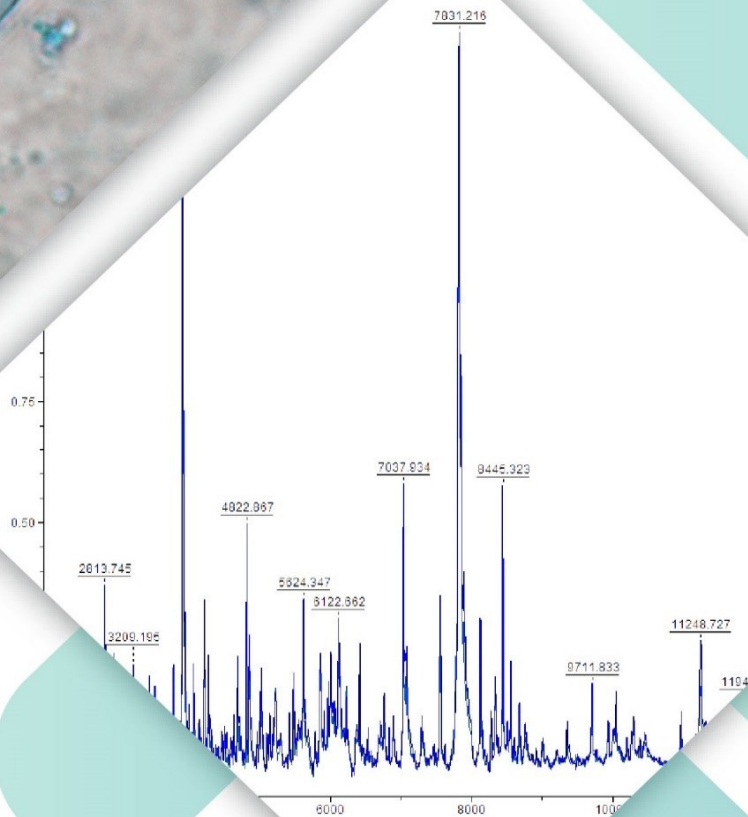


**IDENTIFICACIÓN  
FENOTÍPICA POR  
ESPECTROMETRÍA  
DE MASAS MALDI-TOF Y  
SECUENCIACIÓN DE HONGOS  
FILAMENTOSOS QUE CAUSAN  
ONICOMICOSIS O DERMATOFITOSIS  
RECOLECTADOS EN UN  
LABORATORIO CLÍNICO  
DE LA CIUDAD DE  
MEDELLÍN,  
COLOMBIA**





UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DEL NORDESTE



FACULTAD  
DE MEDICINA

Universidad Nacional  
del Nordeste

Universidad Nacional del Nordeste  
Facultad de Medicina  
Departamento de Microbiología y Parasitología

## **Maestría en Micología Médica**

**Identificación fenotípica, por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación de hongos filamentosos que causan onicomycosis o dermatofitosis recolectados en un laboratorio clínico de la ciudad Medellín, Colombia**

### **Maestreado**

**Juan Carlos Gómez Velásquez**

Directora

Ana Cecilia Mesa Arango

Codirectora

Ivanna Maldonado

Buenos Aires, Argentina 2019

## **DEDICATORIA**

Este trabajo es un reconocimiento a la familia Merino Aristizábal, a ese legado laboral lleno de valores; sea este un pequeño homenaje a esas personas que han acompañado mi crecimiento laboral y personal de quienes guardo gratos recuerdos que permanecerán por siempre en mi corazón.

## AGRADECIMIENTOS

Esta es la culminación de una aventura que Inició en Buenos Aires, Argentina, una ciudad encantadora, con personas, que ahora hacen parte de mi vida y de quienes aprendí que la vida es maravillosa. Dr. Ricardo Negroni, Dr. Gustavo Guisiano, Alicia Arechavala, Fernando Messina, Gabriela Santiso. Además de los compañeros que hacen parte del laboratorio de micología del Hospital Muñiz. Todos ellos hoy son parte de mi familia, a todos, mis más grandes agradecimientos.

El propósito que mi madre se había propuesto para su vida había sido criar a su hijo de la mejor manera que las fuerzas le permitieran, y lo había logrado, había estado dispuesta a pagar el precio que fuese necesario. Gracias madre, padre y hermanos.

También quiero agradecer a mi jefa Natalia Loiza, sin su apoyo no se hubiera podido materializar este sueño. Mi gran admiración a mi asesora Ana Cecilia Mesa. Un gran ser humano y excelente profesional de quien he aprendido valores como la tenacidad, la exigencia y la calidad. Gracias por estar en mi camino.

Quiero exaltar la labor de todos mis compañeros de trabajo, y todos aquellos que estuvieron presente durante toda o la mayor parte del desarrollo de esta tesis.

No ha sido sencillo el camino hasta ahora pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, la dificultad para lograr esta meta, se ha hecho menos ardua; les entrego mi gran afecto a ustedes.

Este es un momento muy especial que espero permanezca en el tiempo, no solo en la mente de las personas mencionadas líneas arriba, sino también en aquellas que

dedicaron parte de su tiempo, para dar una mirada a este trabajo. A ellos les agradezco con todo mí ser.

Gracias a todas las personas que creyeron en mí.

## Contenido

<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>0</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
1.1 Dermatofitosis.....	7
1.2 Onicomicosis.....	8
1.3. Identificación de hongos filamentosos.....	10

1.3.1. Técnicas convencionales.....	10
1.3.2. Técnicas moleculares basadas en la detección de ADN fúngico.....	11
1.3.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Objetivo general.....	19
4.2. Objetivo específico.....	19
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>20</b>
5.1. Cepas y aislamientos fúngicos.....	20
5.2. Definición de los tiempos de crecimiento de las diferentes cepas.....	21
5.3. Obtención de proteínas a partir de los micelios para la creación de los espectros de referencia.....	21
5.4. Creación de los espectros de referencia.....	22
5.4. Validación de los espectros de referencia.....	25
5.5. Aislamientos clínicos e identificación.....	27
5.6. Identificación por métodos fenotípicos convencionales.....	27
5.7. Identificación molecular.....	27
5.7.1. Obtención de la biomasa para la extracción del DNA.....	27
5.7.2. Extracción del ADN.....	28
5.7.3. Amplificación de las dianas por PCR.....	30

5.7.4. Secuenciación y análisis.....	30
5.8. Identificación por EM MALDI-TOF.....	31
5.9. Análisis de estadístico.....	31
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
6.1. Definición de los tiempos de crecimiento de las diferentes cepas para la obtención de proteínas.....	33
6.2. Creación de los espectros de referencia.....	34
6.2.1 Validación de los espectros de referencia.....	37
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y aislamientos de hongos filamentosos utilizadas para la creación de los espectros de referencia <i>in house</i> .....	20
Tabla 2. Cepas y aislamientos clínicos usados para la validación de los espectros de referencia construidos <i>in house</i> .....	26
Tabla 3. Categorías de acuerdo a los valores del coeficiente <i>kappa</i> de cohen.....	31
Tabla 4. Tiempo de crecimiento de los diferentes géneros o especies fúngicas para la obtención de proteínas y generación de los espectros de referencia.....	33

Tabla 5. Rangos de los puntajes obtenidos de cuatro lecturas de los extractos de proteínas de cada una de las 21 cepas o aislamientos al retar los espectros de referencia .....	37
Tabla 6. Resultados de la validación de la biblioteca construida <i>in house</i> y por la comercial para hongos filamentosos.....	39
Tabla 7. Identificación de aislamientos clínicos por métodos fenotípicos clásicos, secuenciación y por EM MALDI-TOF usando dos bibliotecas de espectros.....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del principio de la EM MALDI-TOF.....	13
Figura 2. Procedimientos para la obtención de las proteínas a partir de los micelios.....	22
Figura 3. Esquema de la obtención y distribución de los extractos proteico para la construcción de los espectros de referencia.....	23
Figura 4. ESQUEMA DE LA GENERACIÓN DE LOS ESPECTROS DE REFERENCIA PARA CADA CEPA O AISLAMIENTO.....	23
Figura 5. Procedimiento general para la obtención de la biomasa fúngica.....	28
Figura 6. Procedimiento para la extracción de ADN.....	29
Figura 7. Espectro de referencia de la cepa <i>F. proliferatum</i> MUM 16.144.....	34



Figura 8. Masa y frecuencia de 25 de las 70 proteínas del espectro de referencia de *F. proliferatum* MUM 16.144.....35

Figura 9. Identificación y puntaje de las 32 muestras del extracto proteico de los cuatro cultivos de *F. proliferatum* MUM 16.144 (#1, #2, #3 y #4).....36

## ABREVIATURAS

### A

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AI:** aspergilosis invasiva

**ARN:** ácido ribonucleico

### B

**BHI:** infusión, cerebro corazón (Brain heart  
Infusión)

## C

**°C:** grados centígrados

**CNSG:** centro nacional de secuenciación genómica

**CM:** colección de hongos miceliales, Instituto de Salud Carlos III

## E

**EM:** espectrometría de masas.

## G

**g:** gravedades

**GRID:** Grupo de Investigación Dermatológica

## H

**HFND:** hongos filamentosos no dermatofitos

**h:** horas

## I

**IBM:** International Business Machines

***In house:*** biblioteca propia

**ITS:** secuencias espaciadoras internas (Internal Transcribed Spacer)

## K

**kDa**: kilodaltons

**(κ)** : kappa

## M

**MALDI-TOF**: Desorción/ionización laser asistida por una matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight)

**min**: minutos

**MDM**: medios de cultivos Medellín

**MLEE**: electroforesis enzimática multilocus (Multilocus Enzyme Electrophoresis)

**MM**: colección Universidad Nacional Autónoma de México

**mm**: milímetros

**MSPs**: espectro de masas principal

**MUM**: micoteca Universidad de Minho

## M

**m/z**: relación masa carga

## N

**Nm**: nanómetros

## P

**PCR**: reacción en cadena de la polimerasa

**PDA**: papa dextrosa agar.

## R

**®**: Marca registrada

**RAPD-PCR:** amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplificación of Polymorphic DNA)

**RFLP:** polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)

**RNAsa:** ribonucleasas

## S

**SPSS:** paquete estadístico para ciencias sociales (Statistical Package for the Social Sciences)

## U

U de A: Universidad de Antioquia.

**μL:** microlitro

**UNAM:** Universidad Autónoma de México

## V

**VHI:** virus de inmunodeficiencia humana

## Y

**YM:** agar malta–Levadura (Yeast-Malt.Agar)

## RESUMEN

La incidencia de las infecciones fúngicas se ha incrementado significativamente en las últimas décadas, actualmente estas representan un importante problema de salud para los humanos. Entre algunos de los factores que contribuyen a su aumento se pueden enunciar; los tratamientos inmunosupresores, las infecciones invasivas o diseminadas, los pacientes trasplantados de órganos, y la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las infecciones fúngicas pueden tener varias presentaciones, unas de las más comunes son las superficiales (piel y mucosas) seguidas de las invasivas o diseminadas como la candidemia o la aspergilosis, siendo estas últimas las más graves por el impacto en la morbilidad y mortalidad a pesar de la disponibilidad de antifúngicos con diferente espectro de actividad.

La identificación correcta y oportuna de los agentes causales es importante desde el punto de vista epidemiológico y terapéutico. Los métodos fenotípicos usados para la identificación de los agentes causales de las micosis aún no son suficientes para realizar una identificación, además suelen tomar tiempo, ser laboriosas y requerir profesionales altamente entrenados.

Las técnicas moleculares basadas en la detección de ácidos nucleicos, son actualmente el estándar de oro para la identificación de hongos, partir de muestras clínicas de cultivos. Sin embargo, estas técnicas son costosas para un laboratorio de diagnóstico micológico de rutina en países en vías de desarrollo.

La espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF es una técnica utilizada actualmente con éxito en la identificación de bacterias y levaduras, sin embargo, el uso con hongos filamentosos tiene limitaciones por aspectos, como la falta de cobertura de la bases de espectros de referencia para la identificación de algunos géneros y especies,

principalmente de hongos endémicos en regiones tropicales. Además, la extracción de proteínas es más laborioso y difícil si se compara con el de las levaduras.

La creación de bases de espectros *in house* de hongos endémicos y de diferentes especies crípticas, amplía la posibilidad de identificar más microorganismos correctamente.

En este trabajo se construyeron 21 espectros de referencia con hongos de los géneros: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix* y *Neoscytalidium*. Siguiendo los criterios recomendados por la casa comercial (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Además, se estandarizaron los tiempos mínimos de crecimiento fúngico que permitieran una correcta identificación de las diferentes especies. Los espectros de referencia se validaron con cepas o aislados clínicos, previamente identificados por secuenciación. Finalmente se evaluó la capacidad de los espectros creados para identificar 52 aislados clínicos obtenidos de pacientes que acudieron a un laboratorio clínico de la ciudad de Medellín para la confirmación microbiológica de onicomycosis o dermatofitosis. Los aislados clínicos también fueron identificados por la librería comercial (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Los tiempos de crecimiento variaron entre las especies siendo el máximo tiempo (96 h) para *Microsporum canis* y complejo *Trichophyton rubrum*, el mínimo (36 h) para *Sporothrix* spp. La identificación hasta especie de los aislados clínicos con la biblioteca construida *in house* fue del 88,4 % mientras que con la comercial fue del 37,0 %. Uno de los resultados más relevantes fue la identificación de las especies del complejo *Sporothrix schenckii* (*S. globosa* y *S. schenckii* sensu stricto) y del complejo *Sporothrix pallida* (*S. mexicana*) a partir de la forma micelial de 36 h de crecimiento.

Con las especies del grupo de los dermatofitos se presentaron dificultades tanto en la validación del espectro de referencia de *Nannizzia gypsea* como en la identificación de aislados de la especie *T. interdigitale*.

El análisis de la concordancia entre la identificación por secuenciación y la obtenida por ambas bibliotecas mostró que fue mayor con la biblioteca construida *in house* ( $\kappa=0,826$ ) que con la comercial ( $\kappa=0,273$ ).

Los resultados de este trabajo muestran que EM MALDI-TOF, es una metodología que se debe considerar como alternativa al método fenotípico clásico para la identificación de hongos filamentosos en un laboratorio de diagnóstico micológico de rutina, por la reducción en el tiempo y el costo del procedimiento, que se ve reflejado en la disminución de la estancia hospitalaria, morbilidad y mortalidad.

## SUMMARY

The incidence of fungal infections has increased significantly in recent decades, these currently represent a major health problem for humans. Among some of the factors that contribute to its increase can be stated; immunosuppressive treatments, invasive or disseminated infections, organ transplant patients, and infections with the human immunodeficiency virus (HIV). Fungal infections may have several presentations, one of the most common being superficial (skin and mucous), followed by invasive or disseminated such as candidemia or aspergillosis, the latter being the most serious due to the impact on morbidity and mortality at despite the availability of antifungals with different spectrum of activity.

The correct and timely identification of the causative agents is important from the epidemiological and therapeutic point of view. The phenotypic methods used for the identification of the causative agents of mycoses are not yet sufficient to perform an identification, in addition they usually take time, are laborious and require highly trained professionals.

Molecular techniques based on the detection of nucleic acids are currently the gold standard for the identification of fungi, based on clinical samples of cultures. However, these techniques are expensive for a routine mycological diagnostic laboratory in developing countries.

MALDI-TOF mass spectrometry (EM) is a technique currently used successfully in the identification of bacteria and yeasts, however, the use with filamentous fungi has limitations by aspects, such as the lack of coverage of the reference spectrum bases for the identification of some genera and species, mainly of endemic fungi in tropical



regions. In addition, protein extraction is more laborious and difficult compared to that of yeasts.

The creation of in-house spectra bases of endemic fungi and of different cryptic species, broadens the possibility of identifying more microorganisms correctly.

In this work, 21 reference spectra were constructed with fungi of the genera: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix* and *Neoscytalidium* following the criteria recommended by the commercial house (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). In addition, the minimum fungal growth times that allowed a correct identification of the different species were standardized. The reference spectra were validated with clinical strains or isolates, previously identified by sequencing. Finally, the ability of the spectra created to identify 52 clinical isolates obtained from patients who went to a clinical laboratory in the city of Medellin for microbiological confirmation of onychomycosis or dermatophytosis was evaluated. The clinical isolates were also identified by the commercial library, (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

The growth times varied between the species being the maximum time (96 h) for *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* complex the minimum for *Sporothrix* spp (36 h). The identification up to species of the clinical isolates with the library built in house was 88.4% while for the commercial one it was 37.0%. One of the most relevant results was the identification of the species of the *Sporothrix schenckii* complex (*S. globosa* and *S. schenckii* s.st) and of the *Sporothrix pallida* complex (*S. mexicana*) from the mycelial form of 36 h of growth.

Difficulties were encountered with the species of the dermatophyte group both in the validation of the reference spectrum of *Nannizzia gypseum* and in the identification of isolates of the *T. interdigitale* species.

The analysis of the agreement between the identification by sequencing and that obtained by both libraries showed that it was greater with the library built in house ( $\kappa = 0.826$ ) than with the library ( $\kappa = 0.273$ ).

The results of this work show that EM MALDI-TOF is a methodology that should be considered as an alternative to the classic phenotypic method for the identification of filamentous fungi in a routine mycological diagnostic laboratory, due to the reduction in time and cost of procedure, which is reflected in the decrease in hospital stay morbidity and mortality.

The results of this work show that EM MALDI-TOF is a methodology that should be considered as an alternative to the classic phenotypic method for the identification of filamentous fungi in a routine mycological diagnostic laboratory, due to the reduction in time and cost of procedure, which is reflected in the decrease in hospital time, morbidity and mortality.

## 1. INTRODUCCIÓN

La incidencia de las infecciones fúngicas se ha incrementado significativamente en las últimas décadas, actualmente representan un importante problema de salud para los humanos. Este aumento en particular de las infecciones invasivas o diseminadas, se ha producido principalmente por el creciente número de pacientes sometidos a tratamientos con inmunosupresores: como los trasplantados de órganos, los pacientes que reciben quimio o radioterapia, los neutropénicos, los sometidos a cirugías graves (principalmente abdominal) o inmunocomprometidos como consecuencia de la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Otros factores como el uso de antibióticos de amplio espectro, la hospitalización prolongada, la nutrición parenteral, la edad avanzada y la diabetes, también hacen vulnerables a los pacientes, contribuyendo al incremento de los casos de infecciones fúngicas (1-5).

La presentación clínica de las infecciones fúngicas puede variar desde formas superficiales (piel y mucosas) a invasivas o diseminadas como la candidemia o la aspergilosis invasora (AI). Las dos últimas infecciones están asociadas a altas tasas de morbilidad y mortalidad, a pesar de la disponibilidad de antifúngicos con diferente espectro de actividad (6-10).

Aunque las especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* continúan siendo las más importantes por el tipo de personas que afectan, por la gravedad de las infecciones que causan y por el difícil manejo terapéutico, otras especies emergentes han ido ganando importancia, en parte, por la baja sensibilidad o resistencia de algunas de ellas a los principales antifúngicos de uso clínico como es el caso de

hongos filamentosos de los géneros *Fusarium*, *Lomentospora*, *Trichosporon*, *Neoscytalidium* y especies de hongos dematiáceos (11-15).

Las infecciones en piel y anexos causadas por diferentes grupos de hongos con predominio de los dermatofitos (dermatofitosis) son las micosis más frecuentes a nivel mundial. Se calcula que entre el 20 - 25 % de la población mundial es afectada por estas micosis (16), si bien estas, no representan una causa importante de mortalidad, son motivo de consulta médica constante, principalmente en países tropicales por el impacto que pueden tener en la calidad de vida (17, 18).

El examen directo y el cultivo, a pesar de las limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad, continúan siendo la base del diagnóstico de las infecciones fúngicas (19, 20). Sin embargo, el aislamiento oportuno y la correcta identificación del agente causal es importante para la decisión de una terapia acertada y oportuna. Otras técnicas como la detección de anticuerpos, antígenos o técnicas moleculares dirigidas a la detección de ácidos nucleicos fúngicos, son complementarias en el diagnóstico de algunas infecciones fúngicas (21).

### **1.1 Dermatofitosis**

Las dermatofitosis son infecciones causadas por un grupo de hongos denominados dermatofitos. Estos hongos tienen afinidad por estructuras queratinizadas como la piel, el pelo y las uñas; causando lesiones con diversas características clínicas.

Dentro del grupo se distinguen los complejos: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Nanizzia*, *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Paraphyton*, y *Epidermophyton*. Las especies más prevalentes como causa de infección son complejo *T. rubrum*, *T. interdigitale* (antes denominado *T. mentagrophytes*), *M. canis* y *E. floccosum*. Aunque muchas especies de dermatofitos tienen distribución mundial, otras están confinadas a determinadas regiones como el caso de *T. schoenleinii* (Asia y África), *T. soudanense* (África), *T.*

*violaceum* (África, Asia y Europa), *T. concentricum* (Islas del Pacífico y lejano oriente e India) y *M. audouinii* (África) (16, 22).

La epidemiología de la dermatofitosis ha sufrido cambios asociados a modificaciones en el patrón de migración poblacional, al aumento de la movilidad de turistas entre los continentes, al mayor número de personas que practican deporte, lo que se vincula al uso de zapatos oclusivos y la humedad. Además, los cambios en las condiciones socioeconómicas, climáticas y en el estilo de vida han contribuido al cambio en la distribución geográfica de las dermatofitosis (16, 23).

En Colombia diferentes trabajos muestran que los dermatofitos más frecuentes en infecciones de la piel y de las uñas son complejo *T. mentagrophytes* (*T. interdigitale*), *E. floccosum* y complejo *T. rubrum* (18, 24-26).

## **1.2 Onicomycosis**

El término onicomycosis se deriva de las palabras griegas *onychos* (que significa uña) y *micosis* (que significa infección por hongos). La nomenclatura de las infecciones por hongos propuesta por la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal sugiere que el término onicomycosis debe reemplazarse: por tiña ungueal, cuando el agente etiológico es un dermatofito; por onyxis, cuando las levaduras son la causa; por candidiasis ungueal, cuando el agente es candida; y por micosis ungueal si el agente causal es un molde oportunista (27).

La onicomycosis es la enfermedad más común de las uñas y corresponde a más del 50 % de las onicopatías; aunque esta no amenaza la vida si puede generar alteración en la calidad de vida de los paciente (28). Su prevalencia es variable ya que depende de factores culturales y socioeconómicos (29, 30). En la última década la frecuencia ha aumentado como consecuencia de la práctica generalizada del deporte, la exposición a ambientes húmedos (piscina, baños turcos, spas) y al uso de calzado cerrado (31).

La infección puede afectar la placa ungueal de una o varias uñas y producir cambio de color, hiperqueratosis y/o cambio en la textura (29, 32). En la población inmunodeficiente la alteración de la estructura de la uña, es más notoria y puede ser la puerta de entrada para una infección sistémica (33-35).

Los agentes etiológicos más importantes en esta enfermedad son los dermatofitos complejo *T. rubrum*, y *T. interdigitale*, también puede ser causada por levaduras, principalmente del género *Cándida*, siendo las especies *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis* las más frecuentes (36-38). Los hongos filamentosos no dermatofitos (HFND) como especies de los géneros *Neoscytalidium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis* y *Penicillium*, cada vez están más implicados en la etiología de esta infección (39-41).

Es de particular importancia el incremento en regiones tropicales de los casos de infecciones en tejidos queratinizados (uñas y piel) por el hongo ambiental *Neoscytalidium dimidiatum*, cuya manifestación clínica es indistinguible de las dermatofitosis (42). Además, se han reportado casos de infecciones, subcutáneas y profundas, principalmente en pacientes inmunocomprometidos (43). Estos hongos son resistentes a los antifúngicos sistémicos utilizados en la práctica clínica por lo que la falla terapéutica es inevitable (44, 45). Otras especies de HFND menos frecuentes pero no menos importantes dentro de la lista de agentes de onicomycosis son las del género *Fusarium* (46, 47). Aproximadamente 70 especies de *Fusarium* infectan animales y humanos, pero los aislados más frecuentes a partir de muestras clínicas son: *F. falciforme*, *F. keratoplasticum* (complejo *F. solani*) y *F. oxysporum* (complejo *F. oxysporum*). En general las especies de este género son poco sensibles o multirresistentes a los antifúngicos, lo que se refleja en la baja respuesta a los tratamientos (47-49).

A pesar que los *Aspergillus* spp tienen un papel importante en la etiología de infecciones invasivas y diseminadas, cada vez se conocen más casos de onicomycosis

causadas por diferentes especies del género como: *A. flavus* (sección Flavi), *A. niger* y *A. tubingensis* (sección Nigri), *A. terreus* (sección Terrei) y *A. fumigatus* (sección Fumigati) (50-53).

En Colombia no existen estudios poblacionales sobre la incidencia o prevalencia de la dermatofitosis o de la onicomicosis y de sus agentes etiologicos. Sin embargo, los datos publicados permiten identificar que los hongos más aislados de pacientes con estas micosis son los dermatofitos complejo *T. rubrum* y *T. interdigitale*, las levaduras del complejo *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* y los HFND *N. dimidiatum* y *Fusarium* spp; los primeros principalmente de pacientes con onicomicosis (18, 24, 54-57).

Aunque las especies del género *Sporothrix*, en particular *Sporothrix schenckii* s.str, son los agentes etiológicos de la esporotricosis (58), recientemente se publicó un caso de onicomicosis por una especie del género (59).

*Sporothrix schenckii* se consideró por mucho tiempo la única especie patógena, sin embargo trabajos llevados a cabo en las últimas décadas utilizando técnicas moleculares, permitieron demostrar que se trata de un complejo de especies crípticas denominado: *S. schenckii* conformado por *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. schenckii* s.st y *S. luriei* (60-62). El complejo *S. pallida*. Esta conformada principalmente por especies ambientales, algunas de ellas aisladas de pacientes con onicomicosis y queratitis (59, 63).

### **1.3. Identificación de hongos filamentosos**

#### **1.3.1. Técnicas convencionales**

La identificación de los agentes infecciosos aislados a partir de las muestras clínicas por técnicas convencionales basadas en la observación de características

macroscópicas de los cultivos (textura, color, producción de pigmentos, etc.) microscópicas (forma, organización y color de los conidios, presencia y tipo de células conidiógenas especializadas o de formas sexuadas) en propiedades fisiológicas (termo tolerancia o dimorfismo) o bioquímicas (fermentación o asimilación de sustratos) (64, 65), está vigente en muchos laboratorios de diagnóstico micológico. Sin embargo, esta metodología requiere personal altamente entrenado y consume mucho tiempo arribar al resultado final (66-67).

Por otro lado, entre algunas especies o incluso entre géneros existe una estrecha similitud morfológica que hace difícil la identificación con base en sus características fenotípicas, como sucede con las especies de los complejos *S. schenckii*, *T. mentagrophytes* (61, 68), *T. rubrum* (69), *F. solani* y *F. oxysporum* (70), o especies de *Aspergillus* de las de secciones como *Flavi*, *Fumigati* o *Nigri* (71), de las diferentes especies de *Aspergillus*. La correcta identificación de un patógeno fúngico es fundamental desde el punto de vista clínico, epidemiológico y terapéutico.

### **1.3.2. Técnicas moleculares basadas en la detección de ADN fúngico**

El advenimiento de las técnicas de biología molecular permitió un avance importante en la micología médica ya que facilitó el estudio de la variación genética entre hongos, estudios epidemiológicos e identificación de hongos, a partir de muestras biológicas y de cultivos.

Dentro de las técnicas más utilizadas se pueden considerar el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), la electroforesis de enzimas multilocus o MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis), el uso de sondas de hibridación marcadas para la identificación de un fragmento específico de ADN (Southern blot) y las diferentes técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) como la



amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD-PCR), PCR especie específica, PCR-RFLP, la PCR anidada y la PCR en tiempo real (72-74).

La identificación de hongos aislados de muestras clínicas utilizando PCR, supera, en sensibilidad y especificidad a la identificación por métodos convencionales (75-76). Sin embargo, la implementación de técnicas de rutina en laboratorios de diagnóstico micológico, en particular en países en vías de desarrollo, es limitada por el costo y la falta de metodologías estandarizadas.

La amplificación automatizada de dianas acoplada a la secuenciación de los productos amplificados, ha permitido una identificación más precisa de diferentes hongos, tanto directamente de muestras clínicas como a partir de cultivos. Esta es una técnica con alto poder discriminatorio, incluso entre especies crípticas (68, 77-78).

Las dianas más utilizadas para la identificación de hongos de importancia médica por secuenciación, son las regiones conservadas no codificantes intergénicas o ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosomal que, además, incluye el gen 5.8 S (ITS1+5.8S ADNr+ITS2), el ADN mitocondrial o regiones codificantes de genes como calmodulina, quitina sintetasa, topoisomerasa II o segmentos del gen que codifica para la subunidad grande del ARN ribosomal (28S) o pequeña (18S) (79-83). Actualmente la secuenciación de diferentes dianas de la célula fúngica, se considera el estándar de oro para la identificación fúngica (84, 85). Sin embargo, la principal limitación de la técnica es el tiempo que toma la obtención del resultado, así como el costo de los insumos, por lo que hasta el momento no es una opción en laboratorios de diagnóstico microbiológico de rutina en países en vías de desarrollo (86). Es evidente entonces que el desarrollo y la validación de una técnica alternativa rápida y costo-efectiva es aún una necesidad.

### 1.3.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF

EM MALDI –TOF es una variante de la espectrometría de masas, en la cual la identificación de los microorganismos se realiza a partir de proteínas intracelulares, en su mayoría ribosomales (87), para producir el perfil proteico característico para cada organismo. Los hongos poseen una pared celular gruesa y es necesario realizar una extracción de proteínas del microorganismo a identificar. Del extracto se toma una muestra que se mezcla con una matriz de naturaleza ácida sobre una placa metálica la cual se introduce en el espectrómetro donde es sometida a una ionización suave con pulsos de rayo láser ultravioleta (longitud de onda de 337 nm). Los iones generados pasan por un campo eléctrico (vuelan) y de esta manera se separan las proteínas de acuerdo al peso y a la carga generando un espectro propio (huella proteica) que permite la identificación del microorganismo al compararlo con un estándar disponible en las bases comerciales, o creadas *in house* (88), (Figura 1).

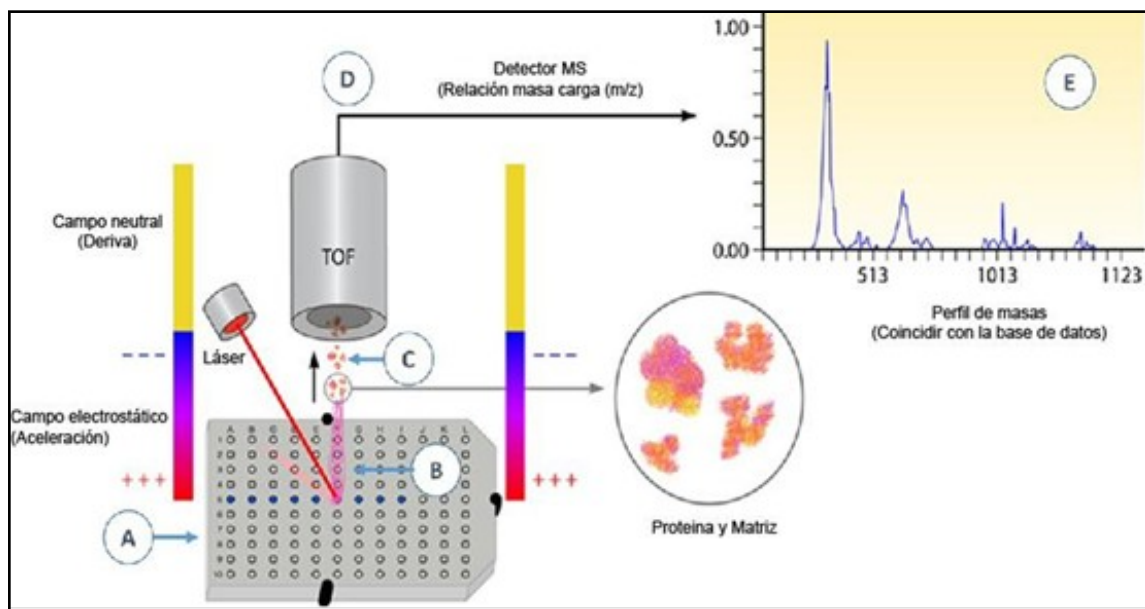


FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PRINCIPIO DE LA EM MALDI-TOF

Las muestras se mezclan con una matriz sobre una placa de acero. **(A)** se forma un cristal sobre el cual incide el rayo láser. **(B)** como resultado se producen partículas (proteínas o péptidos) ionizadas que se desplazan (vuelan). **(C)** Hasta alcanzar un detector. **(D)** Finalmente mediante un software, se obtiene un espectro. **(E)** Que por comparaciones con espectros estándar presentes en las bases de datos comerciales o construidas *in house* se logra la identificación de un microorganismo desconocido. Fuente: figura adaptada de referencia (89).

Las proteínas ribosomales se encuentran en un rango de 4 a 30 kDa, son consideradas ideales para la identificación de diversos microorganismos porque son abundantes, altamente conservadas y codificadas por genes cromosómicos (90, 91).

En los últimos años el MALDI-TOF ha revolucionado el campo de la microbiología clínica en la identificación de bacterias, micobacterias, levaduras, hongos filamentosos, parásitos y virus (89, 92-94). Además, la EM MALDI-TOF está incursionando en otros campos de la medicina para la cuantificación de medicamentos, la identificación de metabolitos, proteínas, biopolímeros o en la búsqueda de biomarcadores (87, 91, 95-98).

La implementación de la EM MALDI-TOF para la identificación de microorganismos, es cada día más frecuente por ser una técnica confiable, rápida y más precisa que los métodos bioquímicos, fisiológicos y microscópicos; con capacidad para discriminar entre especies estrechamente relacionadas como algunas de los complejos o secciones conformados por especies crípticas (89, 99-103).

La EM MALDI-TOF ha sido introducida con éxito en la micología médica para la identificación de diferentes hongos filamentosos; como especies del grupo de los dermatofitos, *Neoscytalidium* spp, *Lomentospora* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, mucorales y *Sporothrix* spp (101-102, 104-108).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La epidemiología de las infecciones fúngicas se ha modificado de manera importante en las últimas décadas; tanto el diagnóstico oportuno como el tratamiento continúan siendo un reto en la práctica clínica (2). La identificación precisa y rápida de los agentes causales de las infecciones fúngicas es importante desde el punto de vista clínico, epidemiológico y taxonómico, además, del control de potenciales fuentes de infección, prevención de la transmisión y terapéutico. Dado que las fuentes de infección, los regímenes terapéuticos y los perfiles de susceptibilidad *in vitro* pueden variar entre géneros o especies (109-112) .

El método convencional para la identificación fúngica se basa en el aislamiento del hongo *in vitro*, a partir de muestras biológicas y en la posterior identificación con base en características macroscópicas y microscópicas apoyada, en algunos casos con pruebas bioquímicas y fisiológicas (67, 113-115).

Sin embargo, la identificación basada en estos parámetros aunque es la alternativa en muchos laboratorios de diagnóstico micológico en países en vías de desarrollo, tiene limitaciones, principalmente en el caso de hongos filamentosos, debido a que requiere de personal entrenado, debido a que la similitud morfológica entre algunas especies, dificulta la identificación. Por otro lado, en algunos casos puede ser lento y no se logra fácilmente la esporulación para identificar forma y tamaño de las estructuras de reproducción asexual o la visualización de las formas de reproducción sexual. Todos

estos factores pueden llevar a una incorrecta identificación fúngica y/o a retrasar la identificación precisa y oportuna del agente etiológico de la infección (67, 116-119).

En las últimas décadas se han generado cambios importantes en la taxonomía de varios hongos (120-121), por lo que para la identificación precisa de ellos se han ido implementando técnicas de biología molecular, en particular la secuenciación de diferentes dianas las cuales tienen la ventaja de ser más rápidas, sensibles y específicas que los métodos basados en características fenotípicas (122). Sin embargo, las técnicas señaladas son costosas, requieren de tiempo para obtener los resultados y personal entrenado; por lo que su uso en la identificación de microorganismo en el laboratorio de microbiología de rutina es una alternativa aún lejana. En consecuencia la búsqueda de una prueba sencilla, costo-efectiva que supere en tiempo, sensibilidad y especificidad, la identificación fúngica por los métodos convencionales o basadas en secuencias de ADN, continúa siendo una tarea pendiente.

El uso de EM MALDI-TOF para la identificación de microorganismos es cada día más frecuente, por proporcionar resultados rápidos con capacidad para discriminar entre especies, es costo-efectiva cuando se compara con la identificación por métodos fenotípico convencionales, con la secuenciación o con otras técnicas moleculares (99, 123-124).

Actualmente la identificación de bacterias y levaduras por EM MALDI-TOF es exitosa y se ha implementado en numerosos laboratorios de diagnóstico microbiológico alrededor del mundo (89, 125). No obstante el uso de esta tecnología con los hongos filamentosos, aunque ha sido útil para la identificación de algunos géneros o especies (126), aún es limitada para otros, debido a diferencias en la estructura celular o la baja cobertura de las bases de espectros disponibles comercialmente de donde surge la necesidad de la creación de estas para la identificación de hongos endémicos, o que predominan en regiones tropicales como Colombia. Lo anterior implica una estricta

estandarización de las condiciones para la obtención de espectros reproducibles y confiables (127-128).

Teniendo en cuenta lo anterior en el laboratorio Prolab S.A.S (Medellín-Colombia), se detectó la necesidad de crear una base de espectros *in house* que, además, de contener las principales especies que causan infecciones en piel y anexos a nivel mundial, incluyera otras que aún no se encuentran en éstas, dada la prevelencia en países tropicales como el nuestro.

Finalmente lo que se pretende lograr es una identificación rápida de aislamientos clínicos de diferentes muestras apoyando, de esta manera, el inicio oportuno de los tratamientos y el aporte de datos confiables para obtener información que contribuya al conocimiento de la epidemiología local de las infecciones fúngicas.

### **3. HIPÓTESIS**

La identificación de hongos filamentosos que causan onicomicosis o dermatofitosis por espectrometría de masas MALDI-TOF es superior a la identificación por el método fenotípico clásico y comparable con la secuenciación genética.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Identificar por método clásico, espectrometría de masas MALDI-TOF y por secuenciación, hongos filamentosos causantes de onicomycosis o dermatofitosis, recolectados en un laboratorio clínico en Medellín, Colombia.

### 4.2. Objetivo específico

Crear espectros de referencia, *in house*, para la identificación de hongos de los géneros *Microsporum*, *Nannizzia*, *Trichophyton*, *Neoscytalidium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Sporothrix* por EM MALDI-TOF.

- Validar los espectros de referencia construidos, *in house*, con cepas y aislamientos clínicos previamente identificados por métodos clásicos y moleculares.
- Determinar la concordancia entre la identificación de hongos filamentosos por métodos clásicos, secuenciación y por EM MALDI-TOF.
- Determinar la concordancia entre la identificación de aislamientos clínicos por la biblioteca construida *in house* y por una de las bibliotecas comerciales.



## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Cepas y aislamientos fúngicos

Para la creación de la base de espectros propios *in house*, se utilizaron 21 cepas o aislados de diferentes especies de hongos filamentosos de importancia clínica que se identificaron previamente por secuenciación de una o varias dianas (Tabla 1). Quince cepas (15), fueron suministradas por el Dr. Nelson Lima de la Micoteca de la Universidad de Minho (Braga, Portugal), tres por el Grupo de Investigación Dermatológica (GRID), Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia), dos por la Dra. María del Rocío Reyes Montes del Laboratorio de Micología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y una por la Dra. Emilia Mellado del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España).

**Tabla 1. Cepas y aislamientos de hongos filamentosos utilizadas para la creación de los espectros de referencia *in house***

CEPA		CEPA	
<i>Aspergillus niger</i>	MUM 92.13	<i>Microsporium canis</i>	MUM 09.1
<i>Aspergillus. terreus</i>	MUM 94.09	<i>Nannizzia gypsea</i>	MUM 10.135
<i>Aspergillus flavus</i>	MUM 10.200	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	MUM 17.21
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MUM 16.03	<i>Sporothrix pallida</i>	MUM 17.04
<i>Aspergillus tubingensis</i>	MM-141	<i>Sporothrix globosa</i>	MUM 17.06
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	MM 117	<i>Sporothrix mexicana</i>	MUM 17.07
<i>Aspergillus lentulus</i>	CM – 1290	<i>Sporothrix schenckii</i> s.str	MUM 17.25
<i>Fusarium oxysporum</i>	MUM 14.05	<i>Trichophyton rubrum</i>	MUM 09.12
<i>Fusarium verticilloides</i>	MUM 16.143	<i>Trichophyton tonsurans</i>	MUM 09.19
<i>Fusarium proliferatum</i>	MUM 16.144	<i>Trichophyton interdigitale</i>	MUM 09.21
<i>Fusarium graminearum</i>	U de A 6003		

**MUM:** micoteca Universidad de Minho, **MM:** colección Universidad Nacional Autónoma de México, **U de A:** Universidad de Antioquia, **CM:** Colección de hongos miceliales, Instituto de Salud Carlos III. Fuente: creación propia.

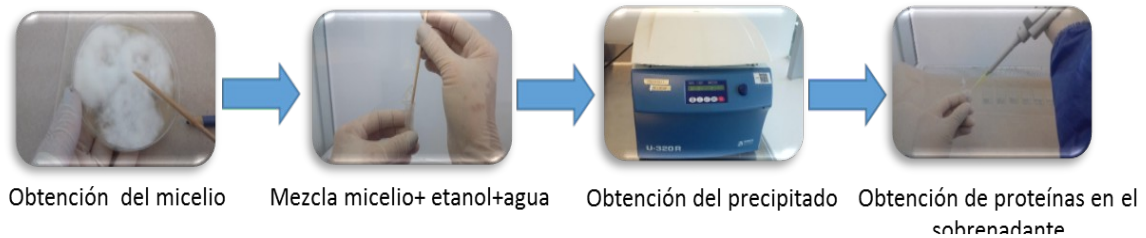
## **5.2. Definición de los tiempos de crecimiento de las diferentes cepas**

Para la estandarización de los tiempos de crecimiento, las cepas fueron sembradas en medio sólido Sabouraud cloranfenicol (Biomérieux®, Paris, Francia), realizando una evaluación cada 12 horas para observar el crecimiento. A partir de un crecimiento macroscópicamente visible se realizaron ensayos con el fin de cumplir los parámetros de masas, (70) y frecuencias ( $\geq 75$  %).

## **5.3. Obtención de proteínas a partir de los micelios para la creación de los espectros de referencia**

Las proteínas se extrajeron siguiendo el protocolo publicado por Packeu *et al.* 2013 (102), con algunas modificaciones. Se partió de cultivos de las cepas o aislamientos en el medio sólido *Sabouraud cloranfenicol* (Biomérieux®, Paris, Francia), con tiempos de incubación que variaron de acuerdo al género y/o especie.

La temperatura de incubación fue de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ . En el momento en el que el micelio fue visible, se removió suavemente con un palillo de madera y se suspendió en una mezcla de 900  $\mu\text{L}$  de etanol y 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada en un microtubo de 1500  $\mu\text{L}$  (KIMA, Italia). La mezcla se homogeneizó con vórtex y posteriormente se centrifugó durante 5 min a 16,089 g. El sobrenadante se retiró cuidadosamente hasta dejar el precipitado seco para agregar 50  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico (70 %). Se homogeneizó nuevamente y se dejó reposar durante 15 min; posteriormente se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo (100 %), nuevamente se dejó reposar el mismo tiempo, para finalmente obtener el sobrenadante por centrifugación durante 2 min a 16,089 g (Figura 2).



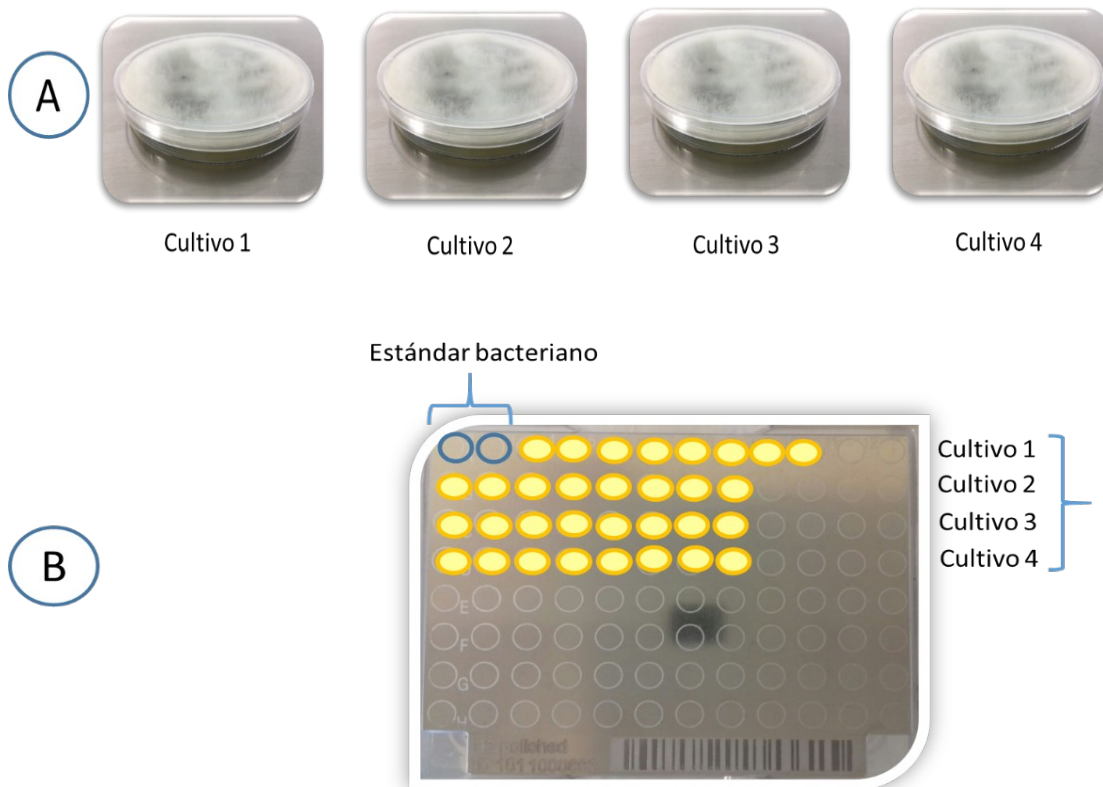
**FIGURA 2. PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS A PARTIR DE LOS MICELIOS**

Fuente: creación propia.

#### 5.4. Creación de los espectros de referencia

La creación de bases de espectros *in house* es importante, entre otras cosas, por la necesidad de espectros de referencia de género o especies circulantes a nivel local y de los cuales se carece en las librerías comerciales. Proporcionar condiciones similares entre la fabricación de espectros de referencia y la identificación de los aislamientos aumenta la probabilidad de una buena identificación. Un aspecto crucial en la creación de los espectros es tratar de cubrir la heterogeneidad entre cepas o aislamientos de la misma especie o entre subcultivos de la misma cepa.

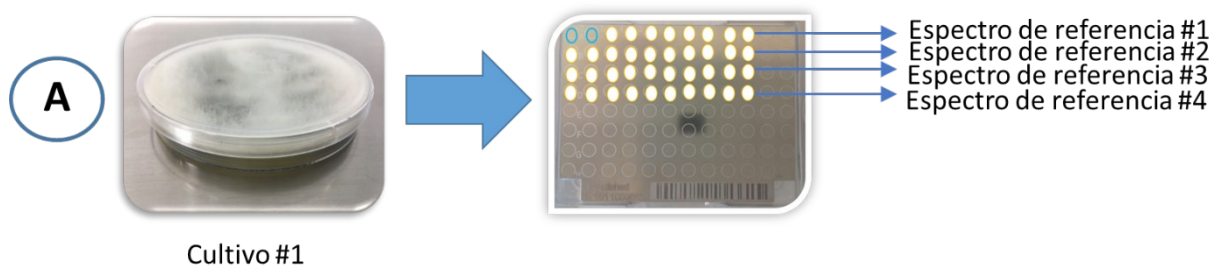
Para la creación de los espectros de referencia se realizaron cuatro cultivos (réplicas biológicas) (Figura 3A), de cada una de las cepas o aislamientos clínicos indicados en la Tabla 1 (129). De cada cultivo se extrajeron las proteínas de las cuales se depositó 1 $\mu$ L en ocho posiciones de la placa de acero (Bruker Daltonics Bremen, Alemania) (Figura 3B). Las muestras se dejaron secar y se mezclaron con 1 $\mu$ L de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).



**FIGURA 3. ESQUEMA DE LA OBTENCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LOS ESPECTROS DE REFERENCIA**  
**A)** Réplicas biológicas; **B)** Muestras (8) del extracto proteico de cada cultivo. Fuente: creación propia.

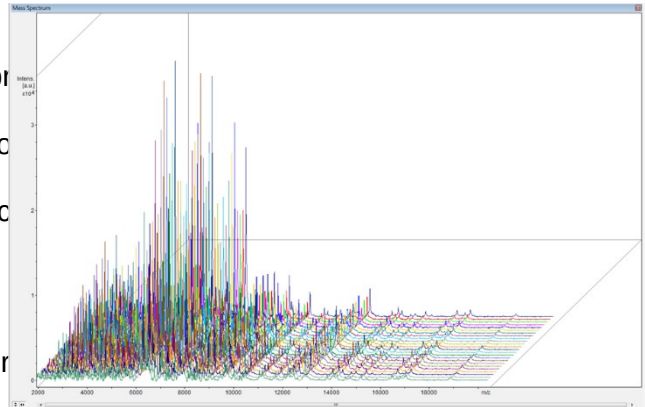
La placa se introdujo en el EM MALDI-TOF Microflex LT *Bench top mass spectrometer* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) (Figura 4A), el cual se programó utilizando la herramienta AutoXecute contenida en el software FlexControl 3.3, para la adquisición de los espectros. Se realizaron tres lecturas de cada una de las 8 posiciones (réplicas técnicas) (Figura 3B), generando así 24 espectros (Figura 4B), que conformarían el espectro de referencia de cada una de las réplicas biológicas. Posteriormente, estos fueron analizados con el software Maldi Biotyper 3.1 para confirmar el cumplimiento de los criterios establecidos por el fabricante para la aceptación de un espectro de

referencia. Por cada cepa se obtuvieron cuatro espectros de referencia (Figura 4C).



**A)** Distribución de los extractos proteicos para la obtención de los cuatro espectros de referencia por cultivo. **B)** Adquisición de los espectros a partir de cada muestra con el EIM MALDI-TOF Microflex LT Bench top mass spectrometer. **C)** Espectro de referencia conformado por 24 espectros a partir de una de las réplicas biológicas. Fuente: creación propia.

De acuerdo a las indicaciones del fabricante se aceptó un espectro de referencia, mínimo conformado por 24 espectros conformando un espectro de referencia. Los espectros debían estar conformados por los picos (con frecuencias  $\geq 75\%$ ).



Además, se tuvo en cuenta el criterio de aceptación (comunicación personal) que consistió en que si las ocho muestras de un cultivo que se usaron para la obtención de uno de los cuatro espectros de referencia (Figura 3B), se analizaban como muestras con el software Maldi Biotyper RTC 3.1, el puntaje de la lectura debía ser  $\geq 2.3$ .

Para control de la técnica y verificación de la calibración del equipo en cada análisis se incluyó un estándar bacteriano compuesto por extracto de *Escherichia coli*, RNAsa y mioglobina (BTS Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) (Figura 3B).

#### 5.4. Validación de los espectros de referencia

La parte final de la creación de la biblioteca *in house* consistió en la validación de los espectros de referencia con cepas o aislamientos clínicos de las mismas especies con las que fueron creados (Tabla 2). Los aislamientos clínicos se obtuvieron de pacientes que acudieron al diagnóstico micológico al laboratorio clínico Prolab S.A.S (Medellín, Colombia), o a la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia), quienes fueron identificados por secuenciación de una o varias dianas moleculares. Además, se incluyeron las cepas *B. bassiana* LAMFU 2460 y *P. commune* LAMFU 2748 (Miles LA, Lopera CA, González A, Cepero de Garcia MC,

Franco AE y Restrepo S) como controles negativos. Los extractos proteicos de cada hongo se analizaron por cuadruplicado con el software Maldi Biotyper RTC 3.1, y solo si el puntaje de la lectura de las cuatro muestras supera el criterio de especie  $\geq 2.0$ , establecido por la casa comercial. Además, se hizo una identificación paralela con la base de espectros comercial para hongos filamentosos (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

**Tabla 2. Cepas y aislamientos clínicos usados para la validación de los espectros de referencia construidos *in house***

HONGO		HONGO	
<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC 204305	<i>Microsporum canis</i>	Prolab 04080969
<i>Aspergillus flavus</i>	MM-122	<i>Microsporum canis</i> 8101402	Prolab
<i>Aspergillus terreus</i>	CDC 315	<i>Nannizzia gypsea</i> 10020410	Prolab
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 204304	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 6232194	Prolab
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CBS 133.61	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> 1120471	Prolab
<i>Aspergillus niger</i>	MM 129	<i>Penicillium commune</i> 2748	LAMFU
<i>Aspergillus niger</i> ( <i>brasiliensis</i> )	ATCC 16404	<i>Sporothrix globosa</i> 14879	U de A
<i>Aspergillus tubingensis</i>	MM 141	<i>Sporothrix globosa</i> 0004	U de A
<i>Aspergillus lentulus</i>	M - 7152	<i>Sporothrix schenckii</i> s.str. 15565	U de A
<i>Aspergillus lentulus</i>	M - 7140	<i>Sporothrix schenckii</i> s.str 7027	U de A
<i>Fusarium oxysporum</i>	CNSG	<i>Trichophyton rubrum</i> 28188	ATCC
<i>Fusarium oxysporum</i>	ATCC 48112	<i>Trichophyton rubrum</i> 8191487	Prolab
<i>Fusarium proliferatum</i>	LAMFU 2461	<i>Trichophyton interdigitale</i> 24198	ATCC
<i>Beauveria bassiana</i>	LAMFU 2460	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Prolab 9050951

**MM:** colección Universidad Nacional Autónoma de México, **U de A:** Universidad de Antioquia, **CNSG:** Centro Nacional de Secuenciación Genómica, Universidad de Antioquia. **CDC:** Centro de control y prevención de enfermedades. **CBS:** Centro de Biodiversidad fúngica. Fuente: creación propia.

## **5.5. Aislamientos clínicos e identificación**

Se estudiaron 52 hongos filamentosos aislados de pacientes con onicomicosis o con dermatofitosis correspondientes a 36 dermatofitos y a 16 *N. dimidiatum*.

## **5.6. Identificación por métodos fenotípicos convencionales**

La identificación convencional de los aislamientos se hizo a partir de cultivos incubados a 28 °C durante siete días para las especies del grupo de los dermatofitos, o cinco para *Neoscytalidium* spp. Inicialmente se analizaron las características macroscópicas de las colonias, color y textura, por el anverso y presencia o ausencia de pigmento por el reverso. Posteriormente, se evaluaron las características microscópicas: presencia, forma y organización de macroconidios o microconidios. La identificación fenotípica se realizó de acuerdo a las claves del *Atlas of Clinical Fungi* (116). En caso de que el hongo no hubiese esporulado, se realizaron microcultivos en el medio papa dextrosa agar (PDA, MDM® Medellín, Colombia), incubados a 28 °C hasta lograr la esporulación.

## **5.7. Identificación molecular**

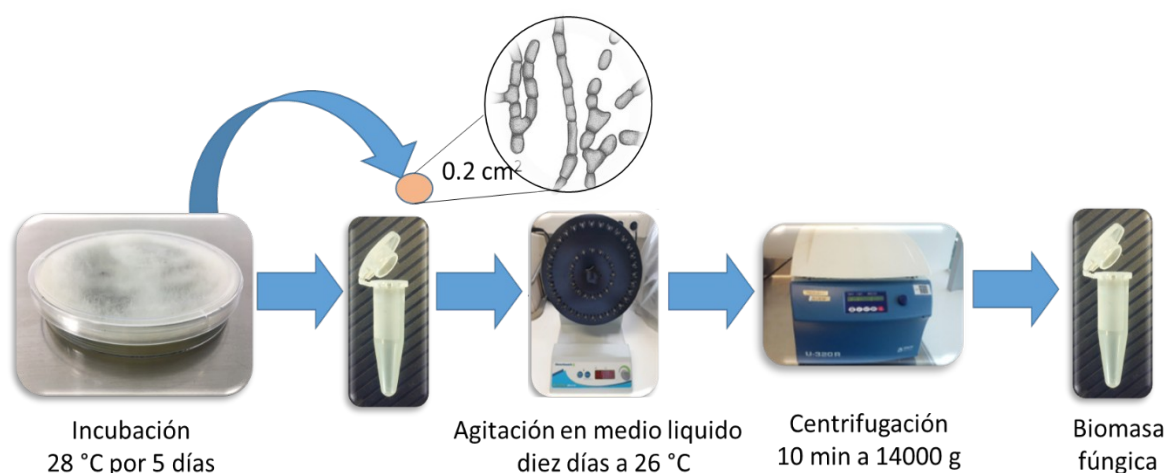
### **5.7.1. Obtención de la biomasa para la extracción del DNA**

Los aislamientos clínicos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Neoscytalidium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Sporothrix*; se cultivaron en PDA (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) a 28 °C durante 5 días. A excepción de *Sporothrix* spp., la biomasa se obtuvo transfiriendo un trozo del cultivo de 0,2 cm<sup>2</sup> (aproximadamente) a un microtubo de 1500 µL (KIMA, Italia), el cual contenía 1000 µL de medio YM (Yeast-Malt, Basingstoke, Hampshire, England). La mezcla se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por 10 días. Posteriormente se centrifugó por 10 min a 14,000 g, se descartó el sobrenadante y se añadieron 1000 µL de agua



destilada estéril, se centrifugó nuevamente y se retiró el sobrenadante, se dejó secar el precipitado y se conservó a - 20 °C hasta su uso (Figura 5).

Para *Sporothrix* spp., se obtuvieron colonias aisladas las cuales se cultivaron nuevamente en PDA (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) a 28 °C durante 5 días. Finalmente el cultivo, que se obtuvo de una sola colonia, se cubrió con 1 mL de medio YPD (extracto de levadura 1 %, peptona 2 % y glucosa / dextrosa 2 %). Los conidios y las hifas se recolectaron y transfirieron a 5 mL del mismo medio líquido contenido en cajas *Petri* pequeñas. Después de cinco días la biomasa se secó a temperatura de laboratorio y se almacenó a - 70 °C.



**FIGURA 5. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE LA BIOMASA FÚNGICA**

Fuente: creación propia.

### 5.7.2. Extracción del ADN

La biomasa obtenida se transfirió a tubos *Lysing matrix* MP Biomedicals (Santa Ana, California, EE. UU), se agregaron 500 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 200 mM, pH 8,5, NaCl 250 ml. EDTA 25 mM, SDS al 0,5 % [p / v]) y aproximadamente 300 mg de perlas de vidrio estériles de 1,25 a 1,65 mm de diámetro (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU) (Figura 6). Seguidamente se procedió a realizar ruptura celular en un FastPrep<sup>®</sup>-24 *Classic Instrument* (MP Biomedicals), por 40 seg; posteriormente se incubó en

baño maría por 30 min a 65 °C y se centrifugó por 10 min a 14,000 g. Del sobrenadante se tomaron 500 µL a los cuales se les adicionó 500 µL de acetato de sodio 3M frío (pH 5,5) para precipitar los polisacáridos y las proteínas. Esta mezcla se homogeneizó suavemente por inversión, se incubó a - 20 °C durante 10 min y se centrifugó a 14,000 g durante 10 min. La precipitación del ADN se logró por la adición de 500 µL de isopropanol a 500 µL del sobrenadante de la muestra; la solución se mezcló suavemente por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 1,30 h. Finalmente se centrifugó a 14,000 g durante 10 min y el sedimento se lavó dos veces, por centrifugación a 6,000 g durante 7 min, con 500 µL de etanol al 70 % frío. El ADN se resuspendió en 50 µL de agua estéril ultrapura, se cuantificó en un NanoDrop™ (Thermo Scientific™ Waltham, MA EE. UU) y se almacenó a - 20 °C hasta el uso.



**FIGURA 6. PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN**

Fuente: creación propia.

### 5.7.3. Amplificación de las dianas por PCR

Se seleccionaron secuencias para la amplificación y posterior secuenciación dependiendo de los géneros. La diana en *Trichophyton spp*, *Microsporum spp*, *Neoscytalidium spp* y *Fusarium spp*, fue la región no codificante ITS1+5.8SDNAr+ITS2 del ADN ribosómico la cual se amplificó utilizando los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (130). En las especies de *Aspergillus spp*, se amplificó la región que contiene los exones 3 y 4 del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina con los iniciadores Bt2-F (5'-GGCTAACCAAGATATCGGTGCCTGCCT-3') y Bt2-R (5'-ACCCTCAGGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (131). En el caso de *Sporothrix spp* se emplearon los marcadores moleculares ITS-1+5.8SDNAr+ITS-2 y  $\beta$ -tubulina (exón 3 y 4) los cuales fueron amplificados con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y Bt2-F (5'-GGCTAACCAAGATATCGGTGCCTGCCT-3') y Bt2-R (5'-ACCCTCAGGTGTAGTGACCCTTGGC-3'), respectivamente (60).

Las PCRs se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700. Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1 % y se purificaron utilizando el kit NZYgelpure de NZTtech (Lisboa, Portugal).

### 5.7.4. Secuenciación y análisis

La secuenciación se realizó por el método de Sanger/capilar utilizando la dirección del primer reverse en el laboratorio STAB Vida (Lisboa, Portugal). Las secuencias fueron editadas utilizando el programa Bioedit versión 7 y comparadas con la base de datos BLASTN (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.govBlast.cgi>). La identificación de los aislamientos se llevó a cabo en la Universidad de Minho (Portugal).

## 5.8. Identificación por EM MALDI-TOF

Una vez identificados los aislamientos por los métodos fenotípicos clásicos y por secuenciación se realizó el procedimiento descrito en la (Figura 2) para la extracción de proteínas. A partir de cada aislamiento se obtuvieron cuatro espectros que fueron comparados con los espectros de referencia construidos *in house* y con la biblioteca comercial de hongos filamentosos (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), utilizando el software Maldi Biotyper 3.1. La confirmación de género se hizo con una puntuación entre 1,700 - 1,999, de especie  $\geq 2,00$  y una puntuación  $< 1,699$  se consideró no identificación (NI). En todos los procedimientos se utilizó la configuración por defecto del equipo. Las muestras fueron probadas por cuadruplicado y por lo menos tres de cuatro (3/4) resultados debían estar dentro del mismo rango para ser tomados como válidos.

## 5.9. Análisis de estadístico

Se analizó la concordancia entre la identificación de las cepas o aislados, que se utilizaron en la validación, tanto por la biblioteca *in house* como por la comercial de hongos filamentosos (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), para ello se calculó el coeficiente *kappa* de cohen ( $\kappa$ ) con el paquete estadístico SPSS versión 25. Además, se analizó la concordancia entre la identificación por el método clásico, por la secuenciación y por EM MALDI-TOF. La interpretación de los resultados se llevó a cabo de acuerdo a las categorías definidas por Landis y Koch 1977 (132) (Tabla 3).

**Tabla 3. Categorías de acuerdo a los valores del coeficiente *kappa* de cohen**

Índice <i>kappa</i>	Grado de acuerdo
$< 0,00$	Sin acuerdo
0,0 – 2,0	Insignificante

0,21 – 0,4	Mediano
0,41 – 0,6	Moderado
0,61 – 0,8	Sustancial
0,81 - 1,00	Casi perfecto

---

Fuente: creación propia

## 6. RESULTADOS

El trabajo se inició con la construcción de una base de espectros *in house* para identificar hongos filamentosos aislados en un laboratorio clínico de la ciudad de Medellín, los cuales son agentes etiológicos de onicomiosis y dermatofitosis. Para la creación de los espectros de referencia se estandarizaron las condiciones de tiempo de los cultivos; medio, temperatura y método de extracción de proteínas. Utilizando

cepas de colecciones internacionales y un aislamiento clínico identificado por secuenciación. Los espectros de referencia fueron validados con cepas y aislamientos clínicos autóctonos previamente secuenciados.

### **6.1. Definición de los tiempos de crecimiento de las diferentes cepas para la obtención de proteínas**

Inicialmente se definen los tiempos mínimos de crecimiento de las diferentes cepas en los que se pudieran obtener las proteínas suficientes para lograr espectros que cumplan con los criterios de calidad recomendados por el fabricante (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). El tiempo de crecimiento varió entre géneros o especies, se nota, además, que las especies del complejo *Sporothrix* fueron las que menos tiempo de crecimiento requirieron (36 h), mientras que el tiempo para *M. canis* y complejo *T. rubrum* fue de (96 h). En la (Tabla 4), se indican los tiempos requeridos en cada caso.

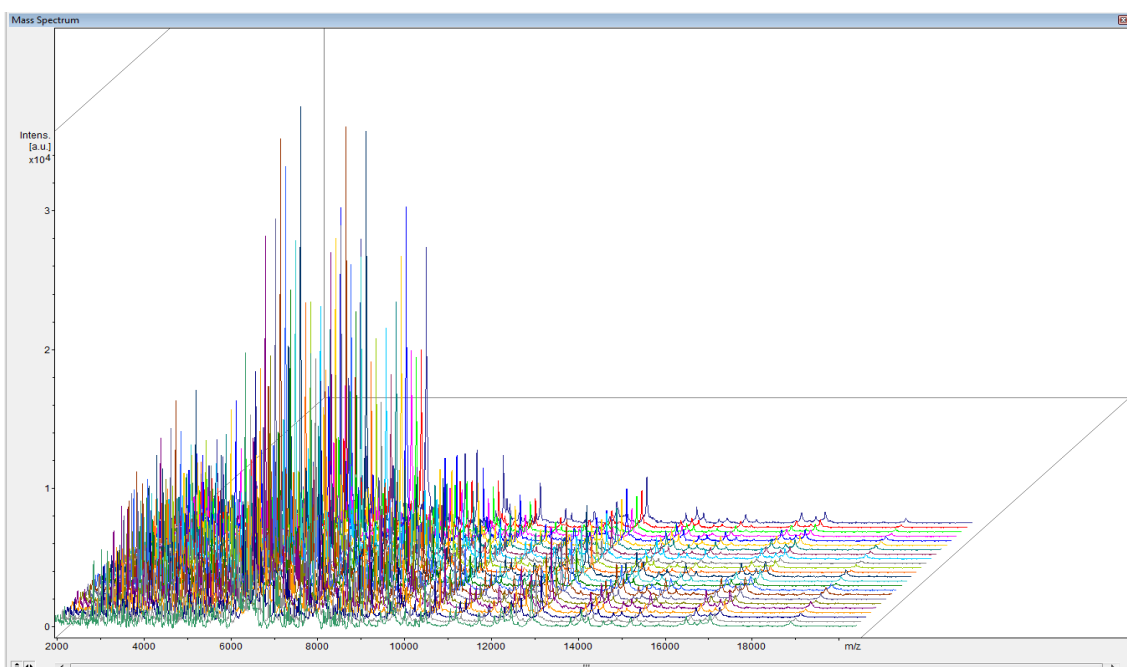
**Tabla 4. Tiempo de crecimiento de los diferentes géneros o especies fúngicas para la obtención de proteínas y generación de los espectros de referencia**

<b>Hongo</b>	<b>Tiempo de crecimiento (h)</b>
<i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp, <i>N.gypsea</i> y <i>T. interdigitale</i>	48
<i>Sporothrix</i> spp.	36
<i>T. tonsurans</i> y <i>N. dimidiatum</i>	72
<i>M. canis</i> y <i>T. rubrum</i>	96

Fuente: creación propia

## 6.2. Creación de los espectros de referencia

Los espectros de referencia se construyeron con cuatro subcultivos de la misma especie (réplicas biológicas) de los siguientes géneros: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Microsporium*, *Trichophyton*, *Sporothrix* y *Neoscytalidium* (Tabla 5). Se construyeron cuatro espectros de referencia por cada especie incluida, cada uno conformado por 20 a 24 espectros (réplicas técnicas). A modo de ejemplo, en la Figura 7 se muestra el espectro de referencia de *F. proliferatum* MUM 16.144 conformado por 24 espectros.



**FIGURA 7. ESPECTRO DE REFERENCIA DE LA CEPA F. PROLIFERATUM MUM 16.144**

El eje (Y) corresponde a la intensidad de cada pico (masa) y el eje (X) a la relación masa carga de cada proteína. Fuente: creación propia.

En cada espectro de referencia se verificó la detección de 70 picos (correspondientes a 70 masas proteicas) con frecuencias  $\geq 75$  %. En la Figura 8 se indican las

frecuencias de 25 masas de las 70 obtenidas en el espectro de referencia de *F. proliferatum* MUM 16.144.

	m/z [Da]	Intensity [%]	Weight [%]	Frequency [%]	In Peak Lists
▶	3028.32	27.93	100.00	91.7	22
	3054.46	12.75	100.00	91.7	22
	3122.73	8.39	100.00	100.0	24
	3167.09	10.59	100.00	100.0	24
	3375.79	8.49	100.00	91.7	22
	3492.70	7.80	100.00	100.0	24
	3540.36	11.13	100.00	100.0	24
	3617.34	8.48	100.00	100.0	24
	3666.16	9.52	100.00	95.8	23
	3925.32	48.63	100.00	100.0	24
	4078.14	9.15	100.00	100.0	24
	4122.90	8.30	100.00	100.0	24
	4371.21	19.68	100.00	100.0	24
	4508.56	29.34	100.00	100.0	24
	4581.78	10.65	100.00	100.0	24
	4610.70	6.38	100.00	95.8	23
	4693.68	10.07	100.00	100.0	24
	4813.77	15.00	100.00	100.0	24
	4856.16	10.92	100.00	100.0	24
	5009.62	13.78	100.00	100.0	24

**FIGURA 8. MASA Y FRECUENCIA DE 25 DE LAS 70 PROTEÍNAS DEL ESPECTRO DE REFERENCIA DE *F. PROLIFERATUM* MUM 16.144**

Fuente: creación propia.

Posterior a la creación de los espectros de referencia, los extractos proteicos utilizados se trataron como muestras con el fin de confirmar la capacidad de estos para identificar las respectivas cepas, para lo que se realizaron 32 lecturas (correspondientes a ocho muestras por cultivo y a cuatro réplicas por cepa). En la Figura 9 se indican los puntajes que resultaron de las 32 lecturas correspondientes a los extractos proteicos de los cuatro cultivos de *F. proliferatum* 16.144 al ser analizados como muestras.



	ID	Name	Position	Chip	Detected Species	Score
+	F.proliferatu	F.proliferatum #1	A3	0	Fusarium proliferatum	2.693
+	F.proliferatu	F.proliferatum #1	A4	0	Fusarium proliferatum	2.875
+	F.proliferatu	F.proliferatum #1	A5	0	Fusarium proliferatum	2.754
+	F.proliferatu	F.proliferatum #1	A6	0	Fusarium proliferatum	2.750
+	F.proliferatu	F.proliferatum #1	A7	0	Fusarium proliferatum	2.755
+	F.proliferatu	F.proliferatum #1	A8	0	Fusarium proliferatum	2.684
+	F.proliferatu	F.proliferatum #1	A9	0	Fusarium proliferatum	2.744
+	F.proliferatu	F.proliferatum #1	A10	0	Fusarium proliferatum	2.742
+	F.proliferatu	F.proliferatum #2	B1	0	Fusarium proliferatum	2.620
+	F.proliferatu	F.proliferatum #2	B2	0	Fusarium proliferatum	2.651
+	F.proliferatu	F.proliferatum #2	B3	0	Fusarium proliferatum	2.692
+	F.proliferatu	F.proliferatum #2	B4	0	Fusarium proliferatum	2.755
+	F.proliferatu	F.proliferatum #2	B5	0	Fusarium proliferatum	2.770
+	F.proliferatu	F.proliferatum #2	B6	0	Fusarium proliferatum	2.746
+	F.proliferatu	F.proliferatum #2	B7	0	Fusarium proliferatum	2.707
+	F.proliferatu	F.proliferatum #2	B8	0	Fusarium proliferatum	2.683
+	F.proliferatu	F.proliferatum #3	C1	0	Fusarium proliferatum	2.731
+	F.proliferatu	F.proliferatum #3	C2	0	Fusarium proliferatum	2.742
+	F.proliferatu	F.proliferatum #3	C3	0	Fusarium proliferatum	2.725
+	F.proliferatu	F.proliferatum #3	C4	0	Fusarium proliferatum	2.745
+	F.proliferatu	F.proliferatum #3	C5	0	Fusarium proliferatum	2.658
+	F.proliferatu	F.proliferatum #3	C6	0	Fusarium proliferatum	2.758
+	F.proliferatu	F.proliferatum #3	C7	0	Fusarium proliferatum	2.658
+	F.proliferatu	F.proliferatum #3	C8	0	Fusarium proliferatum	2.688
+	F.proliferatu	F.proliferatum #4	D1	0	Fusarium proliferatum	2.763
+	F.proliferatu	F.proliferatum #4	D2	0	Fusarium proliferatum	2.670
+	F.proliferatu	F.proliferatum #4	D3	0	Fusarium proliferatum	2.688
+	F.proliferatu	F.proliferatum #4	D4	0	Fusarium proliferatum	2.723
+	F.proliferatu	F.proliferatum #4	D5	0	Fusarium proliferatum	2.636
+	F.proliferatu	F.proliferatum #4	D6	0	Fusarium proliferatum	2.714
+	F.proliferatu	F.proliferatum #4	D7	0	Fusarium proliferatum	2.722
+	F.proliferatu	F.proliferatum #4	D8	0	Fusarium proliferatum	2.630

**FIGURA 9. IDENTIFICACIÓN Y PUNTAJE DE LAS 32 MUESTRAS DEL EXTRACTO PROTEICO DE LOS CUATRO CULTIVOS DE F. PROLIFERATUM MUM 16.144 (#1, #2, #3 Y #4)**

Fuente: creación propia.

El puntaje de las lecturas osciló entre 2,62 y 2,76 cumpliendo así con el criterio definido para aprobar inicialmente el espectro creado. En la Tabla 5 se presentan los rangos de los puntajes de todas las cepas (21), al ser analizadas como muestras. Los valores oscilaron entre 2,55 - 2,80 lo que indicó que las cepas fueron identificadas correctamente por el respectivo espectro de referencia.

**Tabla 5. Rangos de los puntajes obtenidos de cuatro lecturas de los extractos de proteínas de cada una de las 21 cepas o aislamientos al retar los espectros de referencia**

<b>Cepa</b>	<b>Rango</b>	<b>Cepa</b>	<b>Puntaje</b>
<i>Aspergillus flavus</i> MUM 10.200	2,63 - 2,64	<i>Fusarium graminearum</i> MUM 17.22	2,62 - 2,80
<i>Aspergillus fumigatus</i> MUM 16.03	2,74 - 2,75	<i>Microsporum canis</i> MUM 09.17	2,65 - 2,71
<i>Aspergillus terreus</i> MUM 94.09	2,69 - 2,73	<i>Microsporum gypseum</i> MUM 10.135	2,61 - 2,72
<i>Aspergillus niger</i> ( <i>brasiliensis</i> ) MUM 92.13	2,67 - 2,70	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> MUM 17.21	2,70 - 2,74
<i>Aspergillus tubingensis</i> MM 141	2,73 - 2,77	<i>Trichophyton tonsurans</i> MUM 09.19	2,65 - 2,63
<i>Aspergillus lentulus</i> CM 1290	2,68 - 2,73	<i>Trichophyton interdigitale</i> MUM 09.21	2,66 - 2,74
<i>Aspergillus westerdijkiae</i> MM 1170	2,61 - 2,63	<i>Trichophyton rubrum</i> MUM 09.12	2,68 - 2,75
<i>Fusarium verticilloides</i> MUM 16.143	2,65 - 2,71	<i>Sporothrix schenckii</i> s.str MUM 17.25	2,67 - 2,71
<i>Fusarium oxysporum phaseloi</i> MUM 14.05	2,68 - 2,70	<i>Sporothrix globosa</i> MUM 17.06	2,59 - 2,72
<i>Fusarium proliferatum</i> MUM 16.144	2,72 - 2,75	<i>Sporothrix mexicana</i> MUM 17.07	2,55 - 2,78
<i>Sporothrix pallida</i> MUM 17.04	2,65 - 2,71		

Fuente: creación propia.

En cada lectura de MALDI TOF, se verificó el funcionamiento del equipo (Microflex LT Bench-top mass spectrometer Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) con el estándar bacteriano (BTS Bruker Daltonics) en el cual era requisito la observación de ocho proteínas.

### 6.2.1 Validación de los espectros de referencia

Con el fin de validar los espectros de referencia generados se utilizaron 16 cepas y 12 aislamientos clínicos previamente identificados por secuenciación (Tabla 6). Los extractos proteicos de los 28 hongos incluidos se analizaron por cuadruplicado tanto con la biblioteca construida *in house* como con la comercial para hongos filamentosos (Bruker, Daltonics, Alemania). La confirmación de género se realizó con un rango de puntuación entre 1.7 y 1.999 y de  $\geq 2.0$  para especie. Una puntuación  $\leq 1,699$  se consideró no identificación (NI). En la Tabla 6 se muestran los resultados de las cuatro lecturas del extracto proteico de cada hongo así como la ubicación de acuerdo a la

categoría (especie, género o NI). Un hongo se consideró correctamente identificado cuando mínimo tres lecturas de cuatro (3/4) permitieran ubicar el hongo dentro del mismo rango de puntuación.

Los espectros de referencia de las especies *S. pallida*, *S. mexicana*, *A. westerdijkiae*, *F. graminearum*, *T. tonsurans* y *F. verticilloides* no fueron validados debido a la carencia de cepas o aislamientos clínicos, secuenciados de cada una de estas especies. Aunque el espectro de *Nannizzia gypsea* fue probado con una cepa secuenciada, no fue posible la identificación, por tanto no se validó el espectro construido para esta especie.

**Tabla 6. Resultados de la validación de la biblioteca construida *in house* y por la comercial para hongos filamentosos**

Identificación por secuenciación	Identificación por EM MALDI-TOF					
	Biblioteca					
	<i>In house</i>			Comercial		
	≥2,000	1,700- 1,990	≤ 1,699	≥ 2,000	1,700- 1,990	≤ 1,699
<i>A. fumigatus</i> (1)*	4/4			4/4		
<i>A. fumigatus</i> (1)*	4/4			1/4	3/4	
<i>A. flavus</i> (1)*	4/4				4/4	4/4
<i>A. flavus</i> (1)*	4/4				4/4	4/4
<i>A. niger</i> (1)*	4/4					4/4
<i>A. niger</i> (1)*	4/4			3/4	1/4	4/4
<i>A. tubingensis</i> (1)*	4/4					ND
<i>A. terreus</i> (1)*	4/4			3/4	1/4	
<i>F. proliferatum</i> (1)*	4/4					4/4
<i>F. oxysporum</i> (1)*	4/4				-	4/4
<i>F. oxysporum</i> (1)†	4/4				4/4	
<i>B. bassiana</i> (1)*	ND		4/4			4/4
<i>P. commune</i> (1)*	ND		4/4		4/4	
<i>N. dimidiatum</i> (1)†	4/4					ND
<i>N. dimidiatum</i> (1)†	4/4					ND

<i>S. schenckii</i> s.str	4/4	4/4
(1)† <i>S. schenckii</i>	4/4	4/4
s.str (1)†		

<i>S. globosa</i> (1)†	4/4	ND
<i>S. globosa</i> (1)†	4/4	ND

<i>T. rubrum</i> (1)*	4/4	-	-	4/4
<i>T. rubrum</i> (1)†	4/4	1/4	2/4	1/4

<i>T. interdigitale</i> (1)*	4/4		1/4	1/4
<i>T. interdigitale</i> (1)†	4/4	2/4	2/4	2/4

<i>M. canis</i> (1)†	4/4	4/4	-	-
<i>M. canis</i> (1)†	4/4	1/4	1/4	2/4

<i>M. gypseum</i> (1) †		4/4		4/4
-------------------------	--	-----	--	-----

<i>A. lentulus</i> (1)†	4/4			ND
<i>A. lentulus</i> (1)†	4/4			ND

**Total 28**

\* Cepas (16) † Aislamientos identificados por secuenciación (12). **ND**; Espectro no disponible en la biblioteca. Fuente: creación propia.

Los espectros de referencia correspondientes a las especies *S. globosa*, *A. tubingensis*, *N. dimidiatum* y *A. lentulus* no están contenidas en la biblioteca comercial, de ahí la necesidad de suplementar la biblioteca *in house* con diferentes cepas con el fin de ampliar la posibilidad de identificación.

La evaluación de la concordancia entre la identificación por secuenciación molecular y por EM MALDI - TOF, en el proceso de validación de la biblioteca *in house* así como con la comercial para hongos filamentosos fue casi perfecta ( $\kappa= 0,876$ ) y mediana ( $\kappa=0,245$ ), respectivamente.

Utilizando la base de datos comercial, *B. bassiana* no fue identificada y *P. commune* fue identificado hasta género, a pesar de contener espectros de referencia para ambas especies.

Finalmente se evaluaron los espectros de referencia con 52 aislamientos clínicos, previamente identificados por métodos fenotípicos clásicos y por secuenciación. En la (Tabla 7) se muestra la identificación por métodos fenotípicos clásicos, por secuenciación y el puntaje de la identificación por EM MALDI-TOF tanto con la librería de espectros construida *in house* como con la comercial.

**Tabla 7. Identificación de aislamientos clínicos por métodos fenotípicos clásicos, secuenciación y por EM MALDI-TOF usando dos bibliotecas de espectros**

**Identificación por EM MALDI-TOF  
Biblioteca**

Identificación fenotípica clásica	Identificación por secuenciación	<i>In house</i>			Comercial		
		≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699	≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699
<i>Neoscytalidium</i> spp 6232194	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 1120471	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 8180804	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 1231212	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 11041094	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 8180808	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 01101401	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 03060498	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 03230926	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND

**Identificación por EM MALDI-TOF  
Biblioteca**

Identificación fenotípica clásica	Identificación por secuenciación	<i>In house</i>			Comercial		
		≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699	≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699
<i>Neoscytalidium</i> spp 02130930	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 04030583	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 09081454	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 08221449	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 08050929	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 08100962	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>Neoscytalidium</i> spp 8180808	<i>N. dimidiatum</i>	4/4					ND
<i>T. rubrum</i> 8191487	<i>T. rubrum</i>	4/4			4/4		
<i>T. rubrum</i> 8090813	<i>T. rubrum</i>	4/4			4/4		



**Identificación por EM MALDI-TOF  
Biblioteca**

Identificación fenotípica clásica	Identificación por secuenciación	In house			Comercial		
		≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699	≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699
<i>T. rubrum</i> 4240487	<i>T. rubrum</i>	4/4			4/4		
<i>T. rubrum</i> 10101320	<i>T. rubrum</i>	4/4				4/4	
<i>T. rubrum</i> 10191363	<i>T. rubrum</i>	4/4				4/4	
<i>T. rubrum</i> 10211117	<i>T. rubrum</i>	4/4			1/4	2/4	1/4
<i>T. rubrum</i> 09230998	<i>T. rubrum</i>	4/4				2/4	2/4
<i>T. rubrum</i> 09261143	<i>T. rubrum</i>	4/4			2/4	2/4	
<i>T. rubrum</i> 06230571	<i>T. rubrum</i>	4/4			3/4	1/4	
<i>T. rubrum</i> 09291108	<i>T. rubrum</i>	4/4				1/4	3/4
<i>T. rubrum</i> 0622050	<i>T. rubrum</i>	4/4				1/4	3/4

**Identificación por EM MALDI-TOF  
Biblioteca**

Identificación fenotípica clásica	Identificación por secuenciación	In house			Comercial		
		≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699	≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699
<i>T. rubrum</i> 05231315	<i>T. rubrum</i>	4/4				4/4	
<i>T. rubrum</i> 7112452	<i>T. rubrum</i>	4/4				2/4	2/4
<i>T. rubrum</i> 09080820	<i>T. rubrum</i>	3/4	1/4				4/4
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 06291154	<i>T. interdigitale</i>	2/4	1/4	1/4		3/4	1/4
						<i>T. tonsurans</i>	
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 9050953	<i>T. interdigitale</i>	4/4			1/4		3/4
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 05110468	<i>T. interdigitale</i>	4/4				4/4	
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 08241373	<i>T. interdigitale</i>	3/4			3/4		1/4
						<i>T. tonsurans</i>	
		1/4					

**Identificación por EM MALDI-TOF  
Biblioteca**

Identificación fenotípica clásica	Identificación por secuenciación	In house			Comercial		
		≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699	≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699
	<i>T.interdigitale</i>						
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 09050952		4/4			4/4		
							<i>T.tonsurans</i>
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 11071240	<i>T. interdigitale</i>	4/4			3/4	1/4	
							<i>T. equinum</i>
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 062911154	<i>T. interdigitale</i>			4/4	2/4		
							<i>T.mentagrophytes</i>
						2/4	
							<i>T.tonsurans</i>
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 10031795	<i>T. interdigitale</i>			4/4	4/4		
							<i>T.mentagrophytes var erinacei</i>
<i>T. mentagrophytes</i> complejo	<i>T. interdigitale</i>	4/4			1/4	3/4	

**Identificación por EM MALDI-TOF  
Biblioteca**

Identificación fenotípica clásica	Identificación por secuenciación	In house			Comercial		
		≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699	≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699
03130607					<i>T.mentagrophytes</i>		
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 09132365	<i>T. interdigitale</i>			4/4		4/4	<i>T. tonsurans</i>
<i>T. mentagrophytes</i> complejo 09050952	<i>T. interdigitale</i>	4/4			4/4		
<i>M. canis</i> 4080969	<i>M. canis</i>	4/4			4/4		
<i>M. canis</i> 8101402	<i>M. canis</i>	4/4			1/4	1/4	2/4
<i>M. canis</i> 10201597	<i>M. canis</i>	4/4			4/4		
<i>M. canis</i> 11291730	<i>M. canis</i>	4/4			3/4	1/4	
<i>M. canis</i> 08230588	<i>M. canis</i>	4/4				1/4	3/4

**Identificación por EM MALDI-TOF  
Biblioteca**

Identificación fenotípica clásica	Identificación por secuenciación	<i>In house</i>			Comercial		
		≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699	≥2,000	1,700-1,990	≤ 1,699
<i>M. canis</i> 09211435	<i>M. canis</i>	4/4			4/4		
<i>M. canis</i> 01302657	<i>M. canis</i>	4/4			2/4	1/4	1/4
<i>M. canis</i> 08101402	<i>M. canis</i>	4/4			4/4		
<i>M. canis</i> 01020524	<i>M. canis</i>		4/4		3/4	1/4	
<i>M. canis</i> 05231255	<i>M. canis</i>	4/4			4/4		
<i>M. canis</i> 11301297	<i>M. canis</i>	4/4			4/4		
<i>Beauveria</i> spp	<i>B. bassiana</i>	ND		4/4			4/4
<i>Penicillium</i> spp	<i>P. commune</i>	ND		4/4		4/4	
<b>Total 52</b>							

Fuente: creación propia.

Con la biblioteca *in house* fue posible la identificación de aislamientos y cepas hasta especie en un 88,40 % y solo hasta género en un 1,90 %. No se identificó el 7,60 %. Además, el 2,07 % de las identificaciones fueron discrepantes con respecto a la secuenciación. De manera contraria la identificación hasta género y especie con la biblioteca comercial para hongos filamentosos correspondió al 37,00 % y 12,96 %, respectivamente, no se logró identificación en el 48,14 % de los casos y fueron discrepantes en el 1,85 %.

La concordancia entre la identificación hasta género por el método fenotípico clásico y por secuenciación fue casi perfecta ( $\kappa=0,99$ ) mientras que hasta especie fue sustancial ( $\kappa=0,732$ ). Por otra parte, la concordancia de la identificación hasta especie por secuenciación y por EM MALDI-TOF con la biblioteca construida *in house* y con la biblioteca comercial fue casi perfecta ( $\kappa= 0.826$ ) y mediana ( $\kappa= 0,273$ ), respectivamente.

Se observó discrepancia en la identificación en tres aislamientos clínicos identificados por secuenciación como *T. interdigitale*, dos fueron identificados como *T. tonsurans* por EM MALDI-TOF con la biblioteca *in house*, y el tercero como *T. mentagrophytes var erinacei* por la biblioteca comercial.

## 7. DISCUSIÓN

La identificación de hongos filamentosos en el laboratorio de diagnóstico micológico por métodos clásicos se basa en la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los aislamientos; sin embargo este enfoque suele ser robusto y la identificación inexacta. La incursión de metodologías más rápidas y costo-efectivas que la secuenciación como EM MALDI-TOF, podría ser una de las soluciones más cercana.

EM MALDI-TOF se ha utilizado con éxito en la identificación de muchas especies bacterianas y de levaduras, pero existen limitaciones en la aplicación para hongos filamentosos por diferentes razones:

- dificultad para obtener los extractos proteicos de calidad a partir de micelios de diferentes características
- carencia de espectros de referencia de algunas especies en las bibliotecas comerciales, principalmente de hongos endémicos y de importancia en determinadas regiones tropicales
- dificultad para lograr los puntajes recomendados por los fabricantes para la identificación hasta especie con algunos hongos (127, 129, 133-134) .

De acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemania) y a la experiencia de Schulthess y col (135), los hongos filamentosos deben ser cultivados en un medio líquido con agitación para la extracción de proteínas, construcción de espectros de referencia e identificación de aislamientos clínicos por EM MALDI-TOF. Sin embargo, así como otros autores (128, 136, 137), nosotros partimos de cultivos en el medio *Sabouraud cloranfenicol solido* (Biomérieux®, Paris, Francia). Con este procedimiento se obtuvieron identificaciones en corto tiempo, aspecto importante en la emisión oportuna de resultados de rutina en un laboratorio de diagnóstico micológico. Además, es una metodología menos costosa y laboriosa ya que no se requiere de subcultivos ni de equipos adicionales.

De acuerdo al fabricante (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemania) una de las ventajas del cultivo en medio líquido, es la inhibición de la conidiación. En nuestro caso se evitó la presencia de conidios usando micelios jóvenes (máximo de 96 h de crecimiento) de la mayoría de las especies exceptuando las de *Sporothrix*, que a pesar del corto tiempo de crecimiento (36 h), esporularon copiosamente. No obstante, la presencia de conidios en los cultivos de estas especies, no impidió la generación de espectros de referencia ni la identificación de aislamientos clínicos a nivel de especie.

Con el fin de hacer una identificación oportuna de los hongos aislados de muestras clínicas, el tiempo de crecimiento debe ser optimizado y estandarizado. A diferencia de lo observado en otros trabajos, (104, 128, 137, 138), nosotros definimos el tiempo mínimo de crecimiento para cada especie en el que fuera posible obtener biomasa suficiente para la extracción de las proteínas requeridas en la generación de los espectros de referencia e identificación de los aislados clínicos. El tiempo mínimo fue 36 h para *Sporothrix spp* y el máximo 96 h para la identificación de algunos dermatofitos.



La observación de micelios jóvenes fue suficiente para la identificación de dermatofitos. Sin embargo, el tiempo de obtención de estos varió entre las especies: 48 h para *M. gypseum* y *T. interdigitale*, 72 h para *T. tonsurans* y 96 h para complejo *T. rubrum* y *M. canis*. En otros estudios el tiempo de crecimiento para este grupo fue el mismo, no se estandarizó para cada género (104, 139).

A diferencia del trabajo realizado por Oliveira y col 2015, (101), quienes obtuvieron los mejores espectros de referencia para la identificación de especies de los complejos *S. schenkii* y *S. pallida*, partiendo de la forma de levadura, tras 6 días de crecimiento en medio líquido (101), en nuestro caso se logró con la forma micelial de 36 h de crecimiento en el medio *Sabouraud cloranfenicol solido* (Biomerieux®, Paris, Francia). Asimismo, la creación de los espectros de referencia e identificación de aislamientos clínicos del hongo dematiáceo *N. dimidiatum*, agente importante de onicomycosis y dermatomycosis, fueron factibles partiendo de cultivos de 72 h de crecimiento mientras que Alshawa y col, 2012 (105), utilizaron cultivos de tres semanas de crecimiento en medio sólido. La disminución de los tiempos en la identificación de hongos de importancia clínica es crucial para el inicio temprano de la terapia o para tomar medidas en el control de focos de infección.

Otro aspecto fundamental en la identificación correcta de hongos filamentosos por EM MALDI-TOF es la obtención de las proteínas; aunque algunos autores lo han logrado directamente de cultivos, sin extracción previa de proteínas (108, 133), nuestra experiencia demostró que la extracción de proteínas con ácido fórmico al 70 % y acetonitrilo al 100 %, es un paso necesario tanto en la creación de los espectros de referencia como en la identificación de los aislamientos clínicos debido a la dificultad para hacer un depósito homogéneo del micelio de algunos hongos sobre la placa de acero del equipo.

De acuerdo a la literatura la identificación de microorganismos por la metodología EM MALDI-TOF se basa principalmente en proteínas ribosomales dado que son conservadas entre especies (90, 140). A pesar de ello existe heterogeneidad entre los perfiles proteicos de hongos de la misma especie e incluso entre subcultivos de la misma cepa. Esta heterogeneidad en el perfil proteico en las especies puede ser cubierta utilizando subcultivos de una misma cepa o diferentes cepas de la misma especie (127).

A la fecha no existe un consenso sobre los criterios para la construcción de espectros de referencia o identificación de aislamientos clínicos tales como:

- elección del número de cepas para la construcción de los espectros de referencia
- definición del número de espectros para la construcción de los de referencia
- definición del número mínimo de masas en los espectros que deben conformar el de referencia
- frecuencia de las diferentes masas
- número de muestras a analizar por cada hongo a identificar o definición de los puntajes para la identificación de géneros o especies.

Para otros trabajos estos puntos no han sido relevantes (128, 129). Para la construcción de los espectros de referencia de la biblioteca *in house*, se utilizaron cuatro subcultivos (réplicas biológicas) de cada especie tal como lo hicieron Cassagne y Col. 2011 (129), de éstos, se generaron cuatro espectros de referencia los cuales debían cumplir con los criterios recomendados por el fabricante (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemania): contener entre 20 y 24 espectros conformados por 70 picos (correspondientes a 70 masas proteicas) con frecuencias  $\geq 75$  %. Con la aplicación de estos criterios se logró identificar hasta especie del 88,4 % de los

aislamientos clínicos y hasta género el 1,99 %. El porcentaje restante, 9,59 %, no fue identificado o no concordó con la identificación por secuenciación. Otros criterios diferentes a los elegidos en este trabajo han sido aplicados; por ejemplo: espectros de referencia conformados por menos de 20 espectros (128-129, 134), con un número de masas y frecuencias inferiores a 70 y 75 %, respectivamente, (127, 133, 137). Es posible que la diferencia en los criterios definidos por cada investigador explique la variabilidad en los resultados de las identificaciones, ya que mientras que con nuestra biblioteca construida *in house*, el 88,4 % de los aislamientos clínicos se identificaron hasta especie con la construida por Normand y Col 2013, y Becker y Col 2014 (127-128), la identificación fue del 50,9 % y 85,6 %, respectivamente. En estos casos la frecuencia no fue una característica relevante en los espectros de referencia como lo fue para nosotros, debido a que esta característica da cuenta de la homogeneidad y reproducibilidad de los espectros que conforman el de referencia. Además, es posible que el alto porcentaje de identificación hasta especie (85,6 %) logrado por Becker y Col 2014 (128), se deba a que el puntaje aceptado para definir especie (1,7 %) fue inferior al nuestro (2,0 %).

Otros aspectos que varían entre los diferentes trabajos son el número de muestras que se analizan de cada aislado o cepa y los criterios seleccionados para aceptar una identificación. En algunos casos el análisis se hace por duplicado o por cuadruplicado (129, 137). Sin embargo, dada la variabilidad que puede haber entre los resultados derivados de la misma cepa aumentar el número de muestras a evaluar puede disminuir la posibilidad de error; por ello nosotros elegimos analizar por cuadruplicado los extractos, tanto de las cepas que se utilizaron para la validación como de los aislados clínicos. Con relación a la definición de la identificación (especie, género o no identificado), se ha aceptado elegir el puntaje de dos de cuatro muestras (2/4) o el más alto (133-134). Nosotros nos acogimos a la propuesta de Cassagne y Col (129), por lo menos tres de cuatro resultados (3/4) debían tener un puntaje que permitiera ubicar la

identificación dentro del mismo rango (especie, género o no identificado). Aplicando estos parámetros se lograron resultados reproducibles con la identificación del 100 % de las cepas usadas en la validación y del 94,2 % de los aislados clínicos.

La identificación de microorganismo por EM MALDI-TOF suelen ser reproducibles si se controlan variables como la calidad del láser, la naturaleza química del disolvente y de la matriz, la limpieza de la placa de acero, la preparación y disposición de las muestras, previo análisis del perfil proteico. Otra variable fundamental en la correcta identificación fúngica los cultivos es su pureza, el tiempo de crecimiento el cual no debe ser muy prolongado y la utilización de los mismos medios de cultivo.

La distribución y mezcla de las muestras con la matriz y el número de espectros de referencia incluidos en cada biblioteca así como las pequeñas diferencias que puedan existir entre espectros de especies del mismo complejo, hacen parte de las variables que pueden causar inconvenientes en la identificación por EM MALDI-TOF.

Los puntajes con los que se define género o especie varían ampliamente en la literatura (128, 134-135, 141), en algunos casos son definidos por cada investigador; Zvezdanova y Col. 2018 (133-134), por ejemplo, eligieron puntajes entre 1.600-1.799 y  $\geq 1,800$  para identificación hasta género o especie, respectivamente. En contraste nosotros acogimos los puntajes recomendados por el fabricante: entre 1,700-1,999 para identificación hasta género o  $\geq 2,00$  hasta especie. Algunos autores han sugerido reducir los umbrales de las puntuaciones justificado con la buena concordancia con la secuenciación (128, 134).

La falta de un consenso en los puntajes para definir la identificación a nivel de género o especie hace difícil la comparación de los resultados entre los diferentes trabajos. Se cumplió con el objetivo de construir la biblioteca *in house* con 21 espectros de referencia. No fue posible validar los espectros de *S. pallida*, *S. mexicana*, *A. westerdijkiae*, *F. graminearum*, *T. tonsurans* y *F. verticilloides*, debido a la carencia de cepas o aislamientos clínicos secuenciados.

La biblioteca construida *in house* fue con la que mayor porcentaje de hongos se identificó correctamente hasta especie (88,4 %), en comparación con la comercial (37,0 %). Es posible que el éxito de la primera biblioteca se pueda explicar, en parte, porque la metodología usada para construir los espectros de referencia fue la misma que se usó en la identificación de los diferentes aislados clínicos, es decir, mientras nosotros utilizamos cultivos en medio sólido en todos los casos, en la biblioteca comercial se utilizaron cultivos en medio líquido para la construcción de espectros.

Por otro lado, aunque los espectros de referencia de la biblioteca comercial están conformados por varios espectros de diferentes cepas de la misma especie y la construida *in house* con cuatro réplicas de la misma cepa (réplicas biológicas), la primera no superó en identificación a la biblioteca construida *in house*. Esta situación se puede ilustrar con la identificación de *A. niger* en el proceso de validación; con la biblioteca construida *in house* se identificaron hasta nivel de especie las dos cepas utilizadas (2/2), a diferencia de la biblioteca comercial, con la que solo se identificó una (1/2) hasta especie y la otra no fue identificada, a pesar de disponer de 12 espectros de referencia construidos con cepas de la misma especie.

En las últimas décadas ha sido evidente tanto el cambio permanente en la taxonomía fúngica con la consecuente aparición de complejos y secciones (142-143), como el incremento de nuevas especies causando infecciones en el hombre (144-146). Constituyendo un reto en la identificación de diferentes géneros y especies, lo que alerta sobre la necesidad de generar nuevos espectros de referencia con el fin de ampliar la cobertura de las librerías para lograr identificaciones cada vez más precisa.

La identificación de varias especies cripticas por métodos fenotípicos convencionales no es factible debido a la similitud morfológica (macro y microscópica) entre ellas. En consecuencia, la disponibilidad de métodos con capacidad discriminatoria, rápidos y costo-efectivos son esenciales en el laboratorio de diagnóstico micológico. En este sentido, la generación de espectros de referencia *in house* que permitan la

identificación de algunas especies crípticas, como el caso de la Sección Fumigati (*A. fumigatus* y *A. lentulus*) y Nigri (*A. niger* y *A. tubingensis*) y de los complejos *S. schenckii* y *S. pallida*, es un importante logro para nuestro laboratorio ya que de esta manera se amplía la cobertura de nuestra biblioteca de espectros, permitiendo realizar identificación de estas especies de manera rápida, confiable y precisa.

Debido a que la biblioteca comercial dispone de un espectro de referencia para la identificación de *S. schenckii*, pero no es claro si fue construido con *S. schenckii* s.st o con otra especie del complejo *S. schenckii*, y considerando que actualmente se conoce que a nivel local las especies crípticas de complejo *S. schenckii* y *S. pallida* (147-148), son las más frecuentes en la etiología de la esporotricosis, decidimos construir de los espectros de referencia de estas especies. Además se incluyeron dos del complejo *S. pallida* (*S. pallida* y *S. mexicana*) que aunque son especies ambientales, se han aislado de muestras clínicas (59, 148). Tanto las cepas usadas para la validación como los aislamientos clínicos analizados, fueron identificados correctamente hasta especie con los espectros construidos *in house*, mientras que con la biblioteca comercial no se logró identificación.

Asimismo, para la identificación de *N. dimidiatum*, uno de los hongos filamentosos ambientales más implicados en la etiología de la onicomycosis a nivel regional (Colombia) (24, 56), no estaba representado en la biblioteca comercial. Los espectros fueron agregados a la biblioteca *in house*.

La identificación de los dermatofitos, tanto por los métodos clásicos como por técnicas de biología molecular, continúa siendo un reto. En parte, puede deberse a la similitud morfológica entre varios de ellos, la cercanía taxonómica y constantes cambios en la misma (68, 149-150). Un ejemplo es, *T. interdigitale*, una especie que es indistinguible por las características fenotípicas (microscópicas y macroscópicas), de otras del complejo *T. mentagrophytes*. En nuestra experiencia con la EM MALDI-TOF, tanto la

creación de los espectros de referencia como la validación de las especies *M. canis*, *T. interdigitale* y complejo *T. rubrum* fueron exitosas. Sin embargo, no todos los aislados clínicos de *T. interdigitale* fueron identificados correctamente por la biblioteca *in house*, (6/11) ni por la biblioteca comercial (3/11); por la biblioteca *in house* dos (2/11) se identificaron como *T. tonsurans* (complejo *T. mentagrophytes*) y por la comercial uno (1/11) como *T. mentagrophytes* var *erinacei*. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios (93, 104), y con la advertencia del fabricante, lo que indica que en el momento existe una limitación en la identificación de *T. interdigitale* y *T. tonsurans* por EM MALDI-TOF. Esta limitación en la identificación de especies del complejo *T. mentagrophytes* también se ha presentado con otros equipos de diferentes casas comerciales MALDI-TOF (151).

La identificación de complejo *T. rubrum* fue superior utilizando la biblioteca *in house*, donde los catorce aislamientos (14/14) clínicos ensayados se identificaron correctamente a nivel de especie, mientras que sólo cinco fueron correctamente identificados utilizando la biblioteca comercial (5/14).

En algunos trabajos los puntajes que determinan la identificación hasta género o especies son elegidos a criterio de los investigadores (128, 133), sin ajustarse a las recomendaciones de la casa comercial (Bruker, Daltonics Bremen Alemania). La consecuencia de este tipo de decisiones puede repercutir en una identificación de especie no confiable. Los rangos elegidos para este trabajo fueron exigentes en comparación con otros publicados; lo que puso en desventaja la identificación por la biblioteca comercial.

La presencia de melanina en los aislamientos clínicos o cepas se considera un interferente en la identificación fúngica por EM MALDI-TOF (152, 153). Con el fin de eliminar este factor, hongos de esta naturaleza como: *N. dimidiatum*, *A. niger* y *A. tubingensis* se identificaron usando micelio joven, antes de la aparición del pigmento.

Los métodos moleculares, principalmente la secuenciación de una o varias dianas, muestran mayor sensibilidad y especificidad que los métodos clásicos, no obstante estas técnicas no son costo-efectivas en el diagnóstico micológico de rutina en los países en vías de desarrollo (154-155).

La metodología EM MALDI-TOF es una herramienta, confiable, rápida y costo-efectiva para la identificación de aislamientos fúngicos en laboratorios de diagnóstico micológico de rutina.

## 8. CONCLUSIONES

- La estandarización de variables como el tiempo de crecimiento fúngico, el método de extracción, el número y frecuencia de las masas, así como la incorporación de réplicas biológicas, son aspectos clave en la creación de espectros de referencia de calidad.
- El uso de condiciones de crecimiento fúngico similares tanto para la generación de los espectros de referencia como para la identificación de los aislados clínicos redundó con éxito en la identificación por la biblioteca *in house*.
- La identificación de hongos filamentosos por EM MALDI-TOF fue factible sin subcultivar, en medio líquido, lo que disminuyó el tiempo para la identificación.



- Aunque la identificación de hongos filamentosos por EM MALDI-TOF no superó la identificación por secuenciación, si se lograron resultados más precisos que con el método fenotípico clásico.
- La esporulación sin formación de pigmento no fue una limitación para la generación de los espectros de referencia ni para la identificación de los aislados clínicos con las especies de *Sporothrix* y de *N. dimidiatum*.
- La biblioteca construida *in house* fue más precisa que la obtenida con la biblioteca comercial. Además tuvo la capacidad de identificar especies crípticas o estrechamente relacionadas.
- Se presentaron dificultades con la correcta identificación de la especie *T. interdigitale*, donde algunos resultados fueron identificados erróneamente como *T. tonsurans*, por ambas bibliotecas. Esto debido a que ambas especies pertenecen al complejo *T. mentagrophytes*, donde la cercanía filogenética es reducida.
- Se logró la identificación de hongos filamentosos a partir de medio sólido, disminuyendo tiempo y costos, con respecto al método propuesto por el fabricante.
- Se logró la identificación de especies de *Sporothrix* a partir de su forma micelial. La esporulación no fue una característica que impidiera alcanzar los puntajes de identificación establecidos por el fabricante. Además se logró reducir el tiempo de identificación de 6 días a 36 horas establecido por (Oliveira y col. Elsevier 2015).
- Los hallazgos de este trabajo permiten evidenciar que mediante un procedimiento estandarizado, se puede utilizar la metodología EM MALDI-TOF, para la identificación de una amplia gama de especies de hongos filamentosos clínicamente importantes.

- Por primera vez este estudio se reporta la identificación de especie acogiéndose a los parámetros establecidos por el fabricante.
- La identificación de hongos filamentosos que causan onicomycosis o dermatofitosis por espectrometría de masas MALDI-TOF es superior a la identificación por el método fenotípico clásico y comparable con la secuenciación genética.

## 9. REFERENCIAS

1. Peman J, Salavert M. [General epidemiology of invasive fungal disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30(2):90-8.
2. Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M. Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(suppl\_1):i5-i11.
3. Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods Mol Biol*. 2017;1508:17-65.
4. Oren I, Paul M. Up to date epidemiology, diagnosis and management of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 6:1-4.

5. Peman J, Quindos G. [State of the art in invasive diseases by filamentous fungi]. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(4):213-8.
6. Kaushik N, Pujalte GG, Reese ST. Superficial Fungal Infections. *Prim Care.* 2015;42(4):501-16.
7. Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res.* 2014;139(2):195-204.
8. Saxena S, Gee J, Klieger S, Kajon A, Petersen H, Zaoutis T, et al. Invasive Fungal Disease in Pediatric Solid Organ Transplant Recipients. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018;7(3):219-25.
9. Alvarez Duarte E, Denning DW. Serious fungal infections in Chile. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(6):983-6.
10. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010;51(5):561-70.
11. Taj-Aldeen SJ. Reduced Multidrug Susceptibility Profile Is a Common Feature of Opportunistic *Fusarium* Species: *Fusarium* Multi-Drug Resistant Pattern. *J Fungi (Basel).* 2017;3(2).
12. Luplertlop N. *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species: From saprobic to pathogenic fungus. *J Mycol Med.* 2018;28(2):249-56.
13. Montoya AM, Elizondo-Zertuche M, Trevino-Rangel RJ, Becerril-Garcia M, Gonzalez GM. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Trichosporon asahii* isolates from Mexican patients. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(1):22-6.
14. Garinet S, Turret J, Barete S, Arzouk N, Meyer I, Frances C, et al. Invasive cutaneous *Neoscytalidium* infections in renal transplant recipients: a series of five cases. *BMC Infect Dis.* 2015;15:535.

15. Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):884-928.
16. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol.* 2010;28(2):197-201.
17. Sanclemente G, Mahecha M, Guzmán C. Enfermedades de la piel más frecuentes en la consulta externa dermatológica del Hospital Universitario San Vicente de Paúl y del Hospital Infantil. *Acta Med Colomb.* 2001;26(5):240-4.
18. Mejía-Arango MA, Santa-Vélez C, Manuela C-S, Vélez LM, Colmenares LM, Restrepo-Jaramillo BN, et al. Estudio etiológico y epidemiológico de las micosis cutáneas en un laboratorio de referencia – Antioquia – Colombia. *Rev CES Med.* 2013;27(1):7-19.
19. Mochizuki T. [Mycological tests]. *Nihon Rinsho.* 2008;66(12):2319-25.
20. Malhotra S, Sharma S, Bhatia N, Kumar P, Bhatia N, Patil V, et al. Recent Diagnostic Techniques in Mycology. *J Med Microb Diagn.* 2014;3(Abril 10-Julio 14):2-6.
21. Ayats J, Martin-Mazuelos E, Peman J, Quindos G, Sanchez F, Garcia-Rodriguez J, et al. [Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(1):39.e1-15.
22. Zhan P, Dukik K, Li D, Sun J, Stielow JB, Gerrits van den Ende, et al. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Stud Mycol.* 2018;89:153-75.
23. Lowell A G, Stephen I K, Barbara A G, Amy S P, David J L, Wolff K. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General.* 8ª ed. España-Brasil-Argentina 2014.
24. Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Exp Dermatol.* 2010;35(6):658-63.

25. Pérez-Cárdenas JE. Aspectos Actuales Sobre Las Dermatofitosis y Sus Agentes Etiológicos. *Biosalud*. 2005;14(Diciembre):105-21.
26. Álvarez MI, González-de Polania LA. Tiña pedis en estudiantes de la Universidad del Valle, Cali. Colombia. *Biomedica*. 1998;8(Diciembre 22):268-73.
27. Lopez-Jodra O, Torres-Rodriguez JM. [Unusual fungal species causing onychomycosis.]. *Rev Iberoam Micol*. 1999;16(S):S11-5.
28. Milobratovic D, Jankovic S, Vukicevic J, Marinkovic J, Jankovic J, Railic Z. Quality of life in patients with toenail onychomycosis. *Mycoses*. 2013;56(5):543-51.
29. Gupta AK, Versteeg SG, Shear NH. Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. *J Cutan Med Surg*. 2017;21(6):525-39.
30. Haneke E, Roseeuw D. The scope of onychomycosis: epidemiology and clinical features. *Int J Dermatol*. 1999;38 Suppl 2:7-12.
31. Tosti A, Hay R, Arenas-Guzman R. Patients at risk of onychomycosis--risk factor identification and active prevention. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19 Suppl 1:13-6.
32. Lowell A G, Stephen I K, Barbara A G, Amy S P, David J L, Wolff K. Fitzpatrick. *Dermatología en Medicina General*. 8ª ed. España-Brasil-Argentina: Panamericana; 2014. 3018 p.
33. Baran R, McLoone N, Hay RJ. Could proximal white subungual onychomycosis be a complication of systemic spread? The lessons to be learned from *Maladie Dermatophytique* and other deep infections. *Br J Dermatol*. 2005;153(5):1023-5.
34. Martino P, Gastaldi R, Raccah R, Girmenia C. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *J Infect*. 1994;28 Suppl 1:7-15.

35. Nucci M, Varon AG, Garnica M, Akiti T, Barreiros G, Trope BM, et al. Increased incidence of invasive fusariosis with cutaneous portal of entry, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(10):1567-72.
36. Jayatilake JA, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathologia*. 2009;168(4):165-73.
37. Manzano-Gayosso P, Mendez-Tovar LJ, Arenas R, Hernandez-Hernandez F, Millan-Chiu B, Torres-Rodriguez JM, et al. [Onychomycosis-causing yeasts in four Mexican dermatology centers and their antifungal susceptibility to azolic compounds]. *Rev Iberoam Micol*. 2011;28(1):32-5.
38. Ahmed R, Kharal SA, Durrani MA, Sabir M, Chang AH, Fakharuddin. Frequency of *Candida* in onychomycosis. *J Pak Med Assoc*. 2013;63(3):350-3.
39. Gupta AK, Drummond-Main C, Cooper EA, Brintnell W, Piraccini BM, Tosti A. Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(3):494-502.
40. Motamedi M, Ghasemi Z, Shidfar MR, Hosseinpour L, Khodadadi H, Zomorodian K, et al. Growing Incidence of Non-Dermatophyte Onychomycosis in Tehran, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(8):e40543.
41. Martinez-Herrera EO, Arroyo-Camarena S, Tejada-Garcia DL, Porrás-Lopez CF, Arenas R. Onychomycosis due to opportunistic molds. *An Bras Dermatol*. 2015;90(3):334-7.
42. Machouart M, Menir P, Helenon R, Quist D, Desbois N. *Scytalidium* and scytalidiosis: what's new in 2012? *J Mycol Med*. 2013;23(1):40-6.
43. Dionne B, Neff L, Lee SA, Sutton DA, Wiederhold NP, Lindner J, et al. Pulmonary Fungal Infection Caused by *Neoscytalidium dimidiatum*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(7):2381-4.

44. Madrid H, Ruiz-Cendoya M, Cano J, Stchigel A, Orofino R, Guarro J. Genotyping and in vitro antifungal susceptibility of *Neoscytalidium dimidiatum* isolates from different origins. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(4):351-4.
45. James JE, Santhanam J, Lee MC, Wong CX, Sabaratnam P, Yusoff H, et al. In Vitro Antifungal Susceptibility of *Neoscytalidium dimidiatum* Clinical Isolates from Malaysia. *Mycopathologia*. 2017;182(3-4):305-13.
46. Diongue K, Ndiaye M, Seck MC, Diallo MA, Badiane AS, Ndiaye D. Onychomycosis Caused by *Fusarium* spp. in Dakar, Senegal: Epidemiological, Clinical, and Mycological Study. *Dermatol Res Pract*. 2017;2017:1268130.
47. Rosa PD, Heidrich D, Correa C, Scroferneker ML, Vettorato G, Fuentefria AM, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Fusarium* isolates in onychomycosis. *Mycoses*. 2017;60(9):616-22.
48. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7(4):479-504.
49. Guevara-Suarez M, Cano-Lira JF, de Garcia MC, Sopo L, De Bedout C, Cano LE, et al. Genotyping of *Fusarium* Isolates from Onychomycoses in Colombia: Detection of Two New Species Within the *Fusarium solani* Species Complex and In Vitro Antifungal Susceptibility Testing. *Mycopathologia*. 2016;181(3-4):165-74.
50. Bongomin F, Batac CR, Richardson MD, Denning DW. A Review of Onychomycosis Due to *Aspergillus* Species. *Mycopathologia*. 2018;183(3):485-93.
51. Noguchi H, Hiruma M, Miyashita A, Makino K, Miyata K, Ihn H. A Case of Fingernail Onychomycosis due to *Aspergillus flavus*. *Med Mycol J*. 2016;57(2):E21-5.
52. Matsuyama Y, Nakamura T, Hagi T, Asanuma K, Sudo A. Subungual onychomycosis due to *Aspergillus niger* mimicking a glomus tumor: A case report. *Biomed Rep*. 2017;7(6):532-4.

53. Serini SM, Veraldi S. Onychomycosis caused by *Aspergillus terreus*. *G Ital Dermatol Venereol*. 2016;151(4):454-5.
54. Zuluaga de C A, De Bedout C, Tabares A, Cano LE, Restrepo A, Arango M, et al. Comportamiento de los agentes etiológicos de las onicomycosis en un laboratorio de micología de referencia (Medellín 1994-2003). *Med Cutan Iber Lat Am*. 2005;33(Noviembre-Diciembre):251-6.
55. Alvarez MI, González LÁ, Castro LÁ. Onicomycosis en Cali, Colombia. *Mycopathologia*. 2004;158(Septiembre):181-6.
56. Morales-Cardona CA, Valbuena-Mesa MC, Alvarado Z, Solorzano-Amador A. Non-dermatophyte mould onychomycosis: a clinical and epidemiological study at a dermatology referral centre in Bogota, Colombia. *Mycoses*. 2014;57(5):284-93.
57. Escobar ML, Carmona-Fonseca J. Onicomycosis por hongos ambientales no dermatofíticos. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20(Febrero 7):6-10.
58. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2015;53(1):3-14.
59. Cruz Choappa RM, Vieille Oyarzo PI, Carvajal Silva LC. [Isolation of *Sporothrix pallida* complex in clinical and environmental samples from Chile]. *Rev Argent Microbiol*. 2014;46(4):311-4.
60. Oliveira MM, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(1):2-6.
61. Mahmoudi S, Zaini F, Kordbacheh P, Safara M, Heidari M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol*. 2016;54(6):593-9.
62. Marimon R, Gene J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazera M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3251-6.



63. Morrison AS, Lockhart SR, Bromley JG, Kim JY, Burd EM. An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. *Med Mycol Case Rep*. 2013;2:88-90.
64. Campbell CK, Johnson EM, Warnock DW. Identificación de hongos patógenos, 2ª edición. 2ª ed: Wiley-Blackwel; 2013.
65. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008;166(5-6):295-306.
66. Torres-Rodríguez JM. Diagnóstico microbiológico de las micosis cutáneas superficiales. *Med Clin (Barc)*. 2006;126(Enero):25-9.
67. Tangarife-Castaño VJ, Florez-Muñoz SV, Mesa-Arango AC. Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares. *Medicina & Laboratorio*. 2015;21(Junio):211-42.
68. Ziolkowska G, Nowakiewicz A, Gnat S, Troscianczyk A, Zieba P, Dzedzic BM. Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses*. 2015;58(3):119-26.
69. Graser Y, Kuijpers AF, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol*. 2000;38(9):3329-36.
70. Gaviria-Rivera A, Giraldo-Lopez A, Santa-Cardona C, Cano-Restrepo L. Molecular identification of clinical isolates of *Fusarium* in Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)*. 2018;20(1):94-102.
71. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1273:18-24.
72. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nature Communications*. 2018;9(1):5135.

73. Um JY, Chung HS, Kim MS, Na HJ, Kwon HJ, Kim JJ, et al. Molecular authentication of *Panax ginseng* species by RAPD analysis and PCR-RFLP. *Biol Pharm Bull.* 2001;24(8):872-5.
74. Rodriguez-Tudela JL, Cuesta I, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuenca-Estrella M. [Molecular techniques in mycology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26 Suppl 13:47-53.
75. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeauvais JP, et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol.* 1998;36 Suppl 1:249-57.
76. Makimura K. [Molecular methods as a diagnostic tool for fungal infections and their prospect]. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2004;45(2):59-62.
77. Hafirassou AZ, Valero C, Gassem N, Mihoubi I, Buitrago MJ. Usefulness of techniques based on real time PCR for the identification of onychomycosis-causing species. *Mycoses.* 2017;60(10):638-44.
78. Mochizuki T, Takeda K, Anzawa K. Molecular Markers Useful for Intraspecies Subtyping and Strain Differentiation of Dermatophytes. *Mycopathologia.* 2017;182(1-2):57-65.
79. Li RY, Li DM, Yu J, Liu W, Ji ZH, Wang DL. [Application of molecular biology techniques in the identification of pathogenic fungi and the diagnosis of fungal infection]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004;36(5):536-9.
80. Araujo R, Amorim A, Gusmao L. Diversity and specificity of microsatellites within *Aspergillus* section *Fumigati*. *BMC Microbiol.* 2012;12:154.
81. Chandra NS, Wulff EG, Udayashankar AC, Nandini BP, Niranjana SR, Mortensen CN, et al. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(5):1625-39.

82. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(4):383-7.
83. Cafarchia C, Iatta R, Latrofa MS, Graser Y, Otranto D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol*. 2013;20:336-51.
84. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(10):908-34.
85. Halliday CL, Kidd SE, Sorrell TC, Chen SC. Molecular diagnostic methods for invasive fungal disease: the horizon draws nearer? *Pathology*. 2015;47(3):257-69.
86. Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(4):355-60.
87. Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*. 2003;337(1-2):11-21.
88. Webster J, Oxley D. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2012;800:227-40.
89. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(3):547-603.
90. Suarez S, Ferroni A, Lotz A, Jolley KA, Guerin P, Leto J, et al. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J Microbiol Methods*. 2013;94(3):390-6.
91. Nakamura S, Sato H, Tanaka R, Yaguchi T. Verification of Ribosomal Proteins of *Aspergillus fumigatus* for Use as Biomarkers in MALDI-TOF MS Identification. *Mass Spectrom (Tokyo)*. 2016;5(1):A0049.

92. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015;6:791.
93. Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Montecchini S, Vasile Simone R, et al. Identification of different respiratory viruses, after a cell culture step, by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Sci Rep.* 2016;6:36082.
94. Niare S, Berenger JM, Dieme C, Doumbo O, Raoult D, Parola P, et al. Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS. *Malar J.* 2016;15:87.
95. Ullah S, Sandqvist S, Beck O. A liquid chromatography and tandem mass spectrometry method to determine 28 non-volatile drugs of abuse in exhaled breath. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;148:251-8.
96. Roboz J, Roboz GJ. Mass spectrometry in leukemia research and treatment. *Expert Rev Hematol.* 2015;8(2):225-35.
97. Xing J, Zang M, Liu H. The application of a novel high-resolution mass spectrometry-based analytical strategy to rapid metabolite profiling of a dual drug combination in humans. *Anal Chim Acta.* 2017;993:38-46.
98. Dong WW, Zhao J, Zhong FL, Zhu WJ, Jiang J, Wu S, et al. Biotransformation of Panax ginseng extract by rat intestinal microflora: identification and quantification of metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Ginseng Res.* 2017;41(4):540-7.
99. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Vega M, Gonzalez M, Garcia MI, Rodriguez S, et al. Identification of fungal clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Rev Esp Quimioter.* 2013;26(3):193-7.

100. Jamal WY, Ahmad S, Khan ZU, Rotimi VO. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. *Int J Infect Dis.* 2014;26:167-70.
101. Oliveira MM, Santos C, Sampaio P, Romeo O, Almeida-Paes R, Pais C, et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Res Microbiol.* 2015;166(2):102-10.
102. Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, Martiny D, Vandenberg O, Detandt M. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol.* 2013;51(6):580-5.
103. Park JH, Shin JH, Choi MJ, Choi JU, Park YJ, Jang SJ, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of 345 clinical isolates of *Aspergillus* species from 11 Korean hospitals: comparison with molecular identification. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87(1):28-31.
104. L'Ollivier C, Ranque S. MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia.* 2017;182(1-2):183-92.
105. Alshawa K, Beretti JL, Lacroix C, Feuilhade M, Dauphin B, Quesne G, et al. Successful identification of clinical dermatophyte and *Neoscytalidium* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2277-81.
106. Sitterle E, Giraud S, Leto J, Bouchara JP, Rougeron A, Morio F, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):929-35.

107. Al-Hatmi AM, Normand AC, van Diepeningen AD, Hendrickx M, de Hoog GS, Piarroux R. Rapid identification of clinical members of *Fusarium fujikuroi* complex using MALDI-TOF MS. *Future Microbiol.* 2015;10(12):1939-52.
108. De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):475-84.
109. Monod M, Lurati M, Baudraz-Rosselet F. [Diagnosis of non dermatophyte onychomycosis and its relevance for treatment]. *Rev Med Suisse.* 2013;9(380):730-3.
110. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis.* 2017;216(suppl\_3):S445-s51.
111. Heo ST, Tatara AM, Jimenez-Ortigosa C, Jiang Y, Lewis RE, Tarrand J, et al. Changes in In Vitro Susceptibility Patterns of *Aspergillus* to Triazoles and Correlation With Aspergillosis Outcome in a Tertiary Care Cancer Center, 1999-2015. *Clin Infect Dis.* 2017;65(2):216-25.
112. Iatta R, Nuccio F, Immediato D, Mosca A, De Carlo C, Miragliotta G, et al. Species Distribution and In Vitro Azole Susceptibility of *Aspergillus* Section *Nigri* Isolates from Clinical and Environmental Settings. *J Clin Microbiol.* 2016;54(9):2365-72.
113. Kozel TR, Wickes B. Fungal diagnostics. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(4):a019299.
114. Amina Mostafa AE-A, Noha E-M, Al-Shaymaa NM. Revision on the Recent Diagnostic Strategies of Fungal Infections. *Open Journal of Medical Microbiology.* 2017;7(Marzo):29-40.
115. Tille P. Overview of Fungal Identification Methods and Strategies. In: Elsevier, editor. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. Missouri, Estados Unidos: Mosby; 2014. p. 705-31.

116. Hoog G, Guarro J, Tan C, Wintermans R, Gené J. Hyphomycetes. In: Press A, editor. Atlas of clinical fungi. 2<sup>a</sup> ed. Utrecht, Países Bajos 2000. p. 380-1007.
117. Teles F, Seixas J. The future of novel diagnostics in medical mycology. *J Med Microbiol.* 2015;64(Pt 4):315-22.
118. Quindos G, Eraso E, Lopez-Soria LM, Ezpeleta G. [Invasive fungal disease: conventional or molecular mycological diagnosis?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(9):560-71.
119. Susever S, Yegenoglu Y. [Evaluation of the significance of molecular methods in the diagnosis of invasive fungal infections: comparison with conventional methods]. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(2):325-35.
120. Warnock DW. Name Changes for Fungi of Medical Importance, 2012 to 2015. *J Clin Microbiol.* 2017;55(1):53-9.
121. Guarro J. [Taxonomy and biology of fungi causing human infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(1):33-9.
122. Garcia Garces H, Hrycyk MF, Giacobino J, Capela Machado G, Domingos Arantes T, Theodoro RC, et al. Molecular identification and phylogenetical analysis of dermatophyte fungi from Latin America. *Mycoses.* 2016;59(12):787-97.
123. Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol.* 2012;50(10):3301-8.
124. De la Pedrosa EG, Gimeno C, Soriano A, Canton R. [Studies of the cost effectiveness of MALDI-TOF and clinical impact]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34 Suppl 2:47-52.

125. Relloso MS, Nieves J, Fares Taie S, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, et al. [Evaluation of mass spectrometry: MALDI-TOF MS for fast and reliable yeast identification]. *Rev Argent Microbiol.* 2015;47(2):103-7.
126. Sleiman S, Halliday CL, Chapman B, Brown M, Nitschke J, Lau AF, et al. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Aspergillus*, *Scedosporium*, and *Fusarium* spp. in the Australian Clinical Setting. *J Clin Microbiol.* 2016;54(8):2182-6.
127. Normand AC, Cassagne C, Ranque S, L'Ollivier C, Fourquet P, Roesems S, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol.* 2013;13:76.
128. Becker PT, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol.* 2014;52(8):826-34.
129. Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2011;6(12):e28425.
130. White, Bruns T, Lee S, Taylor J. White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. 1990. p. 315-22.
131. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(4):1323-30.
132. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74.



133. Zvezdanova ME, Escribano P, Ruiz A, Martinez-Jimenez MC, Pelaez T, Collazos A, et al. Increased species-assignment of filamentous fungi using MALDI-TOF MS coupled with a simplified sample processing and an in-house library. *Med Mycol.* 2019;57(1):63-70.
134. Normand AC, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, et al. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):25.
135. Schulthess B, Ledermann R, Mouttet F, Zbinden A, Bloemberg GV, Bottger EC, et al. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):2797-803.
136. Stein M, Tran V, Nichol KA, Lagace-Wiens P, Pieroni P, Adam HJ, et al. Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. *Mycoses.* 2018;61(10):743-53.
137. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):828-34.
138. Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, Gene J, Symoens F, et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(7):634-42.
139. Packeu A, De Bel A, l'Ollivier C, Ranque S, Detandt M, Hendrickx M. Fast and accurate identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: validation in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014;52(9):3440-3.

140. Roberts E, Sethi A, Montoya J, Woese CR, Luthey-Schulten Z. Molecular signatures of ribosomal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):13953-8.
141. Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2017;55(2):369-79.
142. Kano R, Hasegawa A. Historic topics on classification of Trichophyton mentagrophytes complex. *Med Mycol J*. 2014;55(2):J73-7.
143. Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(8):662-9.
144. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol*. 2016;7:683.
145. Yamairi K, Ido K, Nakamura S, Niki M, Imoto W, Shibata W, et al. Successful treatment of invasive pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus felis*, a cryptic species within the *Aspergillus* section *Fumigati*: A case report. *J Infect Chemother*. 2019;25(4):307-10.
146. Navalkele BD, Revankar S, Chandrasekar P. *Candida auris*: a worrisome, globally emerging pathogen. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(9):819-27.
147. Flórez-Munoz SV, Alzate JF, Mesa-Arango AC. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Clinical Isolates of *Sporothrix schenckii* Complex in Medellin, Colombia. *Mycopathologia*. 2019;184(1):53-63.
148. Díaz NM, Oliveira MM, Santos C, Zancoppe-Oliveira RM, Lima N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix Mexicana*, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1975-6.
149. De Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017;182(1-2):5-31.

150. Search: Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of ... @NCBI; 2019 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>].
151. Suh SO, Grosso KM, Carrion ME. Multilocus phylogeny of the Trichophyton mentagrophytes species complex and the application of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for the rapid identification of dermatophytes. *Mycologia*. 2018;110(1):118-30.
152. Rizzato C, Lombardi L, Zoppo M, Lupetti A, Tavanti A. Pushing the Limits of MALDI-TOF Mass Spectrometry: Beyond Fungal Species Identification. *J Fungi (Basel)*. 2015;1(3):367-83.
153. Singh A, Singh PK, Kumar A, Chander J, Khanna G, Roy P, et al. Molecular and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Characterization of Clinically Significant Melanized Fungi in India. *J Clin Microbiol*. 2017;55(4):1090-103.
154. Nosratabadi M, Kachuei R, Rezaie S, Harchegani AB. Beta-tubulin gene in the differentiation of *Fusarium* species by PCR-RFLP analysis. *Infez Med*. 2018;26(1):52-60.
155. Ashtiani NM, Kachuei R, Yalfani R, Harchegani AB, Nosratabadi M. Identification of *Aspergillus* sections Flavi, Nigri, and Fumigati and their differentiation using specific primers. *Infez Med*. 2017;25(2):127-32.