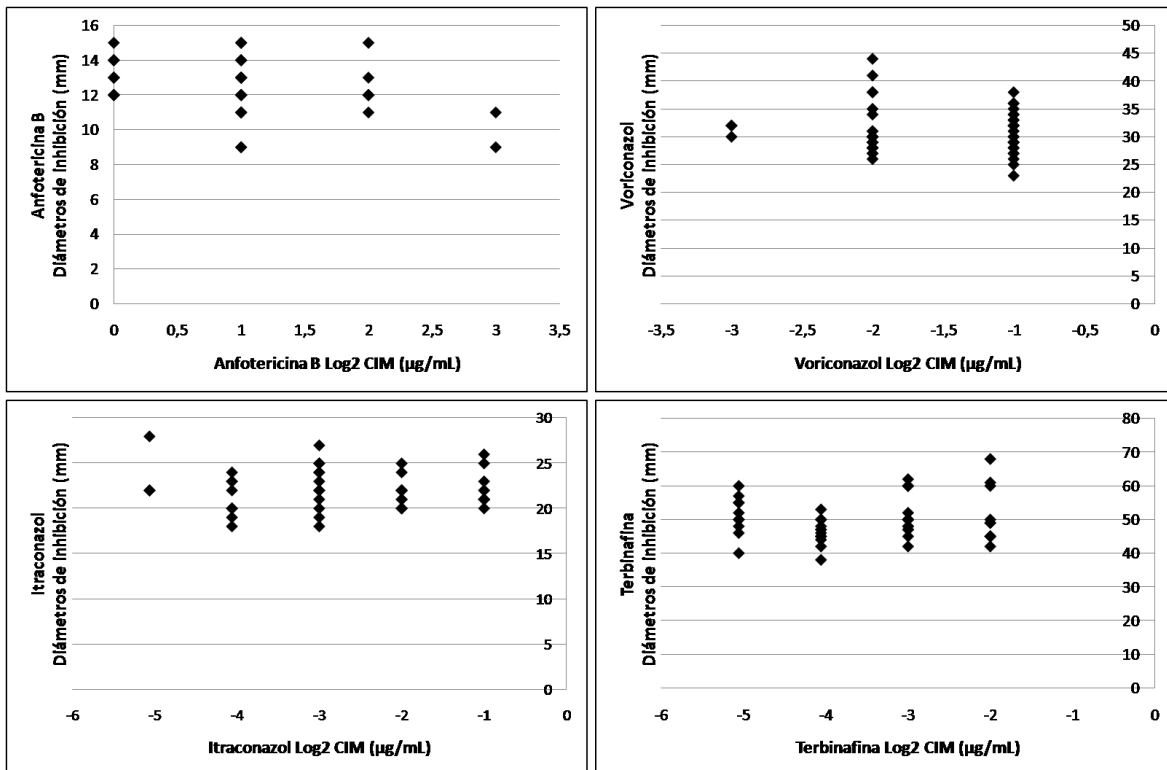


## Comparación entre el método de microdilución y de difusión

### Asociación entre ambos métodos. Gráficos de dispersión

Para definir si era factible aplicar el coeficiente de correlación de Pearson, se realizaron los diagramas de dispersión de las CIM en función de los halos de inhibición para cada una de las drogas (Gráfico 1). Con el fin de mejorar la visualización de la nube de puntos, se aplicó Log<sub>2</sub> al valor de la CIM, de manera de linealizar los resultados. Para ninguno de los antifúngicos estudiados se observó disposición lineal entre las variables CIM y halo de inhibición. Por lo tanto, no pudo calcularse el coeficiente de correlación de Pearson ni realizarse los correspondientes análisis de regresión lineal.

**Gráfico 1.** Diagrama de dispersión que relaciona las variables Log<sub>2</sub> CIM y diámetro de inhibición de los 52 aislados de *A. terreus complex* y los 4 antifúngicos estudiados



### Concordancia entre ambos métodos

En la Tabla 10 se muestra, según el método y el antifúngico evaluado, la distribución por categorías de sensibilidad, las distintas categorías de discrepancias y el porcentaje de concordancia entre ambos métodos.

Para la TRB no fue posible establecer las categorías sensible-resistente, como tampoco se analizó la concordancia entre los métodos debido a que no hay puntos de corte para este antifúngico frente a *Aspergillus* spp.

**Tabla 10.** Evaluación de la sensibilidad antifúngica de aislados de *Aspergillus terreus* por el método de referencia y el método de difusión en agar. Discrepancias y porcentaje de concordancia entre ambos métodos

Droga antifúngica	Método <sup>a</sup>	Nº de aislados en cada categoría <sup>b</sup>			Discrepancias			% C <sup>c</sup>
		S	I	R	<i>muy mayores</i>	<i>mayores</i>	<i>menores</i>	
AMB	MR	15	28	9				
	MT 24 h <sup>d</sup>	4	20	27	1	7	20	43,14
	MT 48 h	0	4	48	0	14	26	23,08
VRC	MR	52	0	0				
	MT 24 h	51 <sup>d</sup>	0	0	0	0	0	100
	MT 48 h	52	0	0	0	0	0	100
ITC	MR	52	0	0				
	MT 24 h	51 <sup>d</sup>	0	0	0	0	0	100
	MT 48 h	52	0	0	0	0	0	100

<sup>a</sup> MR: Método de referencia M38-A2, CLSI, con lectura a las 48 h; MT: Método de difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs™, con lectura a las 24 y 48 h. <sup>b</sup> Número de aislados cuyas CIM (Concentración inhibitoria mínima) y diámetros del halo de inhibición, en milímetros, para el voriconazol y el itraconazol que estaban dentro de las categorías asignadas de S: Sensible, CIM ≤ 1 µg/mL y diámetro ≥ 17 mm; I: Intermedio, CIM = 2 µg/mL y diámetro 14-16 mm; R: Resistente, CIM ≥ 4 µg/mL y diámetro ≤ 13 mm y para anfotericina B, Sensible, CIM ≤ 1 µg/mL y diámetro ≥ 15 mm; I: Intermedio, CIM = 2 µg/mL y diámetro 13-14 mm; R: Resistente, CIM ≥ 4 µg/mL y diámetro ≤ 12 mm. <sup>c</sup> C: Concordancia: Porcentaje de concordancia entre diámetros de la zona de inhibición, en milímetros, y CIM. AMB: anfotericina B; VRC: voriconazol; ITC: itraconazol. <sup>d</sup> No se obtuvo desarrollo del aislamiento IMR-MF 524, a las 24 h, por el método de difusión.

## **DISCUSIÓN**

### ***Sensibilidad a los antifúngicos. Método de dilución en caldo***

Al analizar la CIM de los antifúngicos estudiados (Tabla 4) se observó que, para los azólicos, el 100% de los aislados mostraron valores bajos de CIM y que la TRB presentó valores, aún más bajos, para los mismos aislados. Mientras que, la AMB exhibió los valores más elevados de CIM frente a la mayoría de los aislados de *A. terreus complex* estudiados (114). Al realizar el análisis en base a los puntos de corte avalados en el documento de referencia M38-A2 (Tabla 1)(92), todos los aislados fueron sensibles al ITC y al VRC, pero no ocurrió lo mismo con la AMB. Esta droga presentó diversos valores de CIM, lo que permitió categorizar a los aislados como sensibles, resistentes y con sensibilidad intermedia, lo cual se discute más adelante en el trabajo.

El uso del VRC, como primera línea, para el tratamiento de la aspergilosis invasora causada por *A. terreus* mejoró la respuesta clínica de los pacientes (76,78,79). Aunque se han documentado fallas en pacientes infectados por *A. terreus* tratados con este antifúngico (76). El VRC presenta un efecto fungistático frente a este hongo (71), mostrando valores de CIM que van desde 0,125 µg/mL a 32 µg/mL, con CIM<sub>90</sub> de 0,5 µg/mL a 2 µg/mL (71,81–83,89,90,108,114–116). En este trabajo, todos los valores de CIM fueron bajos, con un rango de 0,125-0,5 µg/mL y CIM<sub>90</sub> de 0,5 µg/mL, tanto para los aislados clínicos como para los ambientales (Tabla 4, Fotografía 3). El 100 % de los aislados mostraron valores de CIM < PCE propuesto para esta droga frente a *A. terreus* (108), siendo todos WT (Tabla 4), aunque en la literatura se ha informado alrededor de un 3 % de aislados de *A. terreus* no-WT frente a dicho compuesto azólico (108,117).

El ITC, generalmente, se utiliza para el tratamiento de las formas crónicas no invasivas de la aspergilosis y ha demostrado ser eficaz en la aspergilosis broncopulmonar alérgica

(118). Esta droga, al igual que el VRC, también presenta un efecto fungistático frente a *A. terreus* (115), con valores de CIM que van desde 0,07 µg/mL a 8 µg/mL (81–83,89,90,108,114,116). En este trabajo se obtuvieron valores bajos de CIM para ITC, incluso algunos aislados presentaron CIM más bajas que para el VRC, con un rango de ≤ 0,03-0,5 µg/mL y CIM<sub>90</sub> de 0,5 µg/mL, tanto para los aislados clínicos como para los ambientales (Tabla 4, Fotografía 4). El 100% de los aislados mostraron valores de CIM < PCE propuesto para esta droga frente a *A. terreus* (108), siendo todos WT (Tabla 4), similar a otros trabajos donde usaron los PCE para analizar sus aislados (117,119).

Sin embargo, en 2/50 aislados de *A. terreus* estudiados en España (90), en 1/23 hallados en Estados Unidos (89) y en 1/9 aislados de pacientes daneses con fibrosis quística (91), se informaron CIM elevadas para el ITC (CIM ≥2 µg/mL). Este último aislado fue estudiado molecularmente y se observó que la resistencia al ITC en *A. terreus* estaba relacionada con una alteración en el codón M217I de la proteína Cyp51A (118), lo que sugiere la resistencia adquirida en esas cepas particulares. Para el VRC también se han informado CIM ≥ 2 µg/mL, pero estos aislados no han sido estudiados molecularmente (71,82). En esas publicaciones no se han utilizado los PCE para realizar el análisis debido a que todavía estos puntos de corte no se habían propuesto.

Por lo tanto, contrario a lo comentado en esas publicaciones, en este trabajo no se han encontrado aislados resistentes o con sensibilidad intermedia a los azoles estudiados.

Las publicaciones acerca de la actividad de la TRB han aumentado desde que este antifúngico ha mostrado CIM bajas frente a un amplio espectro de hongos patógenos (84). Pero, dicha droga está indicada sólo en micosis superficiales, debido a que se acumula en piel, pelos, uñas y sebo (107,120). Como se comentó anteriormente, en las ciudades de Resistencia y Corrientes aumentó cinco veces la incidencia de *A. terreus*

*complex* como agente de onicomicosis, en un periodo de cuatro años (51). Debido a esto, la TRB fue incluida en este estudio.

Aunque los puntos de corte para el género *Aspergillus* frente a dicha droga no han sido establecidos por el documento M38-A2 del CLSI, esta droga mostró una potente actividad *in vitro* frente a todos los aislados de *A. terreus* estudiados, con valores de CIM más bajos que la AMB, el ITC y el VRC (CIM<sub>90</sub> 0,25 µg/mL para los aislados clínicos y CIM<sub>90</sub> 0,125 µg/mL para los ambientales) (Tabla 4, Fotografía 5). Estos datos coinciden con los valores publicados por Alastruey-Izquierdo y col. (121) y Karaarslan y col. (122), quienes estudiaron cepas de *A. terreus* aisladas de infecciones invasivas y de otomicosis, respectivamente. Estos resultados sugieren a la TRB como una buena opción en el tratamiento de infecciones superficiales por el complejo *A. terreus*, aunque sería necesario realizar mayores estudios sobre correlación *in vivo* e *in vitro*.

Al no haber datos de referencia de los rangos de CIM de TRB frente a las cepas control de calidad para evaluar a especies del género *Aspergillus*, en este estudio se obtuvieron los rangos control del procedimiento cuyos valores se presentaron en la Tabla 6. Ninguno de los trabajos donde se estudió la actividad *in vitro* de la TRB obtuvieron este rango (73,74,84,122).

La mayoría de las investigaciones realizadas muestran que, generalmente, *A. terreus* tiene resistencia *in vivo* e *in vitro* a la AMB, droga antifúngica de amplio espectro y ampliamente utilizada en infecciones fúngicas, con valores de CIM más altos (CIM  $\geq$  4 µg/mL) (69,71,75–77,83,95,123) que para *A. fumigatus* (0,5 - 1 µg/mL) (30,50). Lo mismo se observó en este trabajo, donde la AMB presentó una CIM  $\geq$  2 µg/mL para la mayoría de los aislados (Tabla 4, Fotografía 6).

A diferencia de lo observado para el VRC y el ITC donde todos los aislados se agruparon en la categoría de sensible; para la AMB los aislados se categorizaron como sensibles, resistentes y con sensibilidad intermedia (Tabla 4) en base al punto de corte mencionado en el documento de referencia M38-A2 (92). Así, el 53,85% de los aislados fueron categorizados con sensibilidad intermedia, porcentaje intermedio a lo informado en otros lugares del mundo (69,115,124); el 17,3% fueron categorizados como resistentes, similar a lo informado en otros países (69,90,124) y algo inferior a lo informado en Argentina por Córdoba y col. (125), aunque cabe aclarar que este grupo de trabajo recibe cepas de toda la Argentina.

El 28,85% (15/52) de los aislados presentaron CIM de 1 µg/mL, dicho porcentaje es muy inferior a lo hallado en Italia, Bélgica y EEUU (124), y superior a lo observado en Austria e India (74,116). Diversos autores (69,77) sugieren que hay una gran diversidad genotípica dentro del complejo *A. terreus* y que este porcentaje de aislamientos “sensibles” *in vitro* a la AMB podría deberse a ese hecho. Sin embargo, Kathuria y col. (116) obtuvieron un 8 % de aislamientos de *A. terreus* con CIM a la AMB entre 0,5 – 1 µg/mL pero no se limitaron a un patrón genotípico particular.

De acuerdo al PCE para AMB frente a *A. terreus* (109), el 96,15% (50/52) de los aislados presentaron CIM ≤ 4 µg/mL, los cuales fueron WT y sólo 2 aislados (3,85%) (*A. terreus* s.s. de origen ambiental y *A. terreus complex* de origen clínico) presentaron una CIM = 8 µg/mL, los cuales fueron no-WT (Tabla 4). Este último porcentaje es similar al obtenido en el trabajo donde se propone dicho PCE (109), aunque en esa publicación los aislamientos eran todos de origen clínico.

**Sensibilidad a los antifúngicos. Método de difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs™**

La mayoría de los estudios en los cuales se empleó la técnica de difusión en agar utilizando tabletas Neo-Sensitabs™ cargadas con antifúngicos fueron en *Candida* spp. (97,126,127). Sin embargo, son escasas las publicaciones en las que se utilizaron las tabletas en *Aspergillus* spp. y más infrecuentes aún en *A. terreus*, donde además se estudiaron pocos aislados de dicha especie (102,103,126). Hay algunos otros trabajos donde emplearon la técnica de difusión en agar para hongos filamentosos pero utilizaron discos cargados con antifúngicos, por lo cual se hace difícil a la hora de comparar resultados (100,101,128,129).

Como se observa en la Tabla 7, el VRC y la TRB mostraron la más amplia gama de diámetros del halo de inhibición, con una gran dispersión de los valores alrededor del valor medio. Además, para la TRB, los valores del diámetro de la zona de inhibición fueron mayores que para los otros antifúngicos evaluados (valor menor = 38 mm). El ITC también presentó un extenso rango de diámetros del halo de inhibición, pero la dispersión fue menor. La AMB mostró el rango más acotado de diámetros.

Después de realizar el MT, se observó que los halos de inhibición de los cuatro antifúngico estudiados estaban bien definidos y eran fácil de leer en Mueller-Hinton no suplementado como ya se ha informado previamente (102,103) y ninguno de dichos antifúngicos presentó efecto de arrastre (Fotografías 7 y 8). Si bien el documento M51-A especifica que para otras especies de *Aspergillus* diferentes a *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*, la lectura de los diámetros del halo de inhibición debe realizarse a las 48 h (96), y el documento 3.15.0 de Rosco (106) dice que la lectura para *Aspergillus* spp., en general, debe realizarse a las 24 h; en este trabajo no se observó diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en la lectura a las 24 y 48 h de los halos del VRC y del ITC frente a los aislados

estudiados de *A. terreus* y en ambas lecturas se pudo determinar fácilmente el halo, que en todos fue  $\geq 17$  mm (sensible) (Tabla 7). Sólo el aislado IMR-MF 524 identificado morfológicamente como *A. carneus* desarrolló en la placa de difusión recién a las 48 h.

Los mayores problemas se presentaron con la AMB ya que en la lectura a las 24 h el 7,84 % de los aislados mostraron halos dentro de la categoría de sensible ( $\geq 15$  mm) y el 39,22 % dentro de la categoría de sensibilidad intermedia (13-14 mm); y a las 48 h el 92,31 % de los aislados se categorizaron como resistentes ( $\leq 12$  mm) y el resto con sensibilidad intermedia (Tabla 10) (Fotografía 7 y 8).

El PCE tentativo  $\geq 15$  mm está propuesto para un PCE de CIM = 1  $\mu\text{g/mL}$  según el documento M51-A (96). En este trabajo, sólo se obtuvo una CIM = 1  $\mu\text{g/mL}$  para la AMB frente al 28,85% de los aislados, pero en un sólo aislado dicha CIM se correspondió con un halo de inhibición de 15 mm. Esto, una vez más, demuestra que los valores deben ser revisados para interpretar correctamente los datos obtenidos *in vitro*.

Para la TRB la lectura de los halos también se realizó a las 24 y 48 h y no se observó diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre los valores. En ambas lecturas se determinó de manera sencilla el halo, que en todos fue  $\geq 17$  mm (Tabla 7) (Fotografía 7 y 8).

Al no haber datos de referencia de los rangos del diámetro del halo de inhibición de las cepas control de calidad para *Aspergillus* spp. frente a la TRB, se obtuvieron rangos de los halos de inhibición a las 24 h y 48 h para *A. terreus* ATCC MYA-3633 y *C. krusei* ATCC 6258 como control del procedimiento (Tabla 9).

Si bien la TRB se utiliza principalmente para tratar infecciones superficiales, ninguna de las publicaciones donde se estudió el método de difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs<sup>TM</sup> frente a *A. terreus*, incluyeron a dicha droga para su análisis (102,103,126).



Para la cepa control de calidad *C. krusei* ATCC 6258, la lectura de los halos de inhibición de los antifúngicos probados también se realizó a las 24 y 48 h, ya que en el documento M51-A (96) los rangos control del procedimiento figuran para ambas lecturas. En el documento 3.15.0 de Rosco sólo figura la lectura a 24 h (106). Los halos obtenidos se encontraban dentro de los rangos control tanto a las 24 h como a las 48 h, pero a las 48 h los halos estaban mejor definidos y las lecturas se realizaron con mayor facilidad (Tabla 8) (Fotografía 9). El único antifúngico que presentó efecto de arrastre fue el VRC, pero de todas formas la lectura del halo se pudo realizar sin mayores problemas.

### ***Comparación del método de referencia con el método de difusión en agar***

Un estándar de referencia como el documento M38-A2 y el M51-A se desarrollan a través de un proceso de consenso para facilitar un acuerdo sobre la forma de evaluar la sensibilidad a los antifúngicos de los hongos filamentosos. Uno de los objetivos primordiales de un estándar de referencia es sentar las bases a partir de las cuales se puedan desarrollar otros métodos más asequibles, pero que aporten resultados equivalentes al estándar. En conclusión, cualquier método que proporcione resultados equivalentes al de referencia se debe considerar en conformidad y, por lo tanto, su utilización debe ser aceptada.

Son escasas las publicaciones en las que se compara el método de referencia con un método de difusión. Además, en algunos trabajos utilizan discos cargados con antifúngicos (100,101,128,129) y en otros tabletas Neo-Sensitabs™ (102,126,130), por lo que se hace difícil a la hora de comparar resultados. Por otro lado, esos trabajos que utilizaron las tabletas estudiaron pocos aislados de *A. terreus*.

**Análisis de correlación lineal**

Como recurso para ver la “covariación” entre las variables CIM de cada antifúngico frente al diámetro de los halos de inhibición de los mismos antifúngicos para los aislados de *A. terreus complex* estudiados, resultaron útiles los diagramas de dispersión. Sin embargo, dichos gráficos no arrojaron ningún patrón, por lo que no se pudo especificar ningún tipo de relación entre el MR y el MT (Gráfico 1). Por lo tanto, se considera que la correlación entre ambos métodos es nula, ambas variables son independientes entre sí. Esto resultados señalan que el modelo de correlación lineal no pudo ser utilizado para explicar la variable halo de inhibición en función de la CIM cuando se compararon ambos métodos para la AMB, el VRC, el ITC y la TRB frente a aislados de *A. terreus complex*. Lo mismo concluyen Ozkutuk y col. (130) en su trabajo.

Sin embargo, en otras publicaciones, donde también se utilizaron los diagramas de dispersión para observar la “covariación” entre las variables, calcularon el coeficiente de correlación de Pearson, el cual les dio  $\geq 0,7$  para el ITC, el VRC y la AMB, y realizaron el análisis de regresión lineal. Por lo que concluyeron que existía una relación lineal entre las variables para los tres antifúngicos. Aunque todos coincidieron en que la AMB fue la droga que menor valor de coeficiente arrojó, por lo que el nivel de correlación entre las variables fue más baja (102,103,126).

**Concordancia y discrepancias**

Escasos son los trabajos donde se evaluó la concordancia y discrepancias entre el método de difusión en agar utilizando tabletas Neo-Sensitabs™ y la microdilución en caldo para hongos filamentosos (102,103,130).

En este trabajo, la concordancia del MT con el MR del VRC y del ITC, para ambos tiempos de lectura, fue del 100%, sin ningún tipo de discrepancias, similar a lo expuesto por otros autores cuando sólo se evalúa *A. terreus* (102,103) (Tabla 10).

La baja concordancia y las discrepancias se presentaron al analizar la AMB. La lectura a las 24 h presentó mayor concordancia con el MR que la lectura a las 48 h, obteniéndose un porcentaje de concordancia de 43,14 % y 23,08 %, respectivamente. Sin embargo el MT a las 24 h presentó 1 DMM, 4 DM y 26 Dm y la lectura a las 48 h presentó 14 DM y 26 Dm, similar a lo espuesto por otros autores (102,103) (Tabla 10).

La diversidad de categorías interpretativas que se obtuvieron con la AMB por el MR no fue detectada por las tabletas, y eso se tradujo en las distintas discrepancias observadas al comparar ambos métodos.

Se ha propuesto que para que una prueba de sensibilidad sea considerada específica deben producirse menos del 5% de DMM y DM (131). Solo frente al ITC y al VRC se ha obtenido 0% de DM y DMM. Sin embargo, es importante destacar que no hubo aislados categorizados como resistentes, a estas drogas, por el MR que permitan probar si los mismos serían detectados por el MT.

El método por difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs™ es una técnica de bajo costo, rápida y simple, fácilmente aplicable a la rutina de los laboratorios clínicos para determinar la sensibilidad de aislados del complejo *A. terreus* frente al VRC y al ITC.

Sin embargo, se propone que la AMB sólo sea estudiada mediante el MR para los aislados de este complejo, sólo con el fin de conocer la epidemiología de la resistencia a dicha droga en cada región geográfica ya que los valores de la sensibilidad *in vitro* de AMB y los estudios clínicos en humanos y otros animales, sugieren que esta droga no es una opción eficaz para el tratamiento de infecciones por *A. terreus* (75,132).

Al ser, el método por difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs™, una técnica comercial, siempre se sugiere confirmar los resistentes por el MR, y en forma periódica es conveniente chequear un 5% de los aislados sensibles.

## CONCLUSIONES

- ❏ AMB mostró los valores más elevados de CIM frente a la mayoría de los aislados. Un aislado de origen ambiental y otro clínico fueron considerados no-WT. Además presentó los halos de inhibición más chicos por el método de difusión, con lo que la mayoría de los aislados fueron categorizados como “resistentes”.
- ❏ El VRC y el ITC mostraron valores bajos de CIM en el 100% de los aislados estudiados y todos fueron categorizados como sensibles, demostrando la alta actividad *in vitro* de estos antifúngicos. Por el método de difusión en agar, los mismos aislados fueron categorizados como sensibles.
- ❏ Para la TRB, todos los aislados mostraron valores bajos de CIM por el método de referencia y todos presentaron halos de inhibición mucho más amplios que 17 mm por el método de difusión.
- ❏ No se ha podido establecer una relación lineal, ni de ningún tipo, entre el método de referencia y el método de difusión en agar. El modelo de correlación lineal no pudo ser utilizado para explicar la variable halo de inhibición en función de la CIM cuando se compararon ambos métodos para la AMB, el VRC, el ITC y la TRB frente a aislados de *A. terreus complex*.
- ❏ El método de difusión en agar con tabletas Neo-Sensitabs™ presentó 100% de concordancia con el método de referencia para los azoles, VRC e ITC; sin ninguna discrepancia. Sin embargo, es importante destacar que no hubo aislados categorizados como resistentes, a estas drogas, por el método de referencia que permitan probar si los mismos serían detectados por el método de difusión.
- ❏ Las discrepancias y la baja concordancia se exhibieron al analizar la AMB. La lectura a las 24 h mostró mayor concordancia con el MR que la lectura a las 48 h, pero presentó una DMM. Por lo que se propone que la AMB sólo sea estudiada mediante el método de referencia para los aislados del complejo *A. terreus*.

## ANEXOS

### ANEXO I

#### 1) Medio RPMI-1640 tamponado con 0,165 mol/L MOPS

RPMI-1640	10,4 g
Tampón MOPS	34,53 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver en 900 ml de agua destilada las cantidades indicadas, agitando hasta su completa disolución. Ajustar el pH a  $7,0 \pm 0,1$  utilizando NaOH 1N. Añadir agua destilada hasta completar 1 L. Esterilizar el medio por filtración empleando filtros de membrana de porosidad 0,22  $\mu\text{m}$ . Mantener refrigerado 4-8 °C hasta su uso.

#### 2) Agar patata dextrosa con cloranfenicol 250 mg/L (APD/CAF)

Puré de papa instantáneo	5 g
Extracto de levadura	1 g
Sulfato de magnesio	0,5 g
Dextrosa	10 g
Agar agar	16 g
Comprimido de cloranfenicol	250 mg
Agua destilada	1000 mL

#### 3) Agar Sabouraud glucosa (ASG)

Glucosa	20 g
Peptona de carne	10 g
Agar agar	20 g
Cloranfenicol	250 mg
Agua destilada	1000 mL

**4) Agar Muller Hinton** (no suplementado)

Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45 °C- 50 °C y distribuir en las palcas de Petri hasta un nivel de 4 mm (equivalente a 25-30 mL en placas de 9 cm de diámetro). pH final: 7,2 ± 0,1.

**ANEXO II**

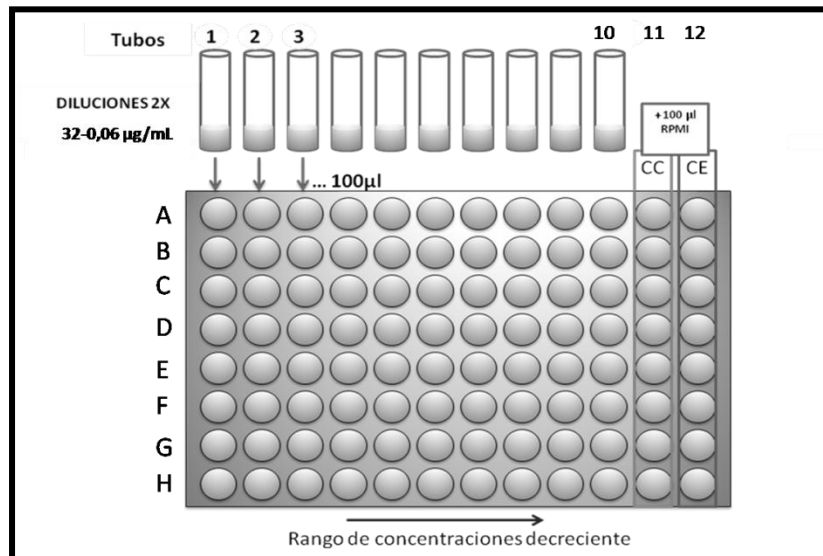
**-Esquema de preparación de las diluciones de las drogas insolubles en agua**

Tubo inicial	Concentración inicial	transferir	a un tubo con volumen de DMSO	concentración resultante (100X)	Tubo final
Nº 1	1600 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml	800 µg/ml	Nº 2
Nº 1	1600 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml	400 µg/ml	Nº 3
Nº 1	1600 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml	200 µg/ml	Nº 4
Nº 4	200 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml	100 µg/ml	Nº 5
Nº 4	200 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml	50 µg/ml	Nº 6
Nº 4	200 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml	25 µg/ml	Nº 7
Nº 7	25 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml	12,5 µg/ml	Nº 8
Nº 7	25 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml	6,25 µg/ml	Nº 9
Nº 7	25 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml	3,12 µg/ml	Nº 10

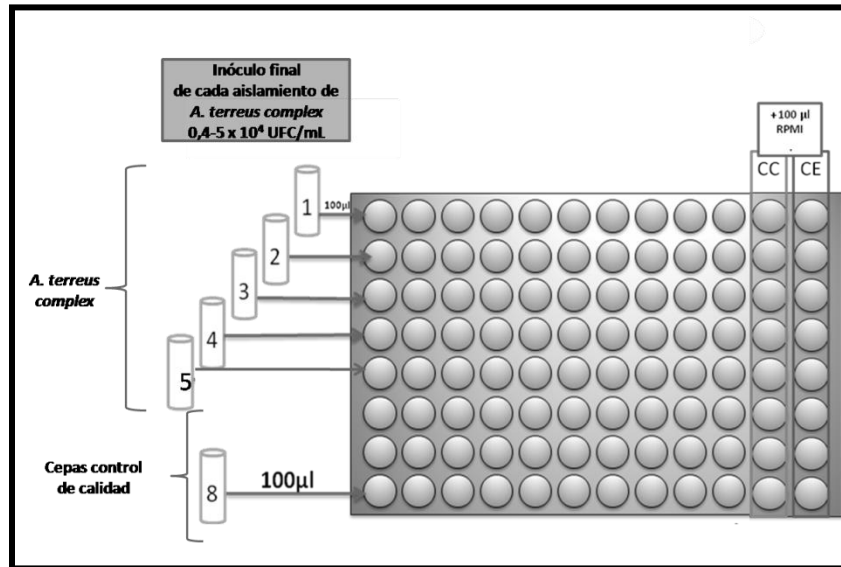
Al terminar las diluciones todos los tubos contienen 1 ml, excepto el tubo nº 10 (2 ml). De este último se desechará 1 ml.

DMSO: dimetil sulfóxido

**-Esquema de cargado de microplacas con diluciones de los antifúngicos**



CC: control de crecimiento; CE: control de esterilidad.

**-Esquema de inoculación de microplacas con los inóculos de *A. terreus complex***

CC: control de crecimiento; CE: control de esterilidad.

**-Preparación del inóculo de las levaduras utilizadas como control de procedimiento**

Las levaduras fueron repicadas en medio ASG e incubadas durante 24 h a 35 °C. Las suspensiones se prepararon tocando cinco colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro en 5 mL de solución salina estéril (0,145 mol/L). La densidad de la suspensión resultante fue ajustada a la turbidez 0,5 McF ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) con espectrofotómetro (Labsystems Multiskan Multisoft, Basingstoke, Reino Unido) a 530 nm. Esta suspensión inicial fue diluida 1:50 en solución salina estéril y posteriormente 1:20 en el medio de cultivo RPMI 1640, para obtener la concentración de células de  $1-5 \times 10^3$  UFC/mL requerida para inocular la placa de cultivo. Las lecturas de la CIM para estas cepas control se realizaron a las 48 h.



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Schoch CL, Sung G-H, López-Giráldez F, Townsend JP, Miadlikowska J, Hofstetter V, et al. The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst Biol*. 2009;58(2):224–39.
2. Kirk P, Cannon P, Minter D, Stalpers J. Dictionary of the Fungi. 10th. ed. Kirk P, Cannon P, Minter D, Stalpers J, editors. CSIRO Publishing; 2008. 640 p.
3. Ainsworth GC. Introduction to the History of Micology. Cambridge: Cambridge University Press; 1976.
4. John W. Rippon. Aspergilosis. In: Rippon JW, editor. Tratado de Micología Médica. 3era ed. México DF: Interamericana, México DF; 1990. p. 1–843.
5. Arenas R. Aspergilosis. *Micología Médica Ilustrada*. 3era edici. McGRAW-HILL INTERAMERICANA, S.A. de C.V; 2008. p. 1–425.
6. Thom C, Raper K. A manual of the Aspergilli. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.; 1945.
7. Raper K., Fennell DI. The genus *Aspergillus*. K R, D F, editors. Baltimore, U.S: The Williams & Wilkins Co.; 1965.
8. Gams W, Christensen M, Onions AH, Pitt JI, Samson RA. Infrageneric Taxa of *Aspergillus*. In: Samson RA, Pitt JI, editors. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Springer US; 1985. p. 55–62.
9. Warris A, Klaassen CHW, Meis JFGM, De Ruiter MT, De Valk HA, Abrahamsen TG, et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4101–6.
10. Kanaani H, Hargreaves M, Ristovski Z. Deposition rates of fungal spores in indoor environments, factors effecting them and comparison with non-biological aerosols. *Environment*. 2008;42(30):7141–54.
11. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(3):497–516.
12. Bush RK, Portnoy JM, Saxon A, Terr AI, Wood RA. The medical effects of mold exposure. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):326–33.
13. Bonifaz A. Aspergilosis. *Micología Médica Básica*. 4ta edició. McGRAW-HILL INTERAMERICANA, S.A. de C.V; 2012. p. 1–583.
14. Peláez T, Muñoz P, Guinea J, Valerio M, Giannella M, Klaassen CHW, et al. Outbreak of invasive aspergillosis after major heart surgery caused by spores in the air of the intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2012;54(3):24–31.
15. Jensen J, Guinea J, Torres-Narbona M, Muñoz P, Peláez T, Bouza E. Post-surgical

- invasive aspergillosis: an uncommon and under-appreciated entity. *J Infect.* 2010;60(2):162–7.
16. Anderson K, Morris G, Kennedy H, Croall J, Michie J, Richardson MD, et al. Aspergillosis in immunocompromised paediatric patients: associations with building hygiene, design, and indoor air. *Thorax.* 1996;51(3):256–61.
  17. Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Summerbell RC, Rex JH, Monson TP, et al. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. *Clin Infect Dis.* 2002;34(6):780–9.
  18. Fernández M, Cattana M, Rojas F, Sosa M de los Á, Aguirre C, Vergara M, et al. Especies de *Aspergillus* en ambientes hospitalarios con pacientes pediátricos en estado crítico. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(3):176–81.
  19. Gniadek A, Macura AB. Air-conditioning vs. presence of pathogenic fungi in hospital operating theatre environment. *Wiadomości Parazytol.* 2011;57(2):103–6.
  20. Lass-Flörl C, Rath P, Niederwieser D, Kofler G, Würzner R, Krezy A, et al. *Aspergillus terreus* infections in haematological malignancies: molecular epidemiology suggests association with in-hospital plants. *J Hosp Infect.* 2000;46(1):31–5.
  21. Hedayati MT, Mayahi S, Movahedi M, Shokohi T. Study on fungal flora of tap water as a potential reservoir of fungi in hospitals in Sari city, Iran. *J Mycol Médicale / J Med Mycol.* Elsevier Masson SAS; 2011;21(1):10–4.
  22. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Gaztelurrutia L, Navarro JI, Tudela JL. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2419–22.
  23. Alberti C, Bouakline A, Ribaud P, Lacroix C, Rousselot P, Leblanc T, et al. Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *J Hosp Infect.* 2001;48(3):198–206.
  24. Oren I, Haddad N, Finkelstein R, Rowe JM. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients during hospital construction: before and after chemoprophylaxis and institution of HEPA filters. *Am J Hematol.* 2001;66(4):257–62.
  25. Fournel I, Sautour M, Lafon I, Sixt N, L'Ollivier C, Dalle F, et al. Airborne *Aspergillus* contamination during hospital construction works: efficacy of protective measures. *Am J Infect Control.* 2010;38(3):189–94.
  26. Bouza E, Peláez T, Pérez-Molina J, Marín M, Alcalá L, Padilla B, et al. Demolition of a hospital building by controlled explosion: the impact on filamentous fungal load in internal and external air. *J Hosp Infect.* 2002;52(4):234–42.
  27. Hansen D, Blahout B, Benner D, Popp W. Environmental sampling of particulate

- matter and fungal spores during demolition of a building on a hospital area. *J Hosp Infect.* Elsevier Ltd; 2008;70(3):259–64.
28. Bennett JW. An Overview of the Genus *Aspergillus*. In: Gomi. MMK, editor. *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*. 2010. p. 1–17.
  29. Thom C, Church MB. *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus* N. Sp. and their allies. *Am J Bot.* 1918;5(2):84–104.
  30. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia.* 2014;178(5-6):427–33.
  31. Samson RA, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. New species in *Aspergillus* section Terrei. *Stud Mycol.* 2011;69(1):39–55.
  32. Balajee SA, Baddley JW, Peterson SW, Nickle D, Varga J, Boey A, et al. *Aspergillus alabamensis*, a new clinically relevant species in the section Terrei. *Eukaryot Cell.* 2009;8(5):713–22.
  33. Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hong S, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014;78:141–73.
  34. Guinea J, Sandoval-Denis M, Escribano P, Guarro J, Bouza E. *Aspergillus citrinoterreus*, a New Species of Section Terrei Isolated from Samples of Patients with Nonhematological Predisposing Conditions. *J Clin Microbiol.* 2015;53(2):611–7.
  35. Piontelli Laforet E. Morfología de los hongos comunes en ambientes internos y externos. In: Piontelli Laforet E, editor. *Manual de microhongos filamentosos comunes I*. 2015. p. 111–453.
  36. Kozakiewicz Z. *Aspergillus* species on the stored products. *Mycol Pap.* 1989;161:1–188.
  37. Bigelis R, Arora D. Organic acids of fungi. In: Arora D, Elander R, Murekji K, editors. *Handbook of applied mycology Fungal biotechnology*. New York: Marcel Dekker INC.; 1992. p. 357–76.
  38. Lowe D. Fungal enzymes. In: Arora D, Elander R, Murekji K, editors. *Handbook of applied mycology Fungal biotechnology*. New York: Marcel Dekker INC.; 1992. p. 681–706.
  39. Lopez M, Joshuat H, Harrist E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, et al. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980;77(7):3957–61.
  40. Sallam L, El-Refai A, Hamdy A, El-Minofi H, Abdel-Sallam I. Role of some fermentation parameters on cyclosporin A production by a new isolate of *Aspergillus terreus*. *J Gen Appl Microbiol.* 2003;49:321–8.

41. Garnacho-Montero J, Olaechea P, Alvarez-Ilerma F, Alvarez-Rocha L, Galván B, Rodriguez A, et al. Epidemiology , diagnosis and treatment of fungal respiratory infections in the critically ill patient. *Rev Española Quimioter*. 2013;26(2):173–88.
42. Chamilos G, Luna M, Lewis R. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica*. 2006;91(7):986–9.
43. Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol*. 2006;55:809–18.
44. Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis*. 2001;33(10):1692–6.
45. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2002;34(7):909–17.
46. Steinbach WJ. Epidemiology of invasive fungal infections in neonates and children. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(9):1321–7.
47. Klich MA. Identification of clinically relevant aspergilli. *Med Mycol*. 2006;44(s1):127–31.
48. Latge JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. 1st editio. Latge JP, Steinbach WJ, editors. Washington, DC: ASM Press; 2008. 568 p.
49. Blum G, Perkhofer S, Grif K, Mayr A, Kropshofer G, Nachbaur D, et al. A 1-year *Aspergillus terreus* surveillance study at the University Hospital of Innsbruck: molecular typing of environmental and clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(12):1146–51.
50. Torres HA., Rivero GA., Lewis RE, Hachem R, Raad II, Kontoyiannis DP. Aspergillosis caused by non-*fumigatus* *Aspergillus* species: risk factors and in vitro susceptibility compared with *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46(1):25–8.
51. Fernández MS, Rojas FD, Cattana ME, Sosa MDLÁ, Mangiaterra ML, Giusiano GE. *Aspergillus terreus* complex: an emergent opportunistic agent of Onychomycosis. *Mycoses*. 2013;56(4):477–81.
52. Moreno G, Arenas R. Other fungi causing onychomycosis. *Clin Dermatol*. Elsevier B.V.; 2010;28(2):160–3.
53. Gianni C, Romano C. Clinical and histological aspects of toenail onychomycosis caused by *Aspergillus* spp.: 34 cases treated with weekly intermittent terbinafine. *Dermatology*. 2004;209(2):104–10.
54. Mousa HA, Al-bader SM, Hassan DA. Correlation between fungi isolated from burn wounds and burn care units. *Burns*. 1999;25:145–7.

55. Ozer B, Kalaci A, Duran N, Dogramaci Y, Yanat AN. Cutaneous infection caused by *Aspergillus terreus*. J Med Microbiol. 2009;58:968–70.
56. Tak V, Mathur P, Xess I, Kale P, Sagar S, Misra MC. A case of dual infection in a paediatric trauma victim of primary cutaneous aspergillosis caused by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus*. Indian J Med Microbiol. 2013;31(2):193–6.
57. Campbell S. *Aspergillus terreus* recovered from a corneal scraping. Clin Lab Sci. 2014;27(2):67–71.
58. Tiwari S, Singh S, Jain S. Chronic bilateral suppurative otitis media caused by *Aspergillus terreus*. Mycoses. 1995;38(7-8):297–300.
59. Moinfar N, Smiddy WE, Miller D, Miller D, Herschel K. Posttraumatic *Aspergillus terreus* endophthalmitis masquerading as dispersed lens fragments. J Cataract Refract Surg. 2007;33:739–40.
60. Ng J, Ho S, Krishnan P, Teoh SC. *Aspergillus terreus* endogenous endophthalmitis in a nonimmunocompromised patient with a history of bronchiectasis. Ocul Immunol Inflamm. 2013;21(3):231–3.
61. Ahmad RAR, Hussain ST, Tan CD, Pettersson GB, Clair D, Gordon SM. Successful surgical treatment of rare *Aspergillus terreus* prosthetic valve endocarditis complicated by intracranial and mesenteric artery mycotic aneurysms. J Thorac Cardiovasc Surg. 2014;148(5):e221–3.
62. Ornvold K, Paepke J. *Aspergillus terreus* as a cause of septic olecranon bursitis. Am J Clin Pathol. 1992;97:114–6.
63. Seligsohn R, Rippon J, Lerner S. *Aspergillus terreus* osteomyelitis. Arch Intern Med. 1977;137:918–20.
64. Glotsbach R. *Aspergillus terreus* infection of pseudoaneurysm of aortofemoral vascular graft with contiguous vertebral osteomyelitis. Am J Clin Pathol. 1982;77:224–7.
65. Iwen PC, Rupp ME, Langnas AN, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature. Clin Infect Dis. 1998;26(5):1092–7.
66. Hachem R, Gomes MZR, El Helou G, El Zakhem A, Kassis C, Ramos E, et al. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus terreus*: an emerging opportunistic infection with poor outcome independent of azole therapy. J Antimicrob Chemother. 2014;69:3148–55.
67. Walter J, Sobottka I, Rogiers X, Broering D, Fischer L. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus terreus* in a living donor liver transplant recipient successfully treated by caspofungin. Mycoses. 2011;54(4):220–2.
68. Flynn PM, Williams BG, Hetherington SV, Williams BF, Giannini MA, Pearson TA. *Aspergillus terreus* during hospital renovation. Infect Control Hosp Epidemiol.

- 1993;14:363–5.
69. Baddley JW, Pappas PG, Smith AC, Moser SA. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a University Hospital. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5525–9.
  70. Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan SP, Meier-Kriesche HU, et al. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J Infect. Elsevier Ltd;* 2012;65(5):453–64.
  71. Meletiadis J, Antachopoulos C, Stergiopoulou T, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. Differential fungicidal activities of amphotericin B and voriconazole against *Aspergillus* species determined by microbroth methodology. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3329–37.
  72. Blum G, Perkhofer S, Haas H, Schrettl M, Würzner R, Dierich MP, et al. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1553–5.
  73. Moore CB, Walls CM. In vitro activities of terbinafine against *Aspergillus* species in comparison with those of itraconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(6):1882–5.
  74. Lass-Flörl C, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Perkhofer S, Rodriguez-Tudela JL. In vitro activities of various antifungal drugs against *Aspergillus terreus*: Global assessment using the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):794–5.
  75. Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R, Field-Ridley A, Sutton D, Ghannoum M, et al. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J Infect Dis.* 2003;188(2):305–19.
  76. Steinbach WJ, Benjamin DK, Kontoyiannis DP, Perfect JR, Lutsar I, Marr KA, et al. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin Infect Dis.* 2004;39(2):192–8.
  77. Lass-Flörl C, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, et al. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br J Haematol.* 2005;131(2):201–7.
  78. Herbrecht R, Denning D, Patterson T, Bennett J, Greene R, Oestmann J-W, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* 2002;347(6):408–15.
  79. Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ, Lazarus HM, Petersen F, Raffalli J, et al. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Engl J Med.* 2002;346(4):225–34.



80. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008;46:327–60.
81. Misra R, Malik A, Singhal S. Comparison of the activities of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical and environmental isolates of *Aspergillus* species. *Indian J Pathol Microbiol*. 2011;54(1):112–6.
82. Espinel-Ingroff A. In Vitro Fungicidal Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B against Opportunistic Moniliaceous and Dematiaceous Fungi. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):954–8.
83. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of Caspofungin, Itraconazole, Posaconazole, Ravuconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against 448 Recent Clinical Isolates of Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3623–6.
84. Garcia-Effron G, Gomez-Lopez A, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. In vitro activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53(6):1086–9.
85. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. Environmental Study of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* and Other Aspergilli in Austria , Denmark , and Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4545–9.
86. Snelders E, Huis In 't Veld RA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(12):4053–7.
87. Verweij PE, Snelders E, Kema GHJ, Mellado E, Melchers WJG. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis*. Elsevier Ltd; 2009;9(12):789–95.
88. Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Varga J, Denning DW. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4802–9.
89. Pfaller MA, Duncanson F, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. In vitro activity of a novel broad-spectrum antifungal, E1210, tested against *Aspergillus* spp. determined by CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):5155–8.
90. Gomez-Lopez A, Garcia-Effron G, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. In Vitro Activities of Three Licensed Antifungal Agents against Spanish Clinical Isolates of *Aspergillus* spp . *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(10):3085–8.
91. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, et al.

- Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. J Clin Microbiol. 2011;49(6):2243–51.
92. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard — Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
  93. Arendrup MC, Guinea J, Cuenca-Estrella M, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, et al. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. 2015.
  94. Espinel-Ingroff A. Germinated and nongerminated conidial suspensions for testing of susceptibilities of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, and voriconazole. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(2):605–7.
  95. 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. J Clin Microbiol. 2009;47(10):3271–5.
  96. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. CLSI document M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
  97. Arendrup M, Lundgren B, Jensen IM, Hansen BS, Frimodt-Møller N. Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. J Antimicrob Chemother. 2001;47(5):521–6.
  98. Danielle Swinne, Raes-Wuytack, Van Looveren D. Comparative evaluation of Fungitest®, Neo-Sensitabs® and M27T-NCCLS broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. Mycoses. 1999;42(4):231–7.
  99. Messer SA, Diekema DJ, Hollis RJ, Boyken LB, Tendolkar S, Kroeger J, et al. Evaluation of disk diffusion and Etest compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of posaconazole against clinical isolates of filamentous fungi. J Clin Microbiol. 2007;45(4):1322–4.
  100. Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, Pfaller M, Messer S, et al. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. J Clin Microbiol. 2007;45(6):1811–20.
  101. Serrano MC, Ramírez M, Morilla D, Valverde A, Chávez M, Espinel-Ingroff A, et al. A comparative study of the disc diffusion method with the broth microdilution and Etest methods for voriconazole susceptibility testing of *Aspergillus* spp. J Antimicrob



- Chemother. 2004;53(5):739–42.
102. Espinel-Ingroff A, Canton E. Comparison of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay with CLSI broth microdilution M38-A and disk diffusion methods for testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2008;46(5):1793–803.
  103. Colosi IA, Faure O, Dessaigne B, Bourdon C, Lebeau B, Colosi HA, et al. Susceptibility of 100 filamentous fungi: comparison of two diffusion methods, Neo-Sensitabs and E-test, for amphotericin B, caspofungin, itraconazole, voriconazole and posaconazole. *Med Mycol.* 2012;50(4):378–85.
  104. Hoog G, Guarro J, Gené J FM. Atlas of Clinical Fungi. 2nd editio. Centraalbureau voor Schimmelcultures. The Netherlands; 2000.
  105. Klich M PJ. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, N.S.W: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Food Processing; 1988.
  106. User's Guide Neo-Sensitabs™ Susceptibility testing [Internet]. 11th Ed. Rosco Diagnostica A/S.; 2013.
  107. Allevato MAJ, Negróni R, Galimberti R. ANTIFÚNGICOS. Ayer, hoy y mañana. Actual Ter DERMATOLOGICAS. 2007;30:8–19.
  108. Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the Triazoles and Six *Aspergillus* spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document). *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3251–7.
  109. Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Johnson E, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5150–4.
  110. Dalhoff A, Ambrose PG, Mouton JW. A long journey from minimum inhibitory concentration testing to clinically predictive breakpoints: Deterministic and probabilistic approaches in deriving breakpoints. *Infection.* 2009;37(4):296–305.
  111. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(5):418–25.
  112. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; Approved Standard — Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
  113. CLSI. Performance Standards for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; International Supplement (M51-SI) (Approved). 2010.

114. Fernández MS, Rojas FD, Cattana ME, De Sosa MLÁ, Iovannitti CA, Lass-Flörl C, et al. In vitro activities of amphotericin B, terbinafine, and azole drugs against clinical and environmental isolates of *Aspergillus terreus sensu stricto*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3619–22.
115. Sutton D, Sanche S, Revankar S, Fothergill A, Rinaldi M. In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J Clin Microbiol*. 1999;37(7):2343–5.
116. Kathuria S, Sharma C, Singh PK, Agarwal P, Agarwal K, Hagen F, et al. Molecular Epidemiology and In-Vitro Antifungal Susceptibility of *Aspergillus terreus* Species Complex Isolates in Delhi, India: Evidence of Genetic Diversity by Amplified Fragment Length Polymorphism and Microsatellite Typing. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0118997.
117. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, et al. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):624–9.
118. Arendrup MC, Jensen RH, Grif K, Skov M, Pressler T, Johansen HK, et al. In vivo emergence of *Aspergillus terreus* with reduced azole susceptibility and a Cyp51a M217I alteration. *J Infect Dis*. 2012;206(6):981–5.
119. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: Application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic. *J Clin Microbiol*. 2013;51(8):2571–81.
120. Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):415–29.
121. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(7):3380–7.
122. Karaarslan A, Arikan S, Ozcan M, Ozcan KM. In vitro activity of terbinafine and itraconazole against *Aspergillus* species isolated from otomycosis. *Mycoses*. 2004;47:284–7.
123. Blum G, Hörtnagl C, Jukic E, Erbeznik T, Pümpel T, Dietrich H, et al. New insight into amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1583–8.
124. Tortorano A, Prigitano A, Dho G, Biraghi E, Stevens D, Ghannoum M, et al. In vitro activity of amphotericin B against *Aspergillus terreus* isolates from different countries and regions. *J Chemother*. 2008;20(6):756–7.
125. Córdoba S, Vivot W, Isla G, Abrantes R, Szusz W, Davel G. *Revista Argentina de*

- Microbiología. P 201-28024 Potencia in vitro de equinocandinas versus siete antifúngicos en aislamientos clínicos de *Aspergillus* spp. 2010.
126. Espinel-Ingroff A. Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing zygomycetes, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and amphotericin B. J Clin Microbiol. 2006;44(10):3616–22.
  127. Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, Wang A. Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, cas. J Clin Microbiol. 2007;45(3):858–64.
  128. Gupta P, Khare V, Kumar D, Ahmad A, Banerjee G, Singh M. Comparative Evaluation of Disc Diffusion and E-test with Broth Micro-dilution in Susceptibility testing of Amphotericin B , Voriconazole and Caspofungin against Clinical *Aspergillus* isolates. J Clin Diagnostic Res. 2015;9(1):2013–6.
  129. Tokarzewski S, Ziółkowska G, Nowakiewicz A. Susceptibility testing of *Aspergillus niger* strains isolated from poultry to antifungal drugs--a comparative study of the disk diffusion, broth microdilution (M 38-A) and Etest methods. Pol J Vet Sci. 2012;15(1):125–33.
  130. Ozkutuk A, Ergon C, Metin DY, Yucesoy M, Polat SH. Comparison of disk diffusion, E-test and broth microdilution test in determination of susceptibility of *Aspergillus* species to amphotericin B, itraconazole and voriconazole. J Chemother. 2008;20(1):87–92.
  131. Jorgensen JH. Selection Criteria for an Antimicrobial Susceptibility Testing System. J Clin Microbiol. 1993;31(11):2841–4.
  132. Steinbach WJ, Perfect JR, Schell WA, Walsh TJ, Benjamin DK. In Vitro Analyses , Animal Models , and 60 Clinical Cases of Invasive *Aspergillus terreus* Infection. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(9):3217–25.
  133. Summerbell RC, Cooper E, Bunn U, Jamieson F, Gupta AK. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. Med Mycol. 2005;43(1):39–59.