



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DEL NORDESTE



FACULTAD
DE MEDICINA

Maestría en Micología Médica

Aspergillus Sección Fumigati no A. fumigatus:

**Identificación polifásica y desarrollo de un método rápido de
identificación molecular**

Maestrando

Alejandra Inés Hevia

Director

Nicolás Refojo

Año 2023

A Ricardo, te me fuiste antes viejo y yo tardé mucho. Te extraño.

Agradecimientos

Nico, Negro y Juli: no me alcanzan las palabras para agradecerles el aguante, el empuje, lo compartido, las enseñanzas, los chistes, las risas, la amistad, la hermandad... afortunada de trabajar y aprender con ustedes, hacen que ir a trabajar no sea una obligación. Gracias por creer que podía lograrlo, me convencieron y acá está, es parte de uds también. Los quiero mucho.

A Graciela Davel, por crear el Departamento Micología y enseñarnos el respeto por lo que hacemos. Gracias Jefa.

A Susana gracias por tus aportes y tus enseñanzas, por la paciencia y el compromiso. Walter y Wanda, gracias por ponerle las manos a mis cepas y tratarlas con tanto cuidado.

A Ceci, Mati, Javi y Rocío, por las charlas mañaneras, el aguante y la paciencia de escucharme repetir: un mate más y me voy a escribir la tesis!

A todo el grupo del Departamento Micología, de alguna manera son parte de este esfuerzo con su apoyo, amistad, compañía y momentos compartidos. Gracias.

A mi mamá, Helena y mis hermanas Marie y Ana. Son soporte y modelo. Son mi tribu. Las adoro con el alma.

A los tres soles que iluminan mi vida. Poli por tu paciencia incondicional, tu serenidad ante mi locura, gracias. Pancho y Toti, por la espera, por el durante y por todo lo que viene. Los amo.

Indice	Pág.
Indice	1
Abreviaturas	2
Resumen	4
Summary	6
Introducción	9
El género <i>Aspergillus</i>	9
Taxonomía y Nomenclatura	9
<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	13
Sensibilidad a los antifúngicos	17
Epidemiología en Argentina	18
Otras metodologías de identificación	19
Aspergilosis: historia, entidades clínicas, diagnóstico y situación actual	20
Justificación	26
Hipótesis	28
Objetivo	28
Materiales y métodos	29
Cepas analizadas	29
Examen morfológico y de crecimiento a 50°C	29
Métodos moleculares	30
Análisis filogenético	33
Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	34
qPCR CaM- HRM	35
Resultados	37
Identificación de los aislados estudiados	38
Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	65
qPCR CaM-HRM	66
Discusión	71
Conclusiones	83
Bibliografía	85
Anexo I: Secuencias de referencia	93
Anexo II: Cepas estudiadas y resultados de qPCR- HRM	95
Anexo III: CIM de cada cepa estudiada	97
Anexo IV: alineamiento del fragmento qPCR-HRM para <i>A. fumigatus</i>	98

Abreviaturas

AB: anfotericina B.

ABPA: aspergilosis broncopulmonar alérgica.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNr: región repetitiva que codifica para los ARN ribosomales, comprendida por los genes 18s, 5.8s y 28s y los ITS 1 y 2 (18s-ITS1-5.8s-ITS2-28s).

AI: aspergilosis invasora.

AN: anidulafungina.

AP: aspergilosis pulmonar.

ATCC: *American Type Culture Collection*. Manassas, VA, USA.

BDG: β - D- glucano.

BenA: gen que codifica para la β -tubulina.

BS: del inglés *bootstrap* (valores de soporte).

CaM: gen que codifica para la calmodulina.

CAS: caspofungina.

CIM: concentración mínima inhibitoria.

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

CYA: agar Czapek- extracto de levadura.

Cq: ciclo umbral (antes llamado *threshold cycle*).

DMic: colección de cultivos de hongos de interés biomédico del Departamento Micología- INEI, Buenos Aires, Argentina.

EFI: enfermedad fúngica invasora.

EGC: enfermedad granulomatosa crónica.

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

EUCAST: *European Committee on Antifungal Susceptibility Testing*.

FQ: fibrosis quística.

GM: galactomanano.

ISA: isavuconazol.

ITS: secuencia espaciadora interna (ITS1-5.8s-ITS2).

IZ: itraconazol.

LB: lavado bronquial.

LBA: lavado broncoalveolar.

LFA: del inglés *lateral flow assay* (ensayo de flujo lateral).

LFD: del inglés *lateral flow device* (dispositivo de flujo lateral).

LLA: leucemia linfoide aguda.

LNH: linfoma no Hodgkin.

MALDI-TOF MS: del inglés *matrix assisted laser desorption ionization- time of flight*.

ML: del inglés *maximum likelihood* (máxima verosimilitud).

MEA: agar extracto de malta.

MEC: concentración mínima efectiva.

MIC: del inglés *minimum inhibitory concentration*.

MZ: micafungina.

MLST: tipificación por secuenciación de múltiples locus.

NRRL: *Northern Regional Research Laboratory*- Agricultural Research Service Culture Collection Database, Illinois, USA.

OA: agar avena arrollada.

PP probabilidad a posteriori.

PZ: posaconazol.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real.

qPCR- HRM: PCR en tiempo real con curva de dissociación de alta resolución.

TB: terbinafina.

TBC: tuberculosis.

Tm: temperature de *melting*.

TMO: transplantado de médula ósea.

VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

VZ: voriconazol.

Resumen

La aspergilosis es una infección fúngica causada por hongos del género *Aspergillus*. La especie más frecuentemente asociada a infecciones humanas es *Aspergillus fumigatus*. Sin embargo, la Sección *Fumigati* hoy contiene al menos 59 especies, muchas de las cuales han sido reportadas como agentes de aspergilosis que, en algunos casos, pueden ser refractarias al tratamiento antifúngico.

El objetivo de este trabajo fue conocer las especies de *Aspergillus* Sección *Fumigati* diferentes de *A. fumigatus* circulantes en Argentina y desarrollar un método rápido de qPCR-HRM que permita reducir los tiempos de identificación de los aislados recuperados en cultivo. Para ello, se re-identificaron todos los aislados de *A. sección Fumigati* conservados en la colección de cultivos de hongos de interés biomédico del Departamento Micología (DMic) entre 1984 y 2019. Se estudiaron sus caracteres morfológicos y su capacidad de crecimiento a 50°C. Todos los aislados que no crecieron a esa temperatura y/o presentaron morfología aberrante, se identificaron por *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) con las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) del ADNr y los genes β-Tubulina (*BenA*) y Calmodulina (*CaM*); y se analizaron sus perfiles de sensibilidad a los antifúngicos. Además, se diseñaron primers específicos para una región de 58 pb del gen *CaMy* se analizó un total de 93 muestras de ADN de *Aspergillus* de 20 especies diferentes, por qPCR-HRM y se analizaron las temperaturas de *melting* (Tm) para la diferenciación entre las especies de la sección *Fumigati*.

Se analizaron 356 aislados pertenecientes a 315 pacientes, derivadas para su identificación entre 1984 y 2019. Estos aislados fueron recuperados mayormente de esputo (37%), lavado broncoalveolar (19%) y biopsia de pulmón (15%). De los 356 aislados, 32 fueron clasificados como *A. sección Fumigati no fumigatus*: se identificaron 13 aislados (7 pacientes) de *A. udagawae*, 6 aislados (6 pacientes) de *A. lentulus*, 2 aislados (2 pacientes) de *A. fumigatiaffinis*, 2 aislados (2 pacientes) de *A. felis*, 6 aislados

(5 pacientes y 1 ambiental) de *A. hiratsukae*, 2 aislados (1 paciente) de *A. thermomutatus* y 1 aislado (clínico-ambiental) de *A. turcosus*.

Los valores de concentración mínima inhibitoria (CIM) obtenidos con *A. felis*, *A. thermomutatus* y *A. turcosus* para los nueve antifúngicos evaluados fueron ≤ 1 mg/L. Algo similar ocurrió con *A. fumigatiaffinis* con la excepción de anfotericina B (AB) donde se obtuvieron valores de CIM de 2 y 4 mg/L para los aislados de esta especie. Por el contrario, con *A. udagawae* y *A. lentulus* se obtuvieron valores de CIM más elevados, principalmente con AB y los triazoles. Para *A. hiratsukae* los valores de CIM fueron $\leq 0,5$ mg/L para todos los antifúngicos evaluados a excepción de una cepa que mostró CIM 1 mg/L para isavuconazol. Para *A. fumigatus* observamos resistencia frente a la anfotericina B en 3 cepas, mientras que para el resto de los antifúngicos no se encontraron resistencias, los valores de CIM fueron ≤ 1 mg/L. Los antifúngicos más activos fueron itraconazol, voriconazol y las equinocandinas.

El 97% (35/36) de los aislados de *A. fumigatus* se identificaron correctamente con una Tm de $78,6 \pm 0,1$ °C. Por otro lado, el 100% (42/42) de las demás especies estudiadas dentro la sección *Fumigati* se diferenciaron de *A. fumigatus* correctamente, mostrando Tm entre 79,1 y 80,5°C.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos inferir que en Argentina circulan al menos desde 1998 especies de la sección *Fumigati* diferentes de *A. fumigatus*, en un porcentaje estimado de un 8%. Las especies crípticas detectadas en orden de frecuencia fueron *A. udagawae*, *A. lentulus*, *A. hiratsukae*, *A. fumigatiaffinis*, *A. felis*, *A. thermomutatus* y *A. turcosus*. Este trabajo constituye el reporte de los primeros casos clínicos en Argentina causados por *A. fumigatiaffinis*, *A. felis* y *A. thermomutatus*, y el primer reporte de *A. turcosus* en nuestro país.

Las pruebas de sensibilidad de las especies crípticas frente a los antifúngicos coincidieron con lo reportado por otros autores. En este estudio se demuestra que los

perfíles de CIM para todas las cepas DMic de las especies estudiadas de Argentina, tienen un comportamiento variable similar a lo descripto a nivel mundial, por lo que es necesario la determinación *in vitro* de cada aislado.

Este trabajo contiene descripciones taxonómicas y registros fotográficos de macro y micromorfología de las especies detectadas en nuestro país. La herramienta qPCR-HRM se incorporó a la rutina de laboratorio para la identificación de *Aspergillus* sección *Fumigati*, en combinación con la prueba de crecimiento a 50°C, para reducir costos y mejorar los tiempos de identificación.

Este trabajo resalta la importancia de realizar estudios multicéntricos para comprender con precisión la epidemiología de las especies de esta sección a nivel nacional o regional.

Palabras claves: *Aspergillus fumigatus*, identificación molecular, sensibilidad antifúngicos, aspergilosis, MLST, qPCR-HRM.

Summary

Aspergillosis is a fungal infection caused by fungi of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus fumigatus* is the species most frequently associated with human infections. However, Section *Fumigati* contains at least 59 species, many of which have been reported as agents of aspergillosis and in some cases, may be refractory to antifungal treatment.

The aim of this work was to know the species of *Aspergillus* Section *Fumigati* different from *A. fumigatus* circulating in Argentina and to develop a rapid qPCR-HRM method that allows reducing identification times of isolates recovered in culture. For this, all the isolates of *A. section Fumigati* conserved in the DMic collection between 1984 and 2019 were re-identified. Their morphological characters and their growth capacity at 50°C were studied. All the isolates that did not grow at that temperature and/or presented

aberrant morphology were identified by Multi Locus Sequence Typing (MLST) using the sequences of the ITS (ITS1-5.8S-ITS2), β -Tubulin (*BenA*) and Calmodulin (*CaM*) genes. Also their *in vitro* susceptibility profiles against different antifungal agents were analyzed. In addition, specific primers were designed for a 58 bp region of the gene *CaM* and a total of 93 DNA samples from *Aspergillus* of 20 different species were tested by qPCR-HRM and the melting temperatures (*T_m*) were studied for the differentiation of the species within the section *Fumigati*.

In total, 356 isolates belonging to 315 patients, sent for identification between 1984 and 2019, were analyzed. These isolates were mostly recovered from sputum (37%), bronchoalveolar lavage (19%), and lung biopsy (15%). Of the 356 isolates, 32 were classified as *A. section Fumigati* different from *A. fumigatus*: 13 isolates (7 patients) of *A. udagawae*, 6 isolates (6 patients) of *A. lentulus*, 2 isolates (2 patients) of *A. fumigatiaffinis*, 2 isolates (2 patients) of *A. felis*, 6 isolates (5 patients and 1 environmental) of *A. hiratsukae*, 2 isolates (1 patient) of *A. thermomutatus* and 1 isolate (clinical-environmental) of *A. turcosus*.

The minimum inhibitory concentration (MIC) values obtained with *A. felis*, *A. thermomutatus* and *A. turcosus* against the nine antifungals evaluated were ≤ 1 mg/L. Something similar happened with *A. fumigatiaffinis* with the exception of amphotericin B (AB) where MIC values of 2 and 4 mg/L were observed for the isolates of this species. On the contrary, with *A. udagawae* and *A. lentulus* higher MIC values were obtained, mainly with AB and triazoles. For *A. hiratsukae*, MIC values were ≤ 0.5 mg/L for all antifungals tested except for one strain that showed MIC 1 mg/L for isavuconazole. For *A. fumigatus* we observed resistance against amphotericin B in 3 strains, while for the rest of the antifungals no resistance was found, the MIC values were ≤ 1 mg/L. The most active antifungals were itraconazole, voriconazole, and echinocandins.

Regarding the qPCR-HRM test, 97% (35/36) of the *A. fumigatus* isolates were correctly identified with a Tm of 78.6 ± 0.1 °C. On the other hand, 100% (42/42) of the other species studied within the section *Fumigati* were correctly differentiated from *A. fumigatus*, showing Tm between 79.1 and 80.5°C.

According to the results obtained in this work, we can infer that there are some species of the section *Fumigati* different from *A. fumigatus* circulating in Argentina, since 1998, in an estimated percentage of 8%. The cryptic species detected in order of frequency were *A. udagawae*, *A. lentulus*, *A. hiratsukae*, *A. fumigatiaffinis*, *A. felis*, *A. thermomutatus* and *A. turcosus*. This work constitutes the report of the first clinical cases in Argentina caused by *A. fumigatiaffinis*, *A. felis* and *A. thermomutatus*, and the first report of *A. turcosus* in our country.

The susceptibility tests of the cryptic species against different antifungal agents agreed with those reported by other authors. This study shows that the MIC profiles for all DMic isolates studied in Argentina, have a similar behavior to those described worldwide, so it is necessary to determine *in vitro* susceptibility of each isolate.

This work contains taxonomic descriptions and photographic records of macro and micromorphology of the species detected in our country. The qPCR-HRM tool was incorporated into the laboratory routine for the identification of *Aspergillus* section *Fumigati*, in combination with the growth test at 50°C, to reduce costs and improve identification times.

This work highlights the importance of conducting multicenter studies to accurately understand the epidemiology of the species in this section at the national or regional level.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, molecular identification, antifungal susceptibility, aspergillosis, MLST, qPCR-HRM.

Introducción

El género *Aspergillus*

Aspergillus es un ascomiceto del subphylum *Pezizomycotina*, clase *Eurotiomycetes*, subclase *Eurotiomycetidae*, orden *Eurotiales*, familia *Aspergillaceae* (1).

La descripción inicial del género *Aspergillus* fue realizada por Pier Antonio Micheli en su obra “Nova Plantarum Genera”, en 1729. Allí, el botánico florentino utilizó el nombre *Aspergillum* (en latín: salpicar, asperjar) por la similitud entre la morfología de la estructura de reproducción asexual (conidióforo) y el instrumento usado para dispersar agua bendita en las ceremonias religiosas cristianas (2). En 1926, Thom y Church reunieron toda la información disponible sobre *Aspergillus* en una monografía (3). Años más tarde, Raper y Fennell ampliaron este trabajo agregando muchas especies nuevas y proporcionando descripciones clasificándolas en 18 grupos informales basándose únicamente en aspectos morfológicos (4). En 1985, Gams y colaboradores revisaron estos grupos y asignando un sistema de clasificación infragénicas los ordenaron en subgéneros y secciones con estatus taxonómico formal (5).

Más recientemente, varios autores estudiaron la relación entre las especies de *Aspergillus* mediante el reconocimiento de las especies filogenéticas basadas en concordancia genealógica de secuencia (GCPSR). Estos estudios muestran que los grupos basados en fenotipos de Raper y Fennell se corresponden en gran medida con las clasificaciones actuales dentro del género (6–9).

Taxonomía y nomenclatura

La taxonomía de *Aspergillus* y sus nueve estados teleomórficos asociados se ha estabilizado en gran medida durante la última década (10). Basado en un estudio filogenético multilocus, mediante dos análisis independientes Kocsube y cols. (11) confirmaron que el género *Aspergillus* es monofilético y cercano a *Penicillium* como lo

habían postulado originalmente Houbraken & Samson en el año 2011 (8). Además, demostraron que el género se puede subdividir en seis subgéneros y varias secciones, lo que en gran medida corresponde a estados sexuales asociados.

En el estudio de 2011, Houbraken & Samson, combinando caracteres fenotípicos y fisiológicos, proponen que *Aspergillus* podría dividirse en seis subgéneros: *Circumdati*, *Nidulantes*, *Aspergillus*, *Fumigati*, *Polypaecili* y *Cremei* (8). Esto también fue respaldado por un estudio posterior de Houbraken y cols., donde basándose en una filogenia de 25 marcadores moleculares, *Aspergillus* y *Penicillium* se resolvieron en dos clados totalmente compatibles. A su vez, *Aspergillus* podría dividirse en cinco clados (en este estudio no se incluyeron representantes de los géneros *Phialosimplex* o *Polypaecilum*) (9). Los 6 subgéneros enumerados anteriormente están fuertemente vinculados con los estados telomórficos asociados. El estado teleomórfico *Eurotium* está vinculado al subgénero *Aspergillus* y los estados teleomórficos *Petromyces*, *Neopetromyces* y *Fennellia* pertenecen al subgénero *Circumdati*. *Neocarpenteles*, *Neosartorya* y *Dichotomomyces* pertenecen al subgénero *Fumigati*; *Chaetosartorya* y *Cristaspora* al subgénero *Cremei* y *Emericella* al subgénero *Nidulantes* (12).

La revisión de nomenclatura y la lista de especies aceptadas publicada en 2014 por Samson y cols. jugó un papel importante en la estabilización de la taxonomía del género (12). Creó un modelo de "acceso abierto" en el sentido de que se publicaron todos los metadatos asociados con los nombres de las especies, los números de acceso de la colección de cultivos ex-tipo, las clasificaciones seccionales, los números de MycoBank y los números de acceso de GenBank a las secuencias de referencia generadas a partir de cultivos ex-tipo en el dominio público (10). La calmodulina (CaM) se propuso como un marcador de identificación secundario al código de barras de ADNr ITS formal. Todos los datos publicados dieron como resultado identificaciones de especies más confiables y el descubrimiento de nuevas especies y su posterior descripción se hizo más fácil y precisa. Como resultado, la lista de especies aceptadas creció con más de 100 taxones

en el espacio de 5 años y dio como resultado el llamado *Aspergillus* “en sentido amplio” que ha sido aceptado en su mayoría por la comunidad científica (11–15).

Actualmente dentro de *Aspergillus* se incluyen 446 especies divididas en 6 subgéneros, 27 secciones y 75 series (Tabla 1) (16).

Tabla 1. Subgéneros y secciones del género <i>Aspergillus</i> , adaptado de Houbraken y cols., 2020 (16)			
Subgénero	Sección	Serie	Especies *
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	7	32
	<i>Restricti</i>	4	22
<i>Circumdati</i>	<i>Candidi</i>	1	7
	<i>Circumdati</i>	3	27
	<i>Flavi</i>	8	35
	<i>Flavipedes</i>	4	15
	<i>Janorum</i>	1	4
	<i>Nigri</i>	5	29
	<i>Petersoniorum</i>	1	4
	<i>Robusti</i>	1	1
	<i>Tannerorum</i>	1	1
	<i>Terrei</i>	3	17
<i>Cremei</i>	<i>Cremei</i>	6	17
<i>Fumigati</i>	<i>Cervini</i>	2	10
	<i>Clavati</i>	1	8
	<i>Fumigati</i>	8	59
	<i>Vargarum</i>	1	1
<i>Nidulantes</i>	<i>Aeni</i>	1	10
	<i>Bispori</i>	1	1
	<i>Cavernicolarum</i>	2	4
	<i>Nidulantes</i>	4	74
	<i>Ochaceorosei</i>	2	3
	<i>Raperorum</i>	1	2
	<i>Silvatici</i>	1	1
	<i>Sparsi</i>	4	9
	<i>Usti</i>	4	25
<i>Polypaecilum</i>	<i>Polypaecilum</i>	6	17

*No se incluyen 11 especies de ubicación taxonómica incierta.

Hasta el año 2011 la nomenclatura de hongos permitió el uso de múltiples nombres que describen las etapas asexuales y sexuales de un mismo hongo, dado que era muy difícil establecer los ciclos de vida de un hongo (conexión entre el teleomorfo y

anamorfo) sólo con características morfológicas. En ese año, se llegó a un acuerdo general entre los micólogos para abolir oficialmente el sistema dual de nomenclatura de los hongos, como se establece en la «Declaración de Ámsterdam sobre la Nomenclatura Fúngica» y esbozada por Hawksworth en 2011 (17).

Estas nuevas reglas de nomenclatura tienen grandes implicancias para el género *Aspergillus* y varias opciones fueron consideradas y sometidas a votación durante una reunión de la Comisión Internacional de *Penicillium* y *Aspergillus* (ICPA) llevada a cabo en abril de 2012 en Ámsterdam, Países Bajos. En esta reunión se decidió finalmente mantener el nombre *Aspergillus* y utilizar los nombres asignados anteriormente a los estados teleomórficos, para indicar las estructuras con importancia biológica, pero siempre junto con el nombre de *Aspergillus*. Por ejemplo, *Aspergillus glaucus* con ascoma tipo eurotium o *Aspergillus fischeri* (ascomas tipo neosartorya) (18).

La consecuencia de esta elección es que la mayoría de los nombres de las especies de *Aspergillus*, incluidos sus teleomorfos, mantienen su nombre en *Aspergillus*, lo cual contribuye a la estabilidad nomenclatural. Esta opción está fuertemente respaldada por los resultados de los análisis filogenéticos que demuestran que el género es monofilético e introduciendo modificaciones menores al concepto clásico, los géneros pequeños *Dichotomomyces*, *Polypaecilum* y *Phialosimplex* deben considerarse sinónimos de *Aspergillus* (12). Otra consecuencia del sistema de un solo nombre es que los géneros basados en teleomorfos, como *Neosartorya*, *Emericella*, *Eurotium* y *Petromyces*, son sinónimos de *Aspergillus*. Esta nomenclatura ya ha sido adoptada en las nuevas descripciones taxonómicas del género recientemente publicadas. Hubka y cols. en 2013 utilizaron una nomenclatura de un solo nombre en su revisión del género *Eurotium* y todos los taxones aceptados se incluyeron bajo sus nombres de *Aspergillus* (19). Algunos otros ejemplos de especies heterotálicas que producen estados sexuales en cultivo pero fueron descritas como *Aspergillus* incluyen *A. waksmanii*, *A. felis*, *A. huiyanae*, *A. siamensis*, *A. caatingaensis*, *A. pernambucoensis*, y *A. wyomingensis* para

especies que desarrollan ascomas tipo neosartorya (20–25), mientras que *A. cibarius*, *A. osmophilus* y *A. cumulatus* se introdujeron para especies que desarrollan ascomas tipo eurotium (26–28).

Aspergillus* sección *Fumigati

La sección *Fumigati* es de especial interés para el campo de las enfermedades infecciosas fúngicas porque esta sección incluye no sólo a *A. fumigatus* sino también a otras 11 especies cercanas documentadas como agentes etiológicos de aspergilosis invasora (AI) (29).

Las especies de esta sección se caracterizan por producir un conidióforo con cabezas aspergilares columnares, vesículas en forma de matraz y conidios producidos en cadenas desde células conidiógenas fialídicas uniseriadas. Los conidios en masa presentan tonos de verde azulado a verde claro, son generalmente hidrofóbicos y tienen un tamaño de 2,5 a 3,5 μm de diámetro (4,30). En la figura 1 pueden apreciarse las características macro y micromorfológicas que definen a esta sección.

Tradicionalmente, la identificación de estas especies relacionadas se realiza utilizando los patrones morfológicos de las colonias en diferentes medios de cultivo y la morfología de las estructuras microscópicas, células conidiógenas, conidios, ascomas y ascosporas (4). Sin embargo, con frecuencia los aislados clínicos pueden presentarse con morfologías anormales, siendo más flocosos y con menor producción de conidios.

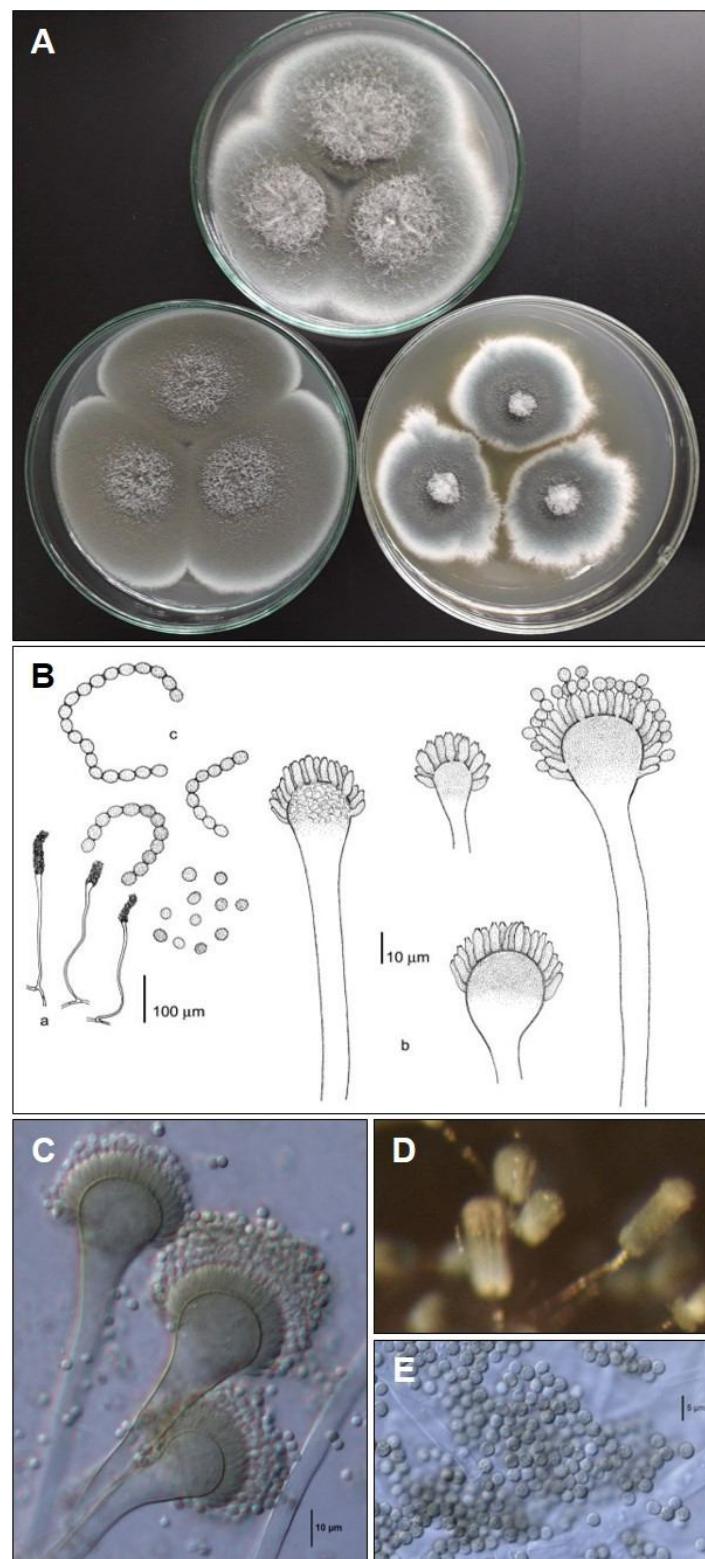


Figura 1. Características macro y microscópicas que definen la sección *Fumigati*: A. Colonias verde azulado de diferentes aislados de *A. fumigatus* en agar Czapek- extracto de levaduras (CYA). B. Diagrama de las estructuras microscópicas (30). C. Conidióforo con vesícula levemente espatulada, uniseriada, estípite de pared lisa con conidios en cadenas basípetas. D. Cabezas aspergilares columnares observadas bajo microscopio estereoscópico. E. Conidios de pared lisa a rugosa.

Además los estudios taxonómicos más recientes mostraron que las especies de la sección *Fumigati* pueden tener una morfología muy similar que hace muy difícil diferenciarlas entre sí (31). Por lo tanto, para una identificación precisa, Samson y cols. en 2007, recomiendan un enfoque polifásico basado estudios morfológicos, fisiológicos y análisis de secuencias. La secuencia del operón que codifica para el ARN ribosomal (ITS: ITS1-5.8s-ITS2) es confiable para la separación a nivel de sección, mientras que para la discriminación de las especies y estudios de filogenia son de mayor utilidad los genes que codifican para proteínas como la β -tubulina (*BetA*), la *CaM* y la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (*RPB2*), entre otros (32). Como se mencionó anteriormente *CaM* se indica como marcador recomendado para la identificación de las especies y actualmente el 96.9% de las especies aceptadas del género están representadas en las bases de datos del GenBank (16). En este trabajo de 2007 Samson y cols. aceptaron 33 especies dentro de la sección y desde entonces, el número de especies aumentó constantemente. Más recientemente Sugui y cols. aceptaron 51 especies (33). Actualmente, la sección *Fumigati* incluye 59 especies que se caracterizan por ser termotolerantes (16). *Aspergillus fischeri*, *A. fumigatus* y *A. oerlinghausensis* pueden crecer a 50 °C, mientras que otras especies de la sección tienen temperaturas máximas de crecimiento más bajas (p. ej., 45 °C: *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisynnematus*, *A. lentulus*, *A. novofumigatus*, 42 °C: *A. felis*) (34,35). Las especies homotálicas presentan en cultivo el estado sexual tipo neosartorya. El estado sexual de algunas especies anamórficas (heterotálicas) pudo ser inducido en experimentos de entrecruzamiento *in vitro*, como en *A. felis*, *A. fumigatus*, *A. lentulus* y *A. turcosus* (21,36–38).

Aspergillus fumigatus se reporta como la especie más prevalente de esta sección asociada a infecciones en diferentes países (39). En las últimas dos décadas, las otras especies de la sección *Fumigati*, se han identificado cada vez más en el entorno clínico, debido al uso cada vez mayor del enfoque polifásico para la discriminación e

identificación de especies obtenidas de muestras clínicas (31). Basándose en el análisis comparativo de tipificación de secuencias multilocus (*Multilocus sequence typing*, MLST), diferentes autores reportan que las otras especies de esta sección se recuperan del 3 al 6 % de los pacientes con AI (40–45).

El rol patógeno menor que presentan estas especies cercanas en comparación con *A. fumigatus* puede explicarse por una menor termotolerancia y diferentes perfiles de metabolitos secundarios, con una menor producción de micotoxinas, como la gliotoxina (46).

Los rangos subgenéricos formales no suelen usarse comúnmente en micología médica. Los artículos y publicaciones a menudo se refieren a otros rangos informales por ejemplo, "complejo de especies", "especies crípticas", "clados de especies", "sensu lato" y "sensu stricto". La principal desventaja de usar estos rangos informales es la falta de consenso, ya que no está claro si "*A. fumigatus* sensu lato", "complejo de especies *A. fumigatus*", "*A. fumigatus* especies crípticas" o "clado *A. fumigatus*" están representando a los mismos grupos de especies. Por lo tanto se recomienda utilizar, cuando sea posible, el sistema de clasificación formal: subgéneros, secciones y series. En el caso de *A. fumigatus*, se recomienda referirse a *A. fumigatus* (sólo esta especie), serie *Fumigati* (para *A. fumigatus* y especies cercanas que incluye además a *A. fischeri*, *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisynnematus*, *A. laciniosus*, *A. lentulus*, *A. novofumigatus*, *A. oerlinghausensis*, *A. spinosus* y *A. takakii*) o sección *Fumigati* para referirse a las 59 especies aceptadas (16,31). Para mejorar entendimiento del presente trabajo, establecemos el uso de "especies crípticas" para nombrar a las especies de la sección, diferentes de *A. fumigatus*, que no pueden diferenciarse utilizando únicamente caracteres morfológicos.

Sensibilidad a los antifúngicos

En los documentos de referencia M38 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (47) y EDef 9.4 del *European Committee on Antifungal Susceptibility Testing* (EUCAST) (48), se describe la técnica de microdilución en caldo que se utiliza para evaluar la actividad *in vitro* de los antifúngicos frente a los hongos miceliares.

Los métodos de referencia son confiables, aportan información valiosa, no obstante, a la fecha no definieron puntos de corte clínicos para todas las especies de *Aspergillus*, por ese motivo no es posible asignar categorías de “sensible/resistente”.

El CLSI propuso puntos de corte epidemiológicos en su documento M57S (49), mientras que el EUCAST propuso puntos de corte clínicos y epidemiológicos tentativos en su documento Breakpoint v.3.0 (50). En ambos documentos los puntos de corte fueron definidos únicamente para algunas especies, por lo tanto, no es posible categorizar a todas las especies que forman parte de las distintas secciones.

Los azoles son la primera línea de profilaxis y tratamiento de las infecciones por *Aspergillus* y por lo tanto, existe una gran preocupación inherente al fracaso del tratamiento. La resistencia a los triazoles puede limitar severamente las opciones de tratamiento y estar asociada con un peor pronóstico del paciente (45). Mientras que la resistencia a los triazoles es poco común entre *A. fumigatus*, estas otras especies de importancia clínica comúnmente muestran una menor susceptibilidad a los azoles y otros agentes antifúngicos (41,43,51,52). Un estudio prospectivo multicéntrico reciente informó una tasa de resistencia a los azoles del 3,2 % entre los aislamientos de *A. fumigatus*. Entre estas cepas resistentes, el 78 % eran *A. fumigatus* que albergaban mutaciones del gen *Cyp51A* que codifica para la enzima la 14- α esterol desmetilasa responsable de catalizar un paso clave de desmetilación en la síntesis de ergosterol, el esterol primario en la membrana celular fúngica. El 22 % restante eran en realidad otras especies de la sección (*A. lentulus*, *A. thermomutatus* y *A. udagawae*) (53). Estos resultados refuerzan la importancia de alcanzar una identificación a nivel de especie que

permite adecuar el tratamiento con la mayor precisión posible. Entre estas especies, *A. felis*, *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. thermomutatus* y otras especies de la serie *Viridinutantes* son las más frecuentemente aisladas de enfermedad en humanos (40–43,45,54–58).

Epidemiología en Argentina

Los datos arrojados por el Registro de Micosis Invasoras (REMIIN), estudio llevado a cabo por Dignani y cols. en nuestro país durante 3 años (2010-2013), reflejan que de un total de 90 pacientes incluidos, la aspergilosis ocupó el primer lugar produciendo un 34% de los casos y las especies de la sección *Fumigati* fueron las más frecuentemente aisladas (59). Entre ellas, se detectó *A. fumigatus* y *A. udagawae* como agentes de AI. Asimismo, en 2009 se reportó el primer aislamiento de *A. lentulus* en Argentina (60). En el año 2007, Predari y cols. reportan un caso de peritonitis fungica, donde aíslan *A. hiratsukae* de líquido de diálisis peritoneal y catéter (61). En un estudio llevado a cabo en la provincia de Catamarca, se aislaron especies de la sección *Fumigati* presentes en las muestras de suelo analizadas, incluyendo *A. fischeri*, *A. fumigatiaffinis* y *A. lentulus*, entre otras (62). En otro estudio llevado a cabo en muestras de suelo de dos eco-regiones diferentes de nuestro país en las provincias de La Rioja y Córdoba, se recuperaron especies de la sección *Fumigati* con diferente distribución según la región estudiada, además de *A. fumigatus*, también se aislaron *A. fumigatiaffinis*, *A. udagawae* y *A. felis* (63). Aunque los datos reales de la epidemiología local se desconocen, estos reportes demuestran que hay especies de *A.* sección *Fumigati* no *A. fumigatus* circulando en Argentina.

Otras metodologías de identificación

Desde su introducción en el diagnóstico de la microbiología clínica, la espectrometría de masas MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization- time of flight*) se ha convertido en el sistema de trabajo estándar para la identificación de bacterias y levaduras (64). Debido a la pared celular rígida y la variabilidad fenotípica de esporulación, se ha demostrado que la identificación de los hongos miceliales por esta metodología representa un mayor desafío. Un requisito previo para una identificación exitosa es contar con bases de datos extensas que contengan espectros de referencia de alta calidad de cepas bien caracterizadas (31). MALDI-TOF MS se ha aplicado con éxito para la identificación de *Aspergillus* spp. en varios estudios, por lo tanto, se podría demostrar que muchas, pero no todas, las especies crípticas y además poco frecuentes, pueden identificarse correctamente si están bien representadas en la base de datos correspondiente (65–67). Las especies de *Aspergillus* estrechamente relacionadas a veces son difíciles de diferenciar mediante MALDI-TOF MS debido a su patrón espectral similar, pero esto se podría mejorar mediante una mayor extensión de las bases de datos y la utilización de algoritmos de identificación alternativos (31).

Estudios realizados con PCR en tiempo real con curva de disociación de alta resolución (qPCR-HRM) para la identificación de especies del género *Aspergillus*, han demostrado ser útiles para diferenciar las especies más frecuentes como *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger*. Aunque estos estudios utilizan como gen target la secuencia parcial de ITS, que sólo sirve para diferenciar a nivel de sección (68,69), por lo tanto otros genes específicos deben ser estudiados con el fin de aumentar precisión del método.

Puesto que algunas de estas especies crípticas presentan diferentes patrones de sensibilidad a los antifúngicos de uso convencional, como ocurre con *A. lentulus*, que presenta una sensibilidad menor que *A. fumigatus* frente a la anfotericina B (AB), el itraconazol (IZ) y el voriconazol (VZ), se refuerza la necesidad de realizar una rápida y correcta identificación (29,43). La identificación de referencia permite un control preciso

de los resultados, pero es costosa, puede demorar hasta 20 días y no es fácilmente aplicable en los laboratorios del ámbito hospitalario. Es por esto que las técnicas de screening con metodologías rápidas, de menor costo y fácilmente transferibles adquieren especial valor estratégico para el laboratorio y clínico y, por ende, para el tratamiento del paciente.

Aspergilosis

Historia. La aspergilosis constituye un grupo de enfermedades producidas por hongos del género *Aspergillus*. Es una de las primeras enfermedades fúngicas reconocida en el hombre y los animales (2). En 1789 en un hospital de París, el cirujano M. Plaignaud reporta el primer caso en un paciente con infección en senos maxilares (70). Luego Mayer y Emmert, en 1815, describieron por primera vez la infección pulmonar en un ave europea. Entre 1960 y 1963, Fresenius utilizó por primera vez el término aspergilosis como enfermedad, y denominó al agente *A. fumigatus* (2,71).

En 1842, Bennett realizó el primer informe de aspergilosis pulmonar (AP), no obstante, la descripción morfológica del agente no fue coincidente con la descripción morfológica actual del hongo. Este hecho permitiría considerar que la primera descripción precisa de la AP fue realizada por Sluyter en 1847, en un paciente con neumonía (2). En 1939, Arthur Henrici consideró que las infecciones por *Aspergillus* eran tan raras que no constituían un problema de importancia en patología humana (72). A partir de la década de 1990, se ha descrito un aumento global en la frecuencia de formas invasoras de la enfermedad, siendo este incremento aún mayor en los pacientes con trasplante de médula ósea. En estos pacientes, la mortalidad alcanzó valores de 70-90% con morbilidades entre 10-30% (73).

Entidades clínicas. El término aspergilosis incluye diferentes entidades clínicas comúnmente categorizadas en: a) aspergilosis alérgica, b) colonización por *Aspergillus* y c) aspergilosis invasora (AI) (2).

Dentro de las entidades alérgicas, pueden incluirse asma, rinitis, sinusitis, alveolitis y aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) (2,74).

Las especies del género *Aspergillus* pueden colonizar oído, senos paranasales y bronquios; cuando lo hacen en cavidades preexistentes en pulmón u otros sitios, la entidad se denomina aspergiloma o bola fúngica (2,75).

La AI forma parte del grupo de patologías denominadas enfermedades fúngicas invasoras (EFIs), que son las enfermedades causadas por la invasión de los tejidos vivos del hospedador producida por un hongo. Estas infecciones representan una de las principales causas de morbi-mortalidad en pacientes trasplantados con células madre hematopoyéticas (72). Entre ellas los agentes tradicionalmente más frecuentes son las levaduras del género *Candida*, pero luego de la instauración de prácticas de profilaxis con fluconazol en pacientes trasplantados, se observó una disminución de la frecuencia de candidiasis y un aumento de las infecciones por especies de *Aspergillus* y otros hongos miciliares (73,76).

Entre las AIs, se han descripto diferentes sitios de infección dependiendo del estado inmunológico del paciente. La infección puede ser sistémica o localizarse en sitios como: piel, peritoneo, riñones, tejido óseo, ojos o tracto digestivo; no obstante, en la mayoría de los pacientes la puerta de ingreso del microorganismo es el tracto respiratorio y los síntomas iniciales son respiratorios, siendo la AP la enfermedad más frecuente (72,77,78). Se han reportado casos de asociación entre AP e infecciones virales respiratorias. Entre estas asociaciones se incluyen influenza aviar H7N9, influenza A, influenza B, virus respiratorio sincicial y, más recientemente, el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Se cree que la AP después de estas infecciones virales respiratorias es secundaria a la lesión epitelial dentro de las vías respiratorias, lo que permite la invasión de los tejidos previamente colonizados por *Aspergillus* spp. (79). Durante la pandemia de COVID-19 iniciada a fines de 2019, fue descripta una nueva categoría de AP, llamada aspergilosis pulmonar asociada a COVID-

19 (CAPA: COVID-19 associated pulmonar aspergillosis) para enfocar el estudio y los criterios diagnóstico de esta enfermedad en el contexto de urgencia que se presentó en las unidades de cuidado intensivo con pacientes con COVID-19 (80).

Diagnóstico. Para el diagnóstico de la aspergilosis, el examen directo y el cultivo son esenciales aunque presentan baja sensibilidad (31). Las especies del género generalmente desarrollan bien en medios de cultivo de rutina, aunque el uso de medios específicos para hongos puede aumentar la probabilidad de recuperación. La recuperación de *Aspergillus* spp. de los sitios no estériles debe interpretarse con precaución porque la colonización es común incluso en poblaciones de riesgo. La terapia previa, ya sea como profilaxis o tratamiento, puede disminuir el rendimiento de los cultivos (79).

La enfermedad comprobada requiere del análisis histopatológico, citopatológico o microscópico directo, con confirmación de invasión tisular. El hallazgo de hifas septadas ramificadas es altamente sugestivo de AI, pero no específico ya que otros hongos hialinos también pueden exhibir estos mismos hallazgos (79).

La dificultad para obtener muestras en pacientes con alto riesgo de AI ha despertado el interés por las pruebas diagnósticas no invasivas. La detección de antígenos circulantes de *Aspergillus* spp. en el plasma, suero y LBA de los pacientes se ha ido desarrollando y estandarizando para la detección de galactomanano (GM) con fines diagnósticos y de control de tratamiento (79). El GM es un polisacárido que existe principalmente en la pared celular de las especies de *Aspergillus* y actualmente existe un inmunoensayo tipo ELISA de doble sándwich disponible comercialmente (EIA) que utiliza el anticuerpo monoclonal EB-A2 (Platelia™, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) para detectar la antígeno GM en muestras de suero y LBA (81). La sensibilidad depende del estado inmunitario del huésped (44%–90%). En pacientes con neoplasias hematológicas (por ejemplo, neutropénicos), se observa una mayor sensibilidad que en aquellos con factores de riesgo no tradicionales dentro de unidades de cuidados intensivos. La terapia

antifúngica reciente también puede causar falsos resultados negativos de GM (79). Las pruebas en LBA exhiben una mayor sensibilidad en comparación con las pruebas en suero (47 % a 85 %) y son más sensibles para el diagnóstico de AI que los cultivos, la citología o la biopsia transbronquial (82).

Actualmente existen disponibles dos pruebas *point of care* (punto de atención) para el diagnóstico de AI. La prueba del dispositivo de flujo lateral (LFD) específico para *Aspergillus* (OLM Diagnostics, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) que detecta a través del anticuerpo monoclonal JF5, un antígeno de mananoproteína extracelular secretado exclusivamente durante el crecimiento activo de *Aspergillus* spp. Otra nueva prueba, el soña *Aspergillus* GM- LFA (*lateral flow assay*) (IMMY, Norman, OK, Estados Unidos) detecta GM con un tiempo de respuesta más corto en comparación con la prueba ELISA convencional. En pacientes con malignidad hematológica, tanto el LFD como el LFA tienen una sensibilidad y especificidad comparables al GM de LBA para el diagnóstico de AI (31).

La prueba que detecta el (1,3)- β -D-glucano (BDG), otro componente de la pared celular de *Aspergillus* también puede ser utilizada en suero del paciente. Este marcador no es específico y puede detectarse en otras enfermedades fúngicas causadas por *Candida*, *Fusarium* y *Scedosporium*, entre otros, aunque no tiene utilidad para la detección de *Cryptococcus* ni hongos del orden *Mucorales*, que presentan menor proporción de este componente en su pared. La prueba de BDG tiene un alto valor predictivo negativo, lo que genera interés en su uso para la detección en pacientes de alto riesgo (79).

Las pruebas serológicas para anticuerpos contra antígenos de *Aspergillus* son útiles para diagnosticar aspergiloma o ABPA en individuos inmunocompetentes, pero desafortunadamente la serología juega un papel pequeño para el diagnóstico en el paciente inmunodeprimido porque el crecimiento de *Aspergillus* no se correlaciona con un aumento en los títulos de anticuerpos anti-*Aspergillus* (29).

Las pruebas moleculares como la PCR han surgido como opciones alternativas para diagnosticar AI y son ampliamente utilizadas, aunque les falta suficiente estandarización (83-85) y existe una gran variación en cuanto al rendimiento diagnóstico a través de diferentes estudios y entornos (86,87). La PCR es más útil en pacientes de alto riesgo, como los pacientes neutropénicos que no están recibiendo profilaxis antifúngica, donde un resultado negativo es tranquilizador para descartar AI (31).

En otras entidades clínicas, incluyendo pacientes no neutropénicos y pacientes con bajo riesgo de AI, como sucede con la prueba de GM, la utilidad de las pruebas de PCR es limitada, particularmente desde sangre, y en general tienen poca precisión, con una especificidad del 76 %. El rendimiento de la PCR en sangre es particularmente deficiente en pacientes que reciben profilaxis activa contra hongos miceliales (88,89).

Situación actual. En 1996, sólo en los Estados Unidos, se estimaron más de 10.000 hospitalizaciones por causas relacionadas a aspergilosis, las cuales resultaron en casi 2000 muertes, más de 170.000 días de hospitalización y un costo aproximado de 633 millones de dólares (90). En Europa se reportan millones de euros anuales en costos de tratamiento de infecciones fúngicas, estimando un costo asociado al cuidado de pacientes con diagnóstico de AI de 75.000 euros por paciente (85,91).

Más recientemente, Zilberberg y cols. demostraron que en EE.UU, el número de hospitalizaciones anuales con AI ajustado por edad, aumentó de 35.968 casos en 2004 a 51.870 en 2013, un aumento global del 44,2% y del 4,4% anual. Mientras que la AI como diagnóstico principal se redujo, del 14,4 al 9,3%, la mortalidad aumentó del 10 al 12%. A pesar de que la duración media de la estancia hospitalaria disminuyó de 13,3 a 11,5 días, los cargos hospitalarios medios correspondientes aumentaron de 71.164 USD a 123.005 USD. Los cargos hospitalarios agregados ajustados a la inflación de EE.UU. para la AI como diagnóstico principal aumentaron de 436.074.445 USD en 2004 a 592.358.369 USD en 2013 (92).

Benedict y cols, estimaron que las enfermedades fúngicas costaron más de 7200 millones USD en 2017, incluidos 4500 millones USD de 75.055 hospitalizaciones y 2.6 mil millones USD de 8.993.230 visitas ambulatorias. Las hospitalizaciones por infecciones debidas a *Aspergillus* (n = 14.820, costo total 1,2 mil millones USD) representaron los costos totales de hospitalización más altos junto con las infecciones por *Candida* (n = 26.735, costo total 1.4 mil millones USD) (93).

En Argentina, aunque se desconocen las internaciones y la mortalidad causada por el agente, un estudio realizado en 2006 por Dignani y cols. en pacientes oncohematológicos, señala que el costo de tratamiento atribuible a la AI, es estimado en más de 25.000 USD por cada paciente (94). Según los datos de las encuestas de la Red Nacional de Laboratorios de Micología de Argentina realizadas en 2004, 2008, 2010, 2012, 2016 y 2018 la AI tiene una frecuencia entre 1,14 % y 2,85 % de las micosis profundas, con prevalencias relativa de 0,07 a 0,12 por 100.000 hab. (95).

Conocer la distribución de las especies de *A. sección Fumigati* en nuestro país permitirá ajustar adecuadamente las terapias empíricas y alertar a los equipos médicos sobre la prevalencia de las especies críticas, sobre todo, ante un escenario de falla terapéutica.

Justificación

La población de pacientes de mayor riesgo asociado a AI está representada por pacientes inmunocomprometidos como trasplantados de órganos sólidos y especialmente oncohematológicos, que sufren largos períodos de neutropenia. En estos pacientes la AI posee una alta morbi-mortalidad y un aumento de costo de tratamiento difícil de sostener para el sistema de salud, ya sean instituciones públicas o privadas (94).

Dado el aumento en la incidencia de AI y la expansión del espectro de especies fúngicas patógenas, la identificación precoz y precisa de los agentes es una herramienta clave que puede aportar gran cantidad de información de utilidad diagnóstica (96). Sin un diagnóstico preciso, los médicos suelen recurrir a la terapia antifúngica empírica, exponiendo a los pacientes a tratamientos ineficientes, innecesarios y/o de alta toxicidad (97).

Con los avances en la utilización de pruebas de biología molecular como es la secuenciación de genes específicos, se han descrito nuevas especies las cuales no son diferenciables morfológicamente a las antes reconocidas. A esto se suma la aparición de casos clínicos causados por estas especies crípticas, con lo cual se hace indispensable la correcta identificación de los aislamientos. Inclusive, alguna de estas especies presentan diferentes patrones de sensibilidad a los antifúngicos de uso convencional. Esto refuerza la necesidad de realizar una rápida y correcta identificación. La identificación de referencia a nivel de especie requiere de la aplicación de un enfoque polifásico que incluya estudios morfológicos, de crecimiento a distintas temperaturas y la secuenciación de al menos un gen con valor taxonómico y permite un control preciso de los resultados, pero es costosa, puede demorar hasta 20 días y no es fácilmente aplicable en los laboratorios del ámbito hospitalario ya que requiere disponibilidad de equipamiento y personal capacitado a tal fin. Por ello, técnicas como qPCR-HRM

permitirían establecer herramientas fácilmente transferibles de identificación rápida de estos organismos, sin depender de la derivación a centros de referencia, que podrían dedicarse a la confirmación y al control de calidad de estas técnicas. Esta herramienta permitiría mejorar el diagnóstico de los laboratorios, tanto en patologías de altísimo riesgo de muerte como la AI en pacientes neutropénicos, así como otras patologías de menor mortalidad como ABPA, asma, alergias y otras.

Hipótesis

En Argentina hay especies crípticas circulantes de la sección *Fumigati* distintas de *A. fumigatus* asociadas a aspergilosis invasora humana, sólo identificables a la luz de la información polifásica.

La qPCR-HRM es una herramienta de identificación válida para la identificación rápida de *Aspergillus* que permite diferenciar en 48-72 h los aislados de *A. fumigatus* de sus especies crípticas.

Objetivo

Objetivo primario

Conocer las especies de *A.* sección *Fumigati* circulantes en Argentina y desarrollar una herramienta de identificación rápida.

Objetivos secundarios

1. Analizar el origen de las muestras y enfermedades de base de los pacientes y comparar con la bibliografía disponible.
2. Identificar aislamientos de *A.* sección *Fumigati* circulantes en Argentina, aplicando el método polifásico de referencia.
3. Conocer los patrones de sensibilidad de los aislamientos seleccionados.
4. Desarrollar un método rápido de qPCR-HRM que permita reducir los tiempos de identificación de los aislados a nivel de especie.

Materiales y métodos

Cepas analizadas. Se analizaron los aislados de origen clínico y asociados a prácticas clínicas del género *A.* sección *Fumigati* derivados entre los años 1984 y 2019, desde distintos hospitales e instituciones médicas del país al Centro Nacional de Referencia de Micología Clínica, Departamento Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (I.N.E.I) “Dr. Carlos G. Malbrán” – Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (A.N.L.I.S). Se estudiaron un total de 356 aislados recuperados en cultivo de 315 pacientes (se incluyeron dos aislados clínico-ambientales, recuperados de insumos médicos asociados al cuidado del paciente).

Se incluyeron como controles la cepa de *A. fumigatus* DMic 093603 y las cepas obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC) de *A. fumigatus* ATCC 204305 y *A. udagawae* ATCC MYA-4691.

Todos los aislados fueron conservados en la Colección de Cultivos del Departamento Micología (DMic), en vapor de nitrógeno líquido en crioviales con solución acuosa de glicerol al 10%.

Examen morfológico y de crecimiento a 50 °C. Todos los aislados incluidos en este estudio fueron sometidos a un estudio de macro y micromorfología en agar Czapek-extracto de levadura (CYA: solución de Czapecck 1 %, sacarosa 3 %; extracto de levadura 0,5 %; K₂HPO₄ 0,1 %; ZnSO₄.7H₂O 0,001 %, CuSO₄.5H₂O 0,0005%, agar 2 %) luego de 7 días de incubación a 25 °C, y al ensayo de crecimiento a 50 °C en el mismo medio por 72 h. Esta última se utilizó como método de *screening* para la búsqueda de las especies diferentes de *A. fumigatus*. Se consideró presencia de desarrollo, ausencia o desarrollo dudoso (colonias de menos de 2 mm de diámetro), comparado con el obtenido en la cepa control *Aspergillus fumigatus* DMic 093603.

Todos los aislados con ensayo de crecimiento a 50°C negativo o dudoso y/o morfología atípica fueron subcultivados en patrón de tres puntos sobre CYA, agar extracto de malta (MEA: Extracto de malta 5 %, agar 1,5 %, ZnSO₄.7H₂O 0,001 % y CuSO₄.7H₂O 0,0005 %), y para los aislados que presentaron en cultivo el estado sexual se incluyó además

un repique en agar avena arrollada (OA: avena arrollada 3 %, agar 1,5 %, ZnSO₄.7H₂O 0,001 % y CuSO₄.7H₂O 0,0005 %). El diámetro de las colonias y otras características macroscópicas fueron estudiados luego de 7 días de incubación a 25 °C en oscuridad, también se incluyó otra placa de CYA a 37 °C (CYA37) para todos los aislados siguiendo las recomendaciones de Samson y cols. (12).

Las características microscópicas se determinaron haciendo montajes húmedos a partir de colonias en MEA y OA con azul de algodón-lactofenol y ácido láctico al 65 %, según Samson y cols. (12). Estos preparados luego se examinaron bajo microscopio óptico Leica DMF2500 (Leica Microsystems, Concord, Ontario). Las medidas de las estructuras y las microfotografías se obtuvieron con cámara fotográfica acoplada Leica DMC 2900 mediante el Software LAS 4.8 (Leica Microsystems, Concord, Ontario).

Métodos moleculares. Todos los aislados que no desarrollaron a 50°C y/o presentaron morfología atípica fueron identificados utilizando la información molecular de tres loci (ITS, *BenA* y *CaM*). Además, para los aislados de la serie *Viridinutantes*, se completó esta información con los loci que codifican para el factor de mantenimiento de minicromosomas (*minichromosome maintenance factor- Mcm7*) y la proteína de procesamiento pre-rARN (*pre-rRNA processing protein- Tsr1*) (33,98).

Extracción de ADN. A partir de cultivos incubados 72h a 25 °C en CYA, se prepararon suspensiones de conidios (10⁶ - 10⁸ conidios/ml). Se sembraron 50 µl de esas suspensiones en placas de Petri de 6 cm de diámetro con caldo MEY (1 % de extracto de malta, 0,4 % de extracto de levadura, 0,4 % de dextrosa, 4 ml / placa) y se incubaron a 25 °C entre 72h. El micelio se recogió estérilmente con una punta de pipeta, se secó completamente en papel estéril Whatman No. 2, y se transfirió a un tubo cónico de 50 ml, en el que se añadieron perlas de vidrio de 4 mm. El micelio se trituró colocándolo en nitrógeno líquido durante un minuto y agitándolo en vórtex a velocidad máxima durante 30 segundos, alternando estos dos pasos hasta la pulverización completa y homogénea del micelio seco. El polvo resultante se resuspendió en 800 µl de buffer de lisis (Tris-HCl

200 mM, NaCl 500 mM, EDTA 10 mM, SDS al 1 %) y 800 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se homogeneizó y, luego de repetir el último paso, se agregaron 500 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó 15 min a 14000 rpm, se le agregaron 300 μ l de isopropanol al sobrenadante, se centrifugó 10 min a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con 500 μ l de etanol al 70 % y se resuspendió en 100 μ l de agua desmineralizada estéril. Se agregaron 30 μ l de RNAsa 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), se incubó 1 h a 37 °C, se agregaron 30 μ l de Proteinasa K (0.2 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), se incubó 1 h a 55 °C y se repitió la extracción fenólica. Al sobrenadante se le agregaron 21 μ l de NaCl 5M y 800 μ l de etanol absoluto, se incubó 20 min a -20 °C y se centrifugó 10 min a 14000 rpm. Se secó el pellet a 65 °C, se resuspendió en 100 μ l de agua desmineralizada estéril y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Cuantificación de ADN. La cuantificación de ADN obtenido en el proceso de extracción se realizó mediante la utilización del espectrofluorómetro Qubit ® 3.0 fluorometer (Invitrogen by Life Technologies), según las indicaciones del fabricante.

PCR y Secuenciación. Se amplificaron mediante PCR las regiones parciales de los genes *BenA*, *CaM* e ITS (ITS1 - 5,8S - ITS2), en reacciones de 50 μ l. La amplificación de la región ITS se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción con MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 250 mM, TRIS-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, 2,5 U Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, CA), 0,2 μ M de los primer ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y 10 ng de ADN molde. La amplificación de *BenA* se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción con MgCl₂ 2 mM, dNTPs 250 μ M, ADN polimerasa Taq de 2,5 U (Invitrogen, Life Technologies, CA), 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, 0,2 μ M de los primer Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC- 3') y 10 ng de ADN molde. La amplificación de *CaM*, con los primer Cmd5 (5'- CCGAGTACAAGGARGCCTTC -3') y Cmd6 (5'-

CCGATRGAGGTCATRACGTGG -3'), se llevó a cabo utilizando la misma concentración de reactivos que *BenA*.

Para el gen *Mcm7* se utilizó una mezcla de reacción con MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 250 mM, TRIS-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, 2,5 U Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, CA), 0,5 µM de los primers MCM7-709F_Fum (5'-ACTCGTGTCTCGGACGTCAAACC- 3') y MCM7-1348R_Fum 5'-GATTGGCRACACCAGGATCACCCAT- 3') descriptos por Talbot y cols. (98), y 15 ng de ADN molde.

Para la amplificación del gen *Tsr1* se utilizaron los primers descriptos por Schmitt y cols. (99), Tsr1-1453for (5'- GARTTCCCIGAYGARATYGARCT- 3') y Tsr1-2308rev (5'-CTTRAARTAICCRTGIGTICC- 3') en una mezcla de reacción con MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 250 mM, TRIS-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, 2,5 U Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, CA), 0,5 µM de los primers y 15 ng de ADN molde.

La amplificación se llevó a cabo utilizando el Termociclador Applied Biosystems VeritiTM, y para los genes ITS, *BenA* y *CaM*, se realizó bajo las siguientes condiciones: una etapa de desnaturización inicial a 94 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturización a 94 °C durante 1 min, annealing a 55 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min, y una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 min. Para el gen *Mcm7* las condiciones de reacción fueron las siguientes: una etapa de desnaturización inicial a 94 °C durante 10 minutos, seguida de 38 ciclos de desnaturización a 94 °C durante 1 min, annealing a 56 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min, y una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 min. Las condiciones de reacción para el gen *Tsr1* fueron: una etapa de desnaturización inicial a 94 °C durante 10 minutos, seguida de 38 ciclos de desnaturización a 94 °C durante 1 min, annealing a 48 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min, y una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 min. En cada ensayo de PCR se incluyeron controles positivos y negativos. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, TAE 1X, durante 60 min a 100 V y se

visualizaron por tinción con solución NaCl 0,1 M con GelRed™ 1x (Biotium, Hayward, CA), bajo luz UV en un transiluminador Gel Logic 212 PRO (Carestream Health Inc., CT).

Todos los productos de PCR obtenidos se purificaron con el equipo Accuprep® PCR Purification Kit (Bioneer, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones utilizando los primers descritos anteriormente, utilizando el Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las indicaciones del fabricante, en un equipo 3500 ABI genetic analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron editadas usando Bioedit Sequence Alignment Editor V 7.0.4.1 e identificadas preliminarmente por similitud utilizando el algoritmo BLASTn (National Center for Biotechnology Information, Washington, DC) con parámetros ajustados automáticamente.

Análisis filogenético. Para el análisis filogenético se construyó un conjunto de datos basados en las secuencias obtenidas en este trabajo y las correspondientes a las cepas tipo aceptadas dentro de la sección *Fumigati* obtenidas de GenBank (anexo I), concatenando las secuencias de los tres marcadores estudiados (ITS, *BenA* y *CaM*). Se incluyeron también las secuencias correspondientes a la cepa *A. clavatus* NRRL1^T (T= cepa tipo) para enraizar la filogenia de la sección. Un segundo conjunto de datos se utilizó para estudiar los aislados pertenecientes a la serie *Viridinutantes*, incluyendo además en la concatenación las secuencias de *Mcm7* y *Tsr1*. En este subgrupo se utilizaron las secuencias de las especies aceptadas dentro de la serie y las correspondientes a *A. fumigatus* NRRL 163^T para enraizar en análisis.

Los locus se alinearon previamente a la concatenación con el algoritmo Muscle incorporado en Mega v6.1 (100) con los parámetros ajustados por defecto. La elección del modelo de sustitución se realizó con JModelTest (101) con el criterio AICc (criterio de información de Akaike corregido).

La reconstrucción filogenética bajo criterio de máxima verosimilitud (ML) se obtuvo por el programa Mega 6 sin particionar, utilizando todos los sitios y 1000 réplicas de bootstrap (BS).

La reconstrucción filogenética bajo inferencia bayesiana se obtuvo por el programa Mrbayes (102), considerando las particiones de forma independiente. Realizando 10 millones de generaciones en dos corridas de 6 cadenas y una frecuencia de muestreo de 1000, con un descarte de 25%.

Pruebas de sensibilidad *in vitro*.

Microdilución en caldo: Según las características morfológicas y el desarrollo a 50°C se seleccionó un grupo de aislados y se estudió su perfil de sensibilidad según el documento de referencia E.Def 9.4 del EUCAST. Se evaluó la sensibilidad *in vitro* de anfotericina B (AB), isavuconazol (ISA), itraconazol (IZ), voriconazol (VZ), posaconazol (PZ), terbinafina (TB), caspofungina (CAS), anidulafungina (AN) y micafungina (MZ) (Merck, Buenos Aires, Argentina). El rango de concentraciones evaluadas fue de 8 mg/L- 0,015 mg/L. Las placas se incubaron a 35 ± 2°C durante 48 h en atmósfera húmeda y en condición estática. Se realizaron lecturas visuales a las 24 y 48 h con la ayuda de un espejo de aumento. Para la AB, la TB y los azoles el punto de lectura se corresponde con el pocillo de la placa en el que se observa ≥90 % de inhibición del desarrollo comparado con el pocillo control de crecimiento y representa el valor de la CIM. Para las equinocandinas (EC) la lectura se realizó a las 24 h con ayuda de un microscopio de luz invertida y se determinó la Concentración Mínima Efectiva (MEC) que es la menor concentración de antifúngico que produce cambios morfológicos visibles en el crecimiento del hongo micelial al compararlo con el pocillo control de crecimiento (formación de agrupaciones de hifas cortas, de extremos redondeados, deformes). La interpretación categórica se realizó únicamente para las combinaciones antifúngicos/*A. fumigatus* que cuentan con puntos de corte clínicos definidos en el

documento Breakpoints versión 3.0 del EUCAST (50) (Tabla 2), mientras que no fue posible categorizar a las otras especies de la sección *Fumigati*.

Tabla 2. Puntos de corte clínicos (mg/ml) para *A. fumigatus* de distintas drogas antifúngicas. Adaptado del documento Breakpoint Version 3.0. (50).

Antifúngico	Puntos de corte (mg/L)	
	S≤	R>
Anfotericina B	1	1
Itraconazol	1	1
Isavuconazol	1	2
Posaconazol	0,125	0,25
Voriconazol	1	1
Anidulafungina	ND	ND
Caspofungina	ND	ND
Micafungina	ND	ND

S: sensible; R: resistente; ND: no determinado, datos insuficientes.

Se calculó la CIM50 y CIM90 (definidas como la CIM requerida para inhibir el crecimiento del 50% y 90% de los hongos en estudio), la media geométrica, moda, rango. Los controles de calidad fueron *Aspergillus flavus* ATCC 204304 y *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 y se incluyeron en todos los ensayos.

qPCR *CaM*- HRM:

Elección de la región. Se analizó la utilidad para esta técnica de las regiones ITS, y los genes parciales *CaM*, y *BenA* estudiadas. Para ello, se realizaron alineamientos de secuencias tipo de toda la sección *Fumigati*, incluyendo las secuencias obtenidas en este estudio y agregando secuencias de cepas de referencia *A. fumigatus* obtenidas de GenBank. Sobre estos alineamientos se analizaron por observación directa las regiones de alta variabilidad entre especies, pero conservadas dentro de *A. fumigatus*.

Se seleccionó un fragmento de 58 pares de bases (pb) sobre la secuencia del gen *CaM* y se diseñaron los primers *CaM-HRMf* (5'-ACCAAGGAATTGGGCACTGT-3') y *CaM-HRMr* (5'- GCTCTGACTCGGAAGGGTTCT- 3'), con el Software Primer 3 plus

(http://primer3plus.com/primer3web/primer3web_input.htm), una vez elegidos fueron evaluados en el programa Primer Express ® Software versión 3.0. (AppliedBiosystems) y se realizó un análisis “in silico” en la base de datos GenBank, utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Los primers diseñados se evaluaron por la metodología qPCR-HRM con el kit Melt Doctor® HRM- Master Mix (Applied Biosystem, CA) según las indicaciones del fabricante y se amplificaron en el termociclador Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA). Se probaron diferentes condiciones en la amplificación a modo de seleccionar la concentración de primers y de ADN fúngico adecuadas para la técnica. Se utilizó ADN genómico de las cepas de *A. fumigatus* DMic 093603 y *A. lentulus* DMic 093640 previamente cuantificadas y se realizaron diluciones seriadas en factor 10 a partir de 1,0 ng/μl hasta 0,001 ng/μl. También se probaron 3 concentraciones diferentes de primers de 0,4 μM, 0,5 μM y 0,6 μM. El ADN de los aislados de *A. sección Fumigati* analizados en este trabajo, más 18 muestras de ADN de *A. fumigatus*, 9 de otras especies de la sección *Fumigati* y 15 de otras especies de *Aspergillus* de otras secciones se incluyeron en el análisis de performance de la técnica qPCR-HRM (anexo II). Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se consideraron como resultados positivos de la amplificación los Cq menores a 40 ciclos. En todas las corridas de qPCR-HRM se incluyeron controles positivos (ADN de *A. fumigatus* Dmic 093603) y negativos, también por triplicado. Las curvas de melting se analizaron con el software *High Resolution Melt Software v 3.0* (Thermo Fisher Scientific). Se calcularon los promedios y la desviación estándar de las temperaturas de melting (Tm). Para determinar la significación estadística se usó la prueba T (T-test).

Resultados

Se analizaron 356 aislados pertenecientes a 315 pacientes, derivados para su identificación entre 1984 y 2019. Estos aislados fueron recuperados mayormente de esputo (37 %), LBA (19 %) y biopsia de pulmón (15 %). Otros sitios de recuperación incluyeron muestras oculares (raspados y biopsias), senos paranasales y biopsia de cerebro. En la figura 2 se muestran los porcentajes de recuperación de cada tipo de muestra. Sobre estos aislados, se verificaron sus caracteres morfológicos y la ausencia de crecimiento a 50 °C.

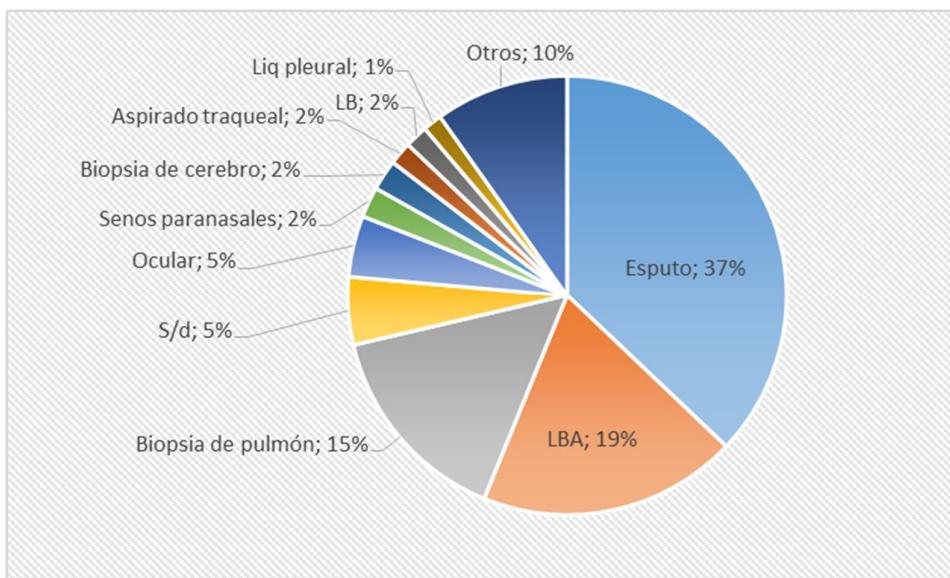


Figura 2: Porcentajes de recuperación de los 356 aislados estudiados según el tipo de muestra.

De los 356 aislados estudiados, 46 (12.9 %) aislados de 37 pacientes presentaron características anómalas para *A. fumigatus*: 37 (10,4 %) no presentaron desarrollo en la prueba de crecimiento a 50 °C; 7 (2 %) presentaron desarrollo dudoso y 2 (0,6 %) mostraron desarrollo a esta temperatura, pero su morfología mostró desviaciones cuando fueron comparadas con los controles. Además, se incluyeron dos aislados que habían sido recuperadas de pacientes con antecedentes de aislados de *A. sección Fumigati* con caracteres anómalos para *A. fumigatus*, las cepas DMic 195907 y DMic

216474, pertenecientes a los mismos pacientes que las cepas DMic 195908 y DMic 195904, respectivamente.

Identificación de los aislados estudiados

Los 48 aislados fueron sometidos al análisis polifásico y a los estudios de sensibilidad *in vitro*. Como controles se incluyeron las cepas DMic 093603 y las cepas ATCC antes mencionadas. Los datos epidemiológicos asociados a estos aislados se muestran en la

TABLA 3.

Tabla 3. Aislados de *A. sección Fumigati* con pruebas de 50°C negativas o dudosas y/o morfología aberrante.
*Morfología aberrante **sospecha de infección mixta

Pac.	Año	Nº de cultivo	Especie	Antecedentes	Muestra	50 °C
1	2013	DMic134377	<i>A. felis</i>	LLA	B. cerebral	neg
2	2013	DMic134555	<i>A. felis</i>	S/traumatismo	B. córnea	neg
3	2014	DMic154900	<i>A. fumigatiaffinis</i>	Corticoides	B. SP	neg
4	2014	DMic154904	<i>A. fumigatiaffinis</i>	EGC	LBA	neg
5	1984	DMic84049	<i>A. fumigatus</i>	s/d	s/d Secreción bronquial	dud
6	1995	DMic951741	<i>A. fumigatus</i>	s/d	s/d	dud*
7	1999	DMic993316	<i>A. fumigatus</i>	s/d	s/d	neg*
8	2000	DMic00293	<i>A. fumigatus</i>	s/d	Drenaje renal	neg
9	2000	DMic00371	<i>A. fumigatus</i>	VIH EPOC TBC	s/d	neg*
10	2008	DMic083241	<i>A. fumigatus</i>	FQ	Esputo	dud
11	2011	DMic114104	<i>A. fumigatus</i>	Episodio recidivante	Esputo	dud*
12	2015	DMic165183	<i>A. fumigatus</i>	TBC cavitada	B. pulmón	neg
13	2015	DMic165251	<i>A. fumigatus</i>	TBC cavitada	LB	dud
14	2018	DMic195899	<i>A. fumigatus</i>	TBC	LBA	pos*
15	2018	DMic195900	<i>A. fumigatus</i>	Ex TBC	Esputo	dud*
16	2018	DMic195907**	<i>A. fumigatus</i>	Cavernas	B. pulmón	pos
16	2018	DMic195908**	<i>A. fumigatus</i>	Cavernas	B. pulmón	neg
17	2017	DMic195913	<i>A. fumigatus</i>	TBC cavitada	Esputo	dud
18	2015	DMic175537	<i>A. fumigatus</i>	TBC	LBA	pos*
19	2018	DMic216474**	<i>A. fumigatus</i>	Bronquitis crónica	Esputo	pos
20	2001	DMic01642	<i>A. hiratsukae</i>	s/d	s/d	neg
21	2012	DMic134280	<i>A. hiratsukae</i>	Nódulos pulmonares	B. pulmón Bolsa sc. de dextrosa	neg
22	2016	DMic165344	<i>A. hiratsukae</i>	s/d		neg
23	2018	DMic195905	<i>A. hiratsukae</i>	Neumonía	Esputo	neg
24	2018	DMic195906	<i>A. hiratsukae</i>	FQ	Esputo	neg
25	2018	DMic216415	<i>A. hiratsukae</i>	FQ	Esputo	neg
26	2009	DMic093640	<i>A. lentulus</i>	Trasplante renal	LBA	neg
27	2011	DMic114054	<i>A. lentulus</i>	s/d	LBA	neg
28	2017	DMic175587	<i>A. lentulus</i>	Neumonía	LBA	neg

19	2018	DMic195904**	<i>A. lentulus</i>	Bronquitis crónica	Esputo	neg
29	2019	DMic195912	<i>A. lentulus</i>	EPOC	Esputo	neg
30	2019	DMic196112	<i>A. lentulus</i>	Trasplante renal	Absceso pleural	neg
31	2012	DMic134305	<i>A. thermomutatus</i>	Cirugía cataratas	B. córnea	neg
31	2012	DMic134306	<i>A. thermomutatus</i>	Cirugía cataratas	B. retina Cultivo células mesenquimáticas	neg
32	2018	DMic195902	<i>A. turcosus</i>	s/d		
33	1998	DMic982945	<i>A. udagawae</i>	VIH	LBA	neg
34	2006	DMic062877	<i>A. udagawae</i>	EGC	B. pulmonar	neg
34	2006	DMic062878	<i>A. udagawae</i>	EGC	Piel	neg
34	2006	DMic062879	<i>A. udagawae</i>	EGC	B. pulmón	neg
34	2006	DMic062881	<i>A. udagawae</i>	EGC	Piel	neg
34	2006	DMic062882	<i>A. udagawae</i>	EGC	Hemocultivo	neg
35	2008	DMic083397	<i>A. udagawae</i>	Inmunosuprimido	Humor vitreo	neg
36	2009	DMic093518	<i>A. udagawae</i>	Antec. pulmonares	Hisopado nasal	neg
36	2009	DMic093519	<i>A. udagawae</i>	Antec. pulmonares	B. SP	neg
36	2009	DMic093520	<i>A. udagawae</i>	Antec. pulmonares	B. SP	neg
37	2013	DMic134311	<i>A. udagawae</i>	LNH VIH	B. pulmón	neg
38	2018	DMic195910	<i>A. udagawae</i>	EGC- 2do TMO	B. pulmón	neg
39	2019	DMic195911	<i>A. udagawae</i>	EGC	LBA	neg

LLA: leucemia linfoides aguda; B. biopsia; SP: senos paranasales; EGC: Enfermedad granulomatosa crónica; LBA: lavado broncoalveolar; s/d: sin datos; VIH: virus inmunodeficiencia humana; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; FQ: fibrosis quística; TBC: tuberculosis; LB: lavado bronquial; LNH: Linfoma no Hodgkin; TMO: trasplante médula ósea; Antec.: antecedentes; neg: negativo; pos: positivo; dud: dudoso.

Se analizaron regiones de 481 pb para ITS, 480 pb para *BenA* y 565 pb para *CaM* con un total de 1526 caracteres para los tres loci. Para la reconstrucción filogenética bajo criterio de máxima verosimilitud se utilizó el modelo Kimura dos parámetros con distribución gamma y sitios invariables. Bajo el criterio bayesiano cada gen fue considerado como una partición independiente utilizando Kimura dos parámetros con distribución gamma y sitios invariables para cada partición. En la figura 3 se muestra la reconstrucción filogenética de Máxima verosimilitud con los valores de soporte (BS) mayores a 75% y los valores asociados de probabilidad a posteriori (PP) mayores a 0.95. Los aislados estudiados se ubicaron en 4 de las 8 series aceptadas para la sección *Fumigati* y formando clados monofiléticos bien soportados y robustos con 8 especies de las 59 incluidas en la sección.

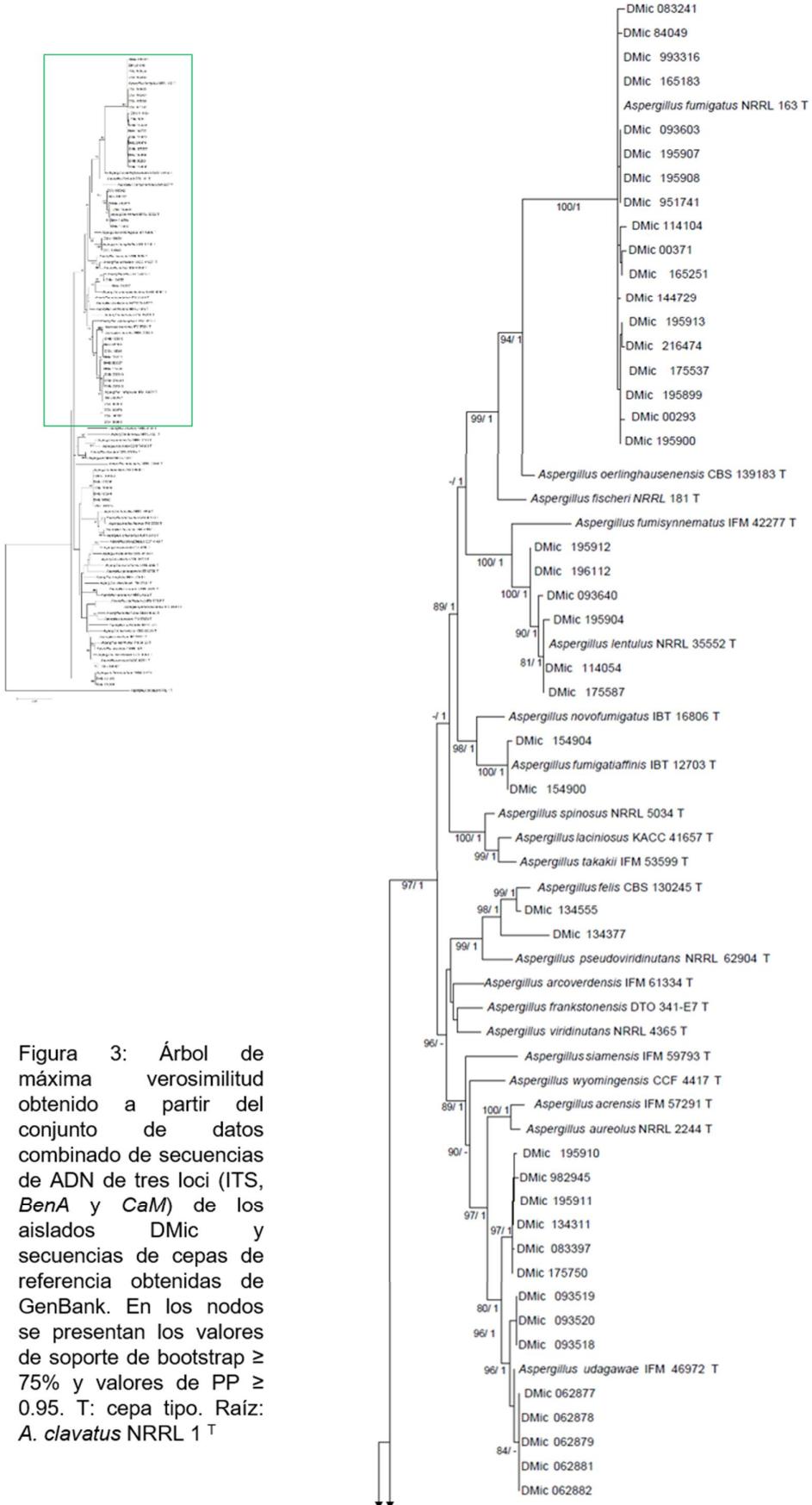
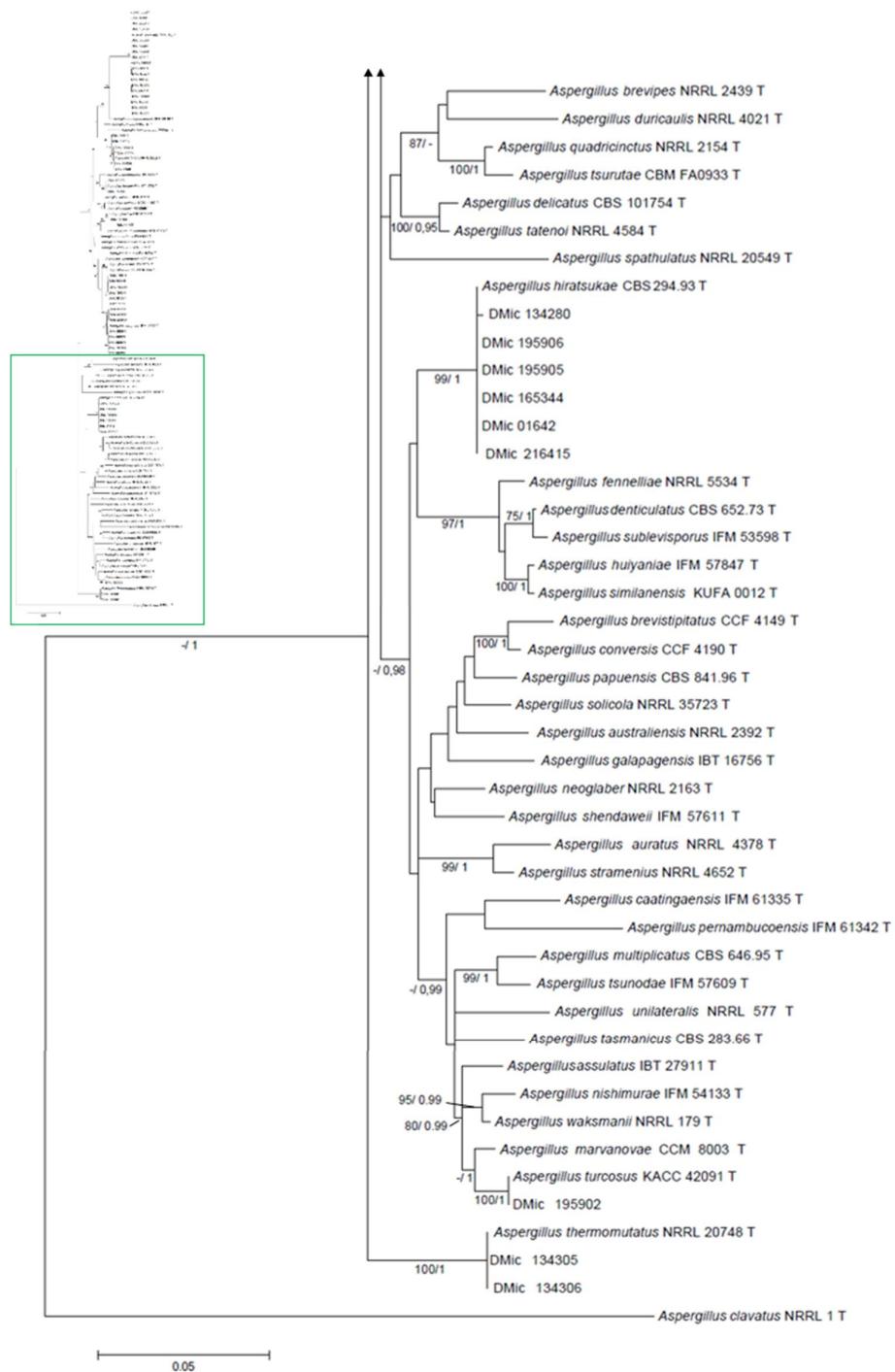


Figura 3: Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir del conjunto de datos combinado de secuencias de ADN de tres loci (ITS, BenA y CaM) de los aislados DMic y secuencias de cepas de referencia obtenidas de GenBank. En los nodos se presentan los valores de soporte de bootstrap $\geq 75\%$ y valores de PP ≥ 0.95 . T: cepa tipo. Raíz: *A. clavatus* NRRL 1^T

Figura 3. Continuación



Para los aislados DMic 134377 y 134555, pertenecientes a la serie *Viridinutantes* se analizaron regiones de 480 pb para ITS, 460 pb para *BenA*, 539 pb para *CaM*, 441 pb para *Mcm7* y 755 pb para *Tsr1* con un total de 2675 caracteres para los cinco loci. En

en este análisis se incluyeron las secuencias de la cepa *A. felis* NRRL 62900 (ex tipo de *A. parafelis*) y la cepa *A. felis* NRRL 62903 (ex tipo de *A. pseudofelis*) con el fin de comprender la variabilidad genética dentro de la especie *A. felis*. Para la reconstrucción filogenética bajo criterio de máxima verosimilitud se utilizó el modelo general de tiempo reversible con distribución gamma. Bajo el criterio bayesiano cada gen fue considerado como una partición independiente utilizando: Kimura dos parámetros con sitios invariables para *CaM*, *BenA* y *Mcm7*; Hasegawa-Kishino-Yano con sitios invariables para ITS y con sitios invariables y distribución gamma para *Tsr1*. En la figura 4 se muestra la reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud con los valores de soporte mayores a 75 % (BS) y los valores asociados de probabilidad a posteriori (PP) mayores a 0.95.

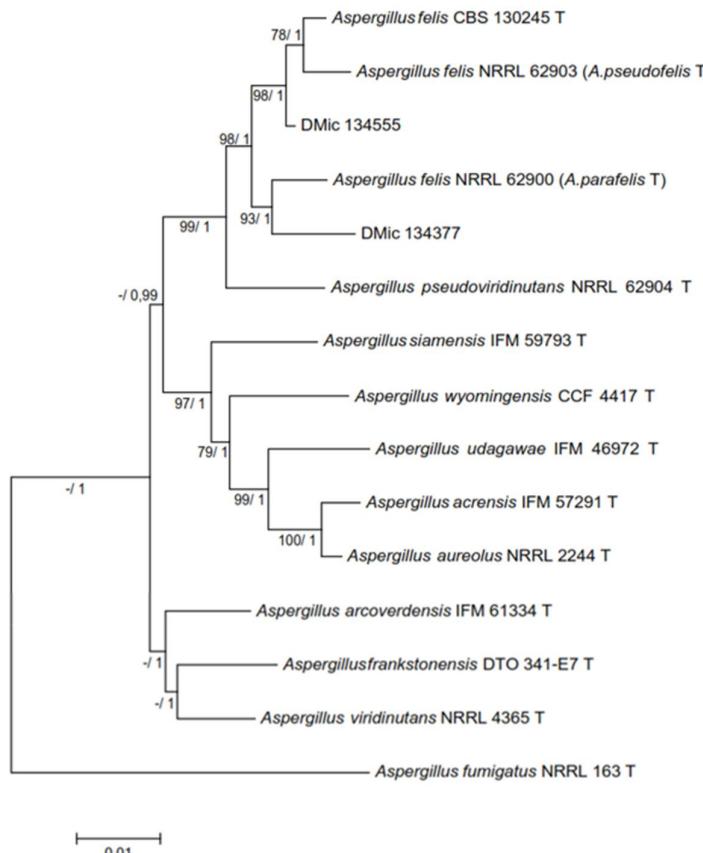


Figura 4: Serie *Viridinutantes*. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir del conjunto de datos combinado de secuencias de ADN de cinco loci (ITS, *BenA* y *CaM*, *Tsr1* y *Mcm7*) de los aislados DMic y secuencias de cepas de referencia obtenidas de GenBank. En los nodos se presentan los valores de BS $\geq 75\%$ y valores de PP ≥ 0.95 . T: cepa tipo. Raíz: *A. fumigatus* NRRL 163 T.

Las secuencias de todos los marcadores estudiados se analizaron filogenéticamente como conjuntos de datos separados y combinados.

Dentro de los 48 aislados estudiados, 16 fueron identificados como *A. fumigatus* por los datos moleculares, mientras que los restantes 32 (9% de 356 aislados estudiados) fueron clasificados como *A. sección Fumigati no fumigatus*. Entre estos últimos, se identificaron 13 aislados (7 pacientes) de *A. udagawae*, 6 aislados (6 pacientes) de *A. lentulus*, 2 aislados (2 pacientes) de *A. fumigatiaffinis*, 2 aislados (2 pacientes) de *A. felis*, 6 aislados (5 pacientes y 1 ambiental) de *A. hiratsukae*, 2 aislados (1 paciente) de *A. thermomutatus* y 1 aislado (clínico-ambiental) de *A. turcosus*. En total fue posible estimar la frecuencia de los *A. sección Fumigati no A. fumigatus* en un 8% (25 pacientes) de los 315 pacientes estudiados.

A continuación, se describen los principales caracteres morfológicos y los resultados del análisis filogenético de cada una de las especies estudiadas.

Aspergillus felis Barrs, van Doorn, Varga & Samson, PLoS ONE 8(6): e64871, 2013.

FIGURA 5

Colonias en CYA, 40 - 57 mm, flocosas, blancas, levemente surcadas en la zona central, con poca esporulación que se presenta como una coloración verde claro hacia los márgenes de la colonia luego de 10 días; reverso color crema. En CYA37 colonias de crecimiento rápido, aterciopeladas, blancas a verde grisáceo, reverso color claro. Desarrollo ausente a 50 °C. En MEA, colonias de 54 - 68 mm aterciopeladas con abundante esporulación verde azulada; reverso claro a crema. No presenta pigmentos difusibles ni exudados. Cabezas aspergilares columnares cortas. Conidióforos uniseriados con estípites lisos y subclavados, presenta algunas cabezas inclinadas. Vesículas subglobosas a subclaviformes de 11,8 - 13,9 µm de ancho cubierta con fiáldes ampuliformes en su mitad superior. Conidios verdes subesféricos, 2,0 - 2,7 µm, finamente rugosos.

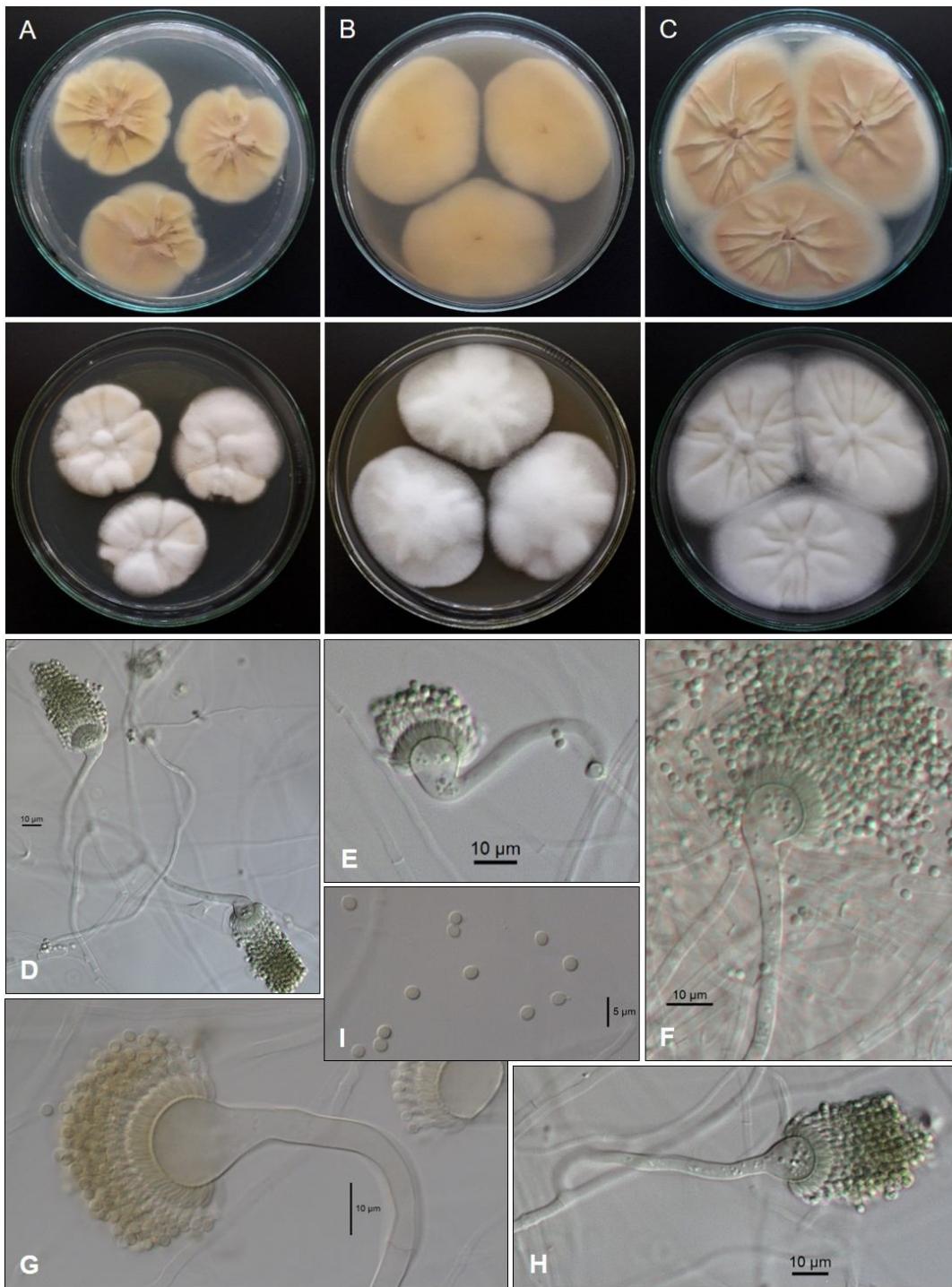


Figura 5: *Aspergillus felis*. Columnas A-B. Colonias 7 días a 25 °C. A. CYA. B. MEA. Columna C. Colonias 7 días CYA37. D-H. Conidióforos. I. Conidios.

Materiales examinados: DMic 134377 y DMic 134555. El aislado DMic 134377 fue recuperado de biopsia cerebral de paciente femenina de 25 años con leucemia linfoides aguda. El aislado DMic 134555 proviene de un absceso de córnea de 2 meses de

evolución, de paciente masculino de 66 años que no refirió antecedentes de traumatismo previo.

Observaciones: ambos aislados presentaron desarrollo de colonias con características similares a las descriptas para la especie, aunque la cepa DMic 134377 presentó colonias de mayor tamaño y mayor esporulación que la DMic 134555. Con respecto a las características micromorfológicas, los aislados presentaron vesículas más pequeñas que las descriptas para la especie (15 - 16.5 μm) y conidios de mayor tamaño (1.5 – 2.5 μm).

El análisis filogenético de estos dos aislados demostró que ambos pertenecen al clado de *A. felis* con BS de 98 y PP de 1 (figura 3) separándose de la especie más cercana *A. pseudoviridinutans*. En el año 2014 dentro de este clado se habían descripto tres nuevas especies (33), 2 de las cuales fueron sinonimizadas bajo *A. felis*. en publicaciones posteriores (98,103). El análisis filogenético realizado para la serie *Viridinutantes* (figura 4) confirmó la pertenencia de estos aislados al clado de *A. felis* con un BS de 98 y una PP de 1, con la variabilidad intra especie ya descripta por estos autores para esta especie.

***Aspergillus fumigatiaffinis* S.B. Hong, Frisvad & Samson, Mycologia 97 (6): 1326, 2005. FIGURA 6**

Colonias en CYA, 45 - 48 mm, blancas, surcadas, exudado claro; reverso castaño claro a naranja pálido. Esporulación asexual escasa. En CYA37 67 - 72 mm, colonias de desarrollo rápido y abundante esporulación que le dan un aspecto flocoso, color verde azulado claro. Desarrollo ausente a 50 °C. En MEA, 55 - 62 mm, blancas con sectores verde azulados debido al anamorfo, flocosas, levemente elevadas, sin presencia de pigmentos difusibles ni exudado. Esporulación asexual media a abundante. Cabezas aspergilares columnares cortas. Conidióforos lisos que suelen presentar algún septo. Vesículas globosas a subglobosas, 13,5 - 22 μm , uniseriadas cubierta por fiálide en la mitad superior. Conidios lisos, globosos a subglobosos, 2,6 - 3 μm diam.

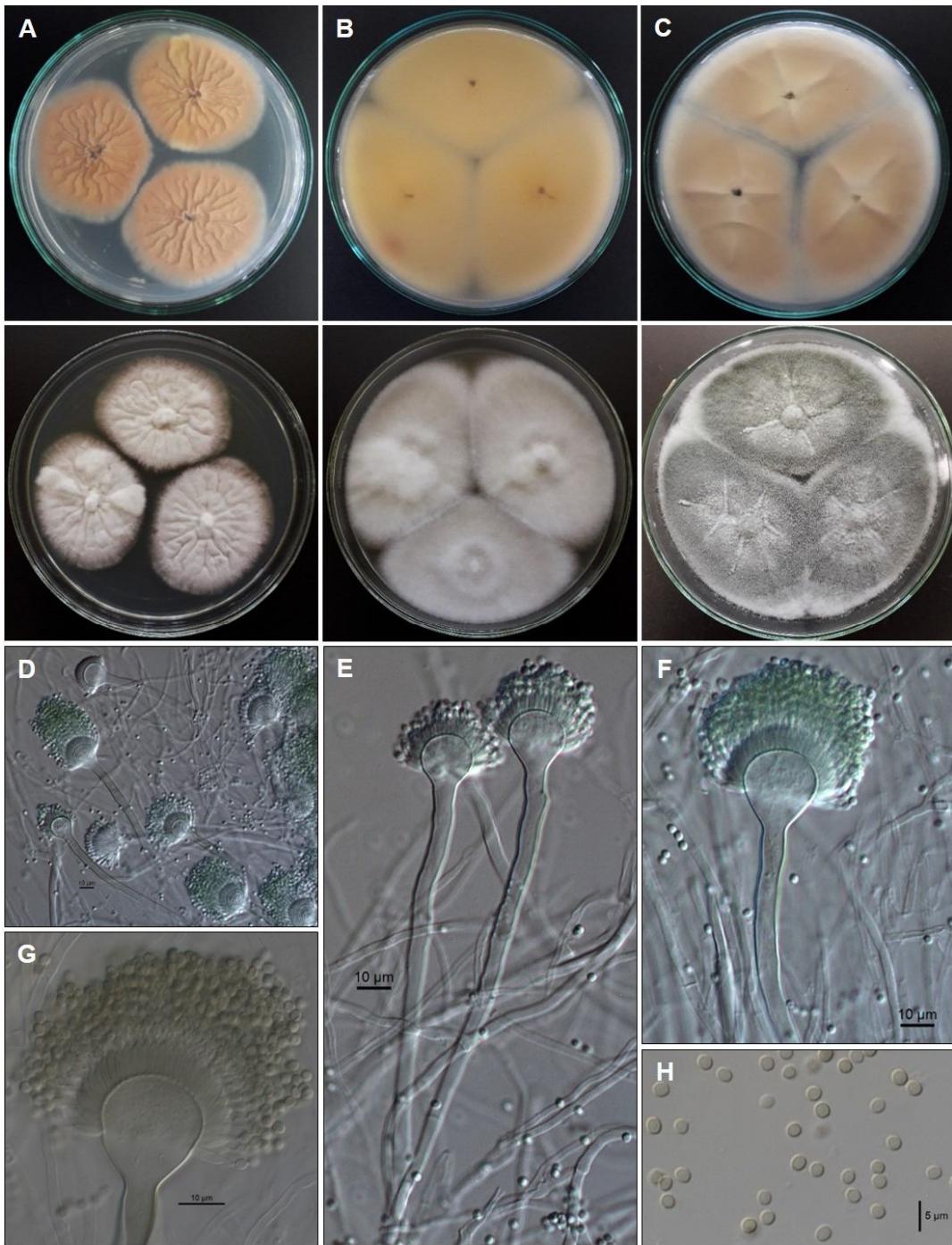


Figura 6: *Aspergillus fumigatiaffinis*. Columnas A-B. Colonias 7 días a 25°C. A. CYA. B. MEA. Columna C. Colonias 7 días CYA37. D-G. Conidióforos. H. Conidios.

Materiales examinados: DMic 154900 y DMic 154904. El aislado DMic 154900 proviene de una biopsia de senos maxilares de paciente femenina (sin datos de edad), con antecedentes de artritis reumatoidea y tratamiento con corticoides. El aislado DMic

154904 fue recuperado de una muestra de LBA de paciente masculino de 9 años, con EGC.

Observaciones: las colonias en CYA y MEA presentaron características compatibles con las descriptas para *A. fumigatiaffinis*, aunque el aislado DMic154900 presentó menor esporulación en cultivo. La identificación presuntiva de ambos aislados se basó en los aspectos morfológicos que caracterizan a esta especie: vesículas globosas a subglobosas de 18-24 μm , conidios lisos de 2 – 3 μm y no desarrollo a 50 °C.

Nuestros aislados formaron un clado monofilético bien soportado y robusto con la cepa tipo de *A. fumigatiaffinis* con un BS de 100 y una PP de 1 (Figura 3), separándose de *A. novofumigatus*, la especie más cercana.

***Aspergillus fumigatus* Fresenius, Beitr. Mykol. 81: 18,1863. FIGURA 7**

Colonias en CYA, 36 - 67 mm, velutinosa a flocosa, densamente tapizada por conidióforos, color verde azulado intenso, con escaso micelio aéreo. Reverso crema a amarillo pálido. Desarrollo abundante a 50 °C. En CYA37, 60 – 75 mm, abundante esporulación y ausencia de micelio aéreo. En MEA, 25 – 69 mm, flocosa color verde azulado y mayor presencia de micelio aéreo. Reverso crema a levemente tostado. Sin presencia de pigmentos difusibles ni exudado. Cabezas aspergilares columnares largas. Conidióforo uniseriado de pared lisa que presenta leve pigmento verdoso en el extremo superior. Vesículas subclaviformes a piriformes, 18 – 25 mm. Conidios subesféricos, 2,3 – 3,5 μm , finamente rugosos.



Figura 7: *Aspergillus fumigatus*. Columnas A-B. Colonias 7 días a 25°C. A. CYA. B. MEA. Columna C. Colonias 7 días CYA37. D-G. Conidióforos. H-I. Conídios.

Materiales examinados: DMic 093603, DMic 144927 (ATCC2 204305), DMic 195907 y DMic 216474.

***Aspergillus fumigatus* con morfología aberrante** Fresenius, Beitr. Mykol. 3: 81, 1863.

FIGURAS 8 y 9

En este subgrupo de *A. fumigatus* se ubicaron todos los aislados que por alguna razón no cumplieron con los parámetros morfológicos descriptos para la especie, ya sea por las características observadas en las colonias y/o la ausencia de desarrollo a 50 °C y/o por los caracteres micromorfológicos (Tabla 3). Las cepas citadas en los materiales examinados reúnen un conjunto de características morfológicas que las relacionan en sentido amplio con la sección *Fumigati* pero aun así estas características no son suficientes para asignar las especies.

Se observó desarrollo de colonias restrictas de aspecto algodonoso, con escasa esporulación como pudo verse en los aislados DMic 951741, 993316, 00371 y 114104; pero también colonias flocosas, con parches de mayor esporulación como en los aislados 165183, 195899, 195900 y 195913, característica que se mantuvo a pesar de realizar cultivos monospóricos para descartar posibles contaminaciones. También se observaron diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento, aislados con colonias de menos de 35 mm de diámetro (DMic 993316, 114104, 165653 y 175537) en comparación con colonias de 60-65 mm que se observó en los *A. fumigatus* incluidos como control. Con respecto a las características micromorfológicas estudiadas, los aislados presentaron variaciones en cuanto a la forma y tamaño de la vesícula (globosas con constricción en la base o largas y claviformes), aspecto del estípite (sinuoso y septado), el largo de las fiálide (fiálide muy largas con septos y en otros fiálide muy cortas) y forma y tamaño de los conidios (subglobosos a elipsoidales, de pared lisa o rugosa). En las figuras 8 y 9 se muestran las variaciones morfológicas más relevantes.

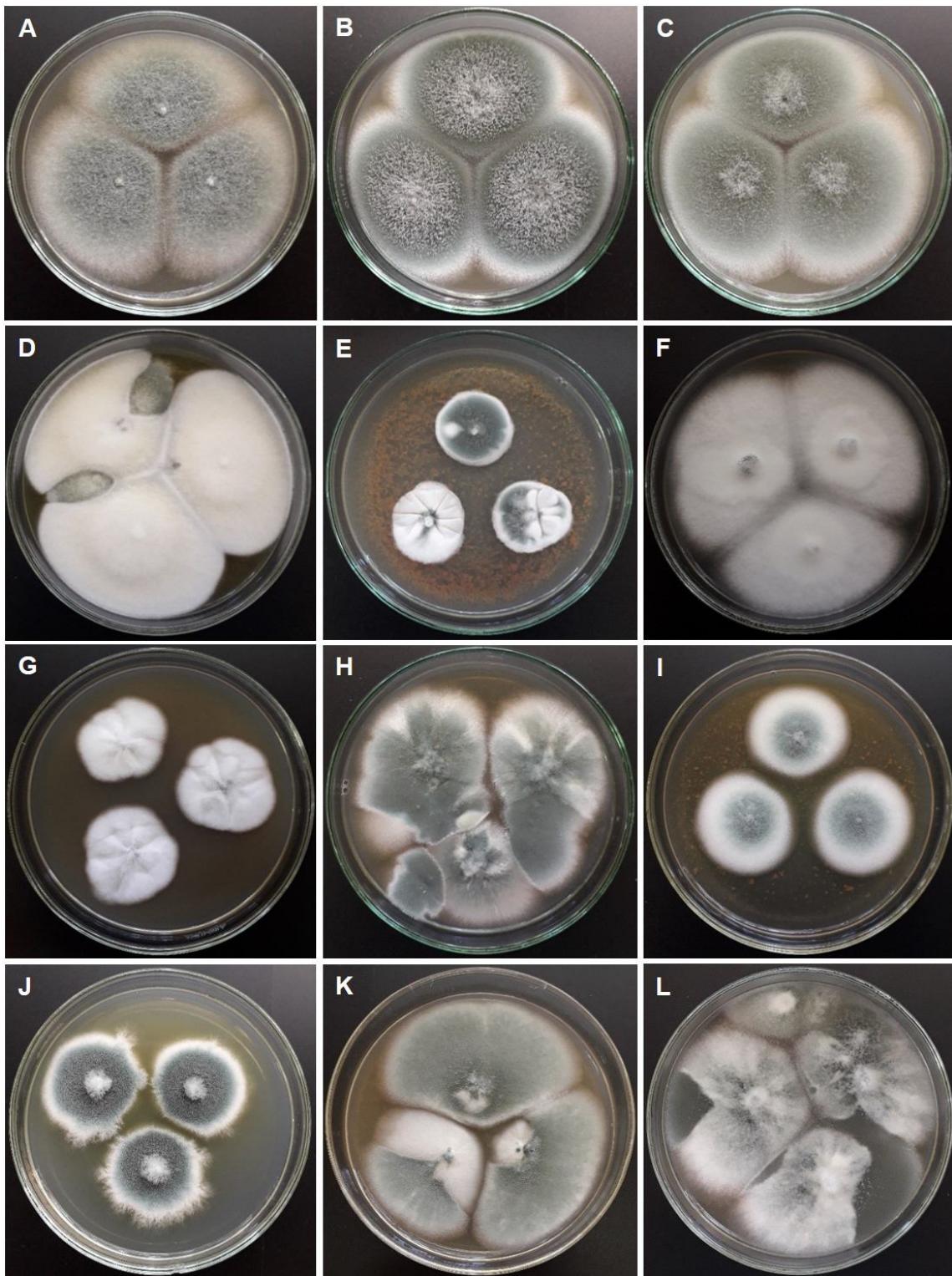


Figura 8: *Aspergillus fumigatus*. Colonias en MEA 7 días a 25 °C. A. DMic 144729 (ATCC 204305). B. DMic 093603. C. DMic 84049. D. DMic 951741. E. DMic 993316. F. DMic 00371. G. DMic 114104. H. DMic 165183. I. DMic 165251. J. DMic 175537. K. DMic 195900. L. DMic 195913.

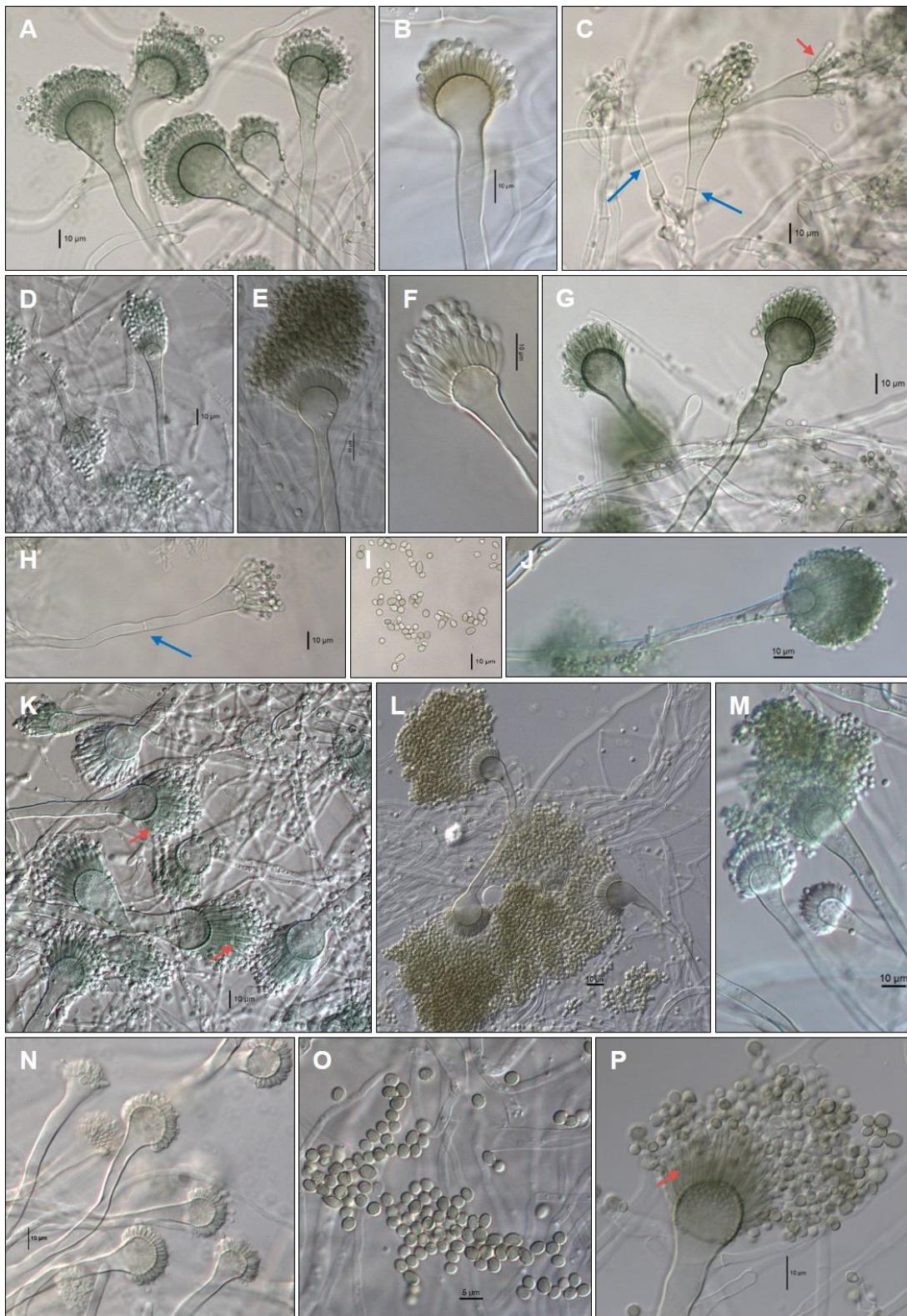


Figura 9: *Aspergillus fumigatus*. A- H, J- N y P. Conidióforos. I y O. Conidios. A. DMic 093603. B. DMic 195913. C. DMic 165251. D. DMic 00371. E. DMic 951741. F. DMic 00293. G. DMic 165183. H. DMic 083241. I. DMic 165251. J. DMic 195908. K. DMic 165183. L. DMic 951741. M. DMic 195899. N. DMic 144104. O. DMic 195913. P. DMic 165183. Flechas azules: estípites septados. Flechas rojas: fiáldes largas septadas.

Materiales examinados: DMic 84049, DMic 951741, DMic 993316, DMic 00293, DMic 00371, DMic 083241, DMic 114104, DMic 165183, DMic 165251, DMic 175537, DMic 195899, DMic 195900, DMic 195908 y DMic 195913. Estos 14 aislados fueron recuperados en su mayoría desde muestras respiratorias (10/14), sólo uno desde un drenaje renal y de los 3 restantes se desconoce la muestra de origen, aunque el aislado DMic 00371 pertenece a un paciente con antecedentes de TBC y EPOC. De los pacientes (7 femeninos, 5 masculinos y 2 sin datos), 10 presentaban antecedentes de enfermedad pulmonar (TBC, EPOC y FQ).

Observaciones: la identificación definitiva de estos aislados con morfología aberrante pudo confirmarse mediante el análisis filogenético realizado, todos los aislados se ubicaron en un clado monofilético robusto y bien soportado con la cepa tipo de *A. fumigatus*, con un BS de 100 y una PP de 1, separándose de las especies más cercanas *A. oerlinghausenensis* y *A. fischeri*.

***Aspergillus hiratsukae* Udagawa, Tsubouchi & Horie - Trans. Mycol. Soc. Japan 32: 23, 1991. FIGURAS 10 y 11**

Colonias en CYA, 37 - 42 mm, de color blanca, velutinosa, surcada radialmente, reverso crema a tostado. Esporulación asexual escasa. En CYA37, 46 - 50 mm, plegada con surcos radiales y concéntricos, color blanco grisáceo, reverso crema a tostado. Desarrollo ausente a 50 °C. En MEA 55 - 60 mm, de color blanco grisáceo, velutinosa a granular debido a la presencia de ascomas cleistoteciales; reverso color crema. Esporulación asexual moderada. En OA, 25 - 30 mm, blancas, granulosas debido a la abundante producción de ascomas, esporulación asexual muy escasa; reverso claro. Ascomas cleistoteciales globosos, blanquecinos a crema pálido, 120 – 350 µm, cubiertos por una red laxa de hifas hialinas, peridio delgado pseudoparenquimatoso. Ascospores globosos a subglobosos, evanescentes, 11 – 14 µm, con 8 esporas. Ascosporas hialinas, subglobosas a lenticulares, 6,0 - 7,5 x 4 - 5 µm (incluyendo las crestas), presentan 2 crestas ecuatoriales muy próximas entre sí y superficies convexas

finamente reticuladas. Cabezas aspergilares columnares, cortas. Vesículas en forma de matraz, fértiles en la mitad superior, 14 - 21 μm , uniseriadas. Conidios lisos a finamente rugosos, globosos a subglobosos, 2 - 2,4 μm .



Figura 10: *Aspergillus hiratsukae*. Columnas A-B. Colonias 7 días a 25 °C. A. CYA. B. MEA. Columna C. Colonias 7 días CYA37. D. OA 10 días 25°C, con mayor aumento se aprecian cleistotecios blanquecinos en desarrollo. E. Cleistotecio. F-G. Ascos (flecha azul) y ascosporas (flecha roja) con dos crestas ecuatoriales muy cercanas y pared finamente reticulada. H. Detalle pared del cleistotecio. I. Conidios. J. Conidióforo.

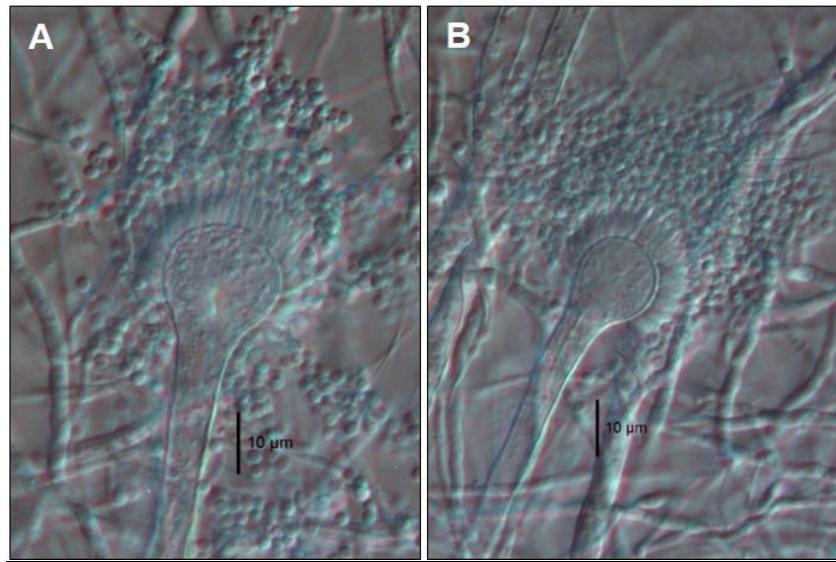


Figura 11: *Aspergillus hiratsukae*. A-B. Conidióforos.

Materiales examinados: DMic 01642, DMic 134280, DMic 165344, DMic 195905, DMic 195906 y DMic 216415. El aislado DMic 01642 fue derivado a la institución para su identificación en el año 2001 y sin datos de su origen. El aislado DMic 134280 fue aislado de una biopsia de nódulos pulmonares de un paciente masculino, de 39 años de edad, ex tabaquista. La cepa DMic 165344 fue recuperada de una solución de dextrosa que estaba siendo administrada por vía parenteral a una paciente, la cual no refirió signos de infección por el agente. Los aislados DMic 195905, 195906 y 216415 fueron recuperados de muestras de esputo inducido de pacientes pediátricos con antecedentes de enfermedad pulmonar como neumonía (DMic 195905) y fibrosis quística (DMic 195906 y 216415) de 2 años, 10 años y 1 año de edad respectivamente.

Observaciones: los aislados estudiados pudieron ser identificados presuntivamente bajo esta especie debido a sus características morfológicas, especialmente debido a las ascosporas finamente reticuladas que presentaron dos crestas ecuatoriales muy juntas. En general la aparición de los cleistotecios en cultivo ocurrió dentro de la primera semana de incubación, aunque para la cepa DMic 01642 fue necesario extender el tiempo de cultivo hasta 14 días para obtener los ascomas maduros.

Nuestros aislados formaron un clado monofilético bien soportado y robusto con la cepa tipo de *A. hiratsukae* con un BS de 99 y una PP de 1 (Figura 3), separándose del clado hermano que incluye a especies cercanas como *A. fennelliae*, *A. denticulatus*, entre otras.

***Aspergillus lentulus* Balajee & K.A. Marr, Eukaryotic Cell 4(3): 631, 2005. FIGURA 12**

Colonias en CYA, 29-53 mm, de color blanca con bordes ligeramente azulados, velutinosas, surcadas, exudado ausente; reverso castaño claro. Esporulación asexual escasa. En CYA37 65 - 72 mm, de color blanca grisácea, presenta exudado color claro, reverso tostado a anaranjado. Desarrollo ausente a 50 °C. En MEA, 46 - 58 mm, de color blanco con sectores verde azulados debido al anamorfo, velutinosas, elevadas; reverso de color marrón anaranjado. Esporulación asexual abundante. Cabezas aspergilares columnares cortas. Conidióforos lisos con estípites sinuosos que presentan una constricción inmediatamente debajo de la vesícula. Vesículas globosas a piriformes, 9,8 - 20 μ m, uniseriadas. Conidios lisos a finamente rugosos, subglobosos a elipsoidales de 2,4 - 3,2 μ m.



Figura 12: *Aspergillus lentulus*. Columnas A-B. Colonias 7 días a 25 °C. A. CYA. B. MEA. Columna C. Colonias 7 días CYA37. D-H. Conidióforos. I. Conidios.

Materiales examinados: DMic 093640, DMic 114054, DMic 175587, DMic 195904, DMic 195912 y DMic 196112. El aislado DMic 093640 fue recuperado de muestras de LBA de una paciente femenina de 43 años de edad con antecedentes de hipertensión arterial, enfermedad renal crónica e inmunosupresión por trasplante renal. Este fue el primer

caso clínico confirmado de esta especie en Argentina y fue publicado por Montenegro y cols. en el año 2009. El aislado DMic 114054 proviene de una muestra de LBA de paciente masculino, sin datos de edad ni antecedentes clínicos. El aislado DMic 175587 fue recuperado de un LBA de una paciente femenina de 74 años sin datos de antecedentes epidemiológicos. El aislado DMic 195904 fue recuperado de una muestra de esputo junto con el *A. fumigatus* DMic 216474. Pertenecen a una paciente femenina de 61 años con antecedentes de bronquitis pulmonar crónica. La cepa DMic 195912 fue aislada de una muestra de esputo de una paciente femenina de 75 años con EPOC. El aislado DMic 196112 pertenece a un paciente masculino, de 27 años de edad trasplantado renal y la cepa fue recuperada de un absceso pleural.

Observaciones: los aislados presentaron características morfológicas que permitieron ubicarlas presuntivamente bajo esta especie. Las diferencias observadas estuvieron relacionadas con la velocidad de crecimiento y los diferentes patrones de esporulación de cada aislado, pero todas se ubicaron dentro de los rangos esperados. La caracterización hecha por Balajee y cols. al proponer la especie, describe los conidios como rugosos (52), aunque nuestros aislados presentaron conidios finamente rugosos bajo el microscópico óptico, coincidiendo con la descripción de Samson y cols.(32). Nuestros aislados formaron un clado monofilético bien soportado y robusto con la especie tipo de *A. lentulus* con un BS de 100 y una PP de 1, separándose de *A. fumisynnematus*, la especie más cercana (Figura 3).

Aspergillus thermomutatus Peterson S.W., Mycological Research 96: 549, 1992.

FIGURA 13

Colonias en CYA, 60 - 66 mm, de color blanca a crema, velutinosa, surcada radialmente, reverso crema a tostado. Esporulación asexual escasa. En CYA37, 65 - 75 mm, plegada con surcos radiales y concéntricos, color blanco grisáceo, reverso crema a tostado. Desarrollo ausente a 50 °C. En MEA 72 - 74 mm, de color blanco grisáceo, velutinosa a granular debido a la presencia de ascomas cleistoteciales; reverso color crema.

Esporulación asexual moderada. En OA, 45 - 53 mm, blancas, farinosa a granulosas debido a la producción de ascomas, esporulación asexual muy escasa; reverso claro a ocráceo. Ascomas cleistoteciales globosos, blanquecinos a rosados, 146 – 278 μm , cubiertos por una red laxa de hifas hialinas, peridio delgado pseudoparenquimatoso. Ascospores globosos a subglobosos, evanescentes, 10,7 – 12,1 μm , con 8 esporas. Ascosporas hialinas, subglobosas, 7,7 - 7,9 x 4,3 - 5 μm (incluyendo las crestas), presentan 2 crestas ecuatoriales prominentes y flexuosas, las superficies convexas presentan proyecciones triangulares. Cabezas aspergilares columnares. Vesículas subglobosa, fértiles en la mitad superior, 8- 12 μm , uniseriadas. Conidios lisos, globosos a subglobosos, 2,8 – 3,1 μm .

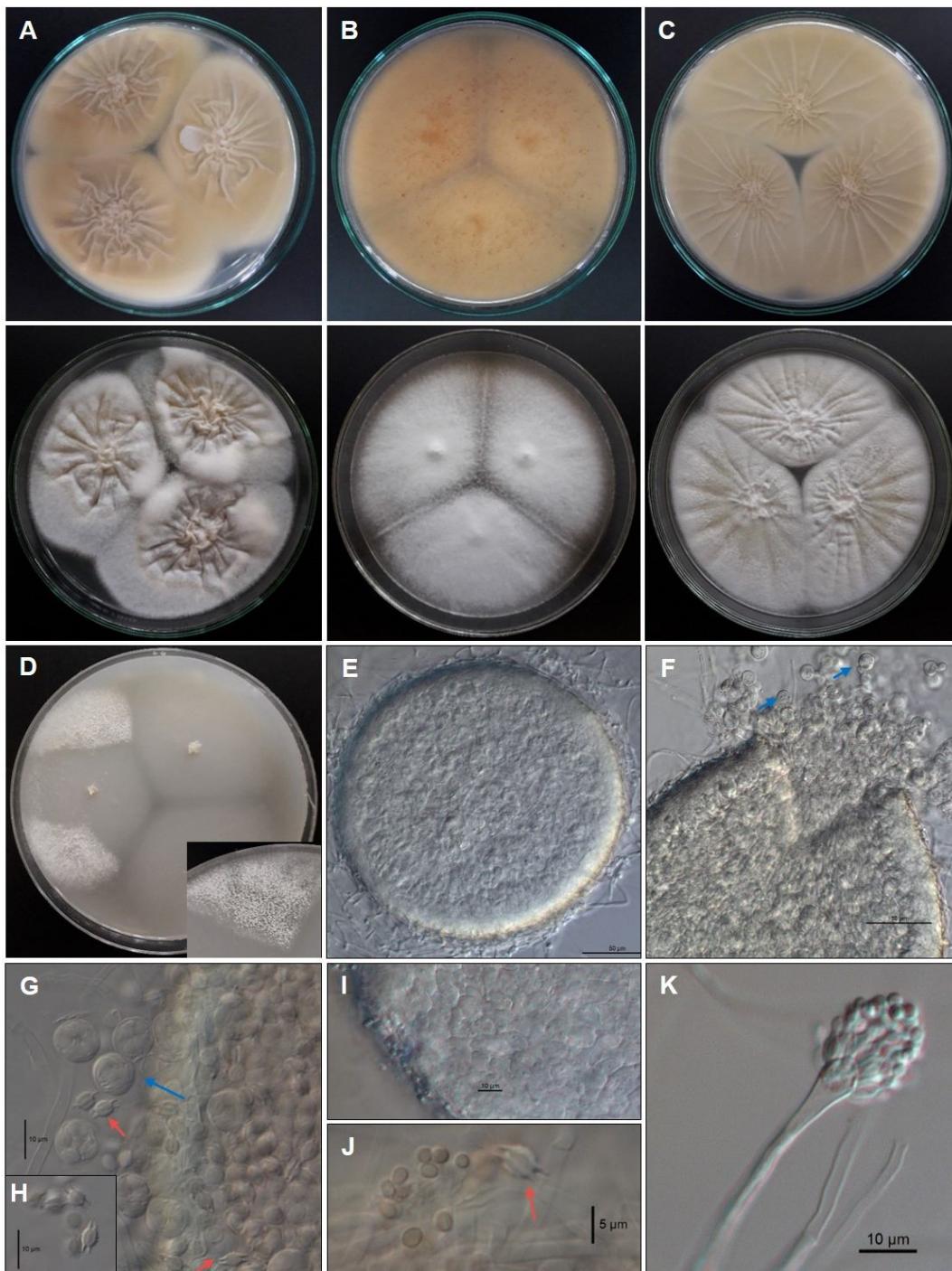


Figura 13: *Aspergillus thermomutatus*. Columnas A-B. Colonias 7 días a 25 °C. A. CYA. B. MEA. Columna C. Colonias 7 días CYA37. D. OA 10 días 25°C, con más aumento se aprecian cleistotecios blanquecinos en desarrollo. E. Cleistotecio. F-G. Ascos (flechas azules) y ascosporas (flechas rojas). H. Ascosporas con dos crestas ecuatoriales separadas y pared con proyecciones triangulares. I. Detalle pared del cleistotecio. J. Conidios y ascospora (flecha roja). K. Conidióforo.

Materiales examinados: DMic 134305 y DMic 134306. Los aislados pertenecen a muestras de córnea y retina respectivamente, de paciente femenina de 65 años internada con catéter, sin datos sobre motivo de internación.

Observaciones: los aislados presentaron características morfológicas compatibles con *A. thermomutatus* (ascomas tipo neosartorya) lo que permitió ubicarlas presuntivamente bajo esta especie. La característica más distintiva que permitió separarlas de otras especies cercanas fue la presencia de ascosporas ornamentadas típicas.

Mediante el análisis filogenético realizado, pudo verse que los aislados formaron un clado monofilético bien soportado y robusto con la cepa tipo de *A. thermomutatus* con un BS de 100 y una PP de 1 (figura 3).

Aspergillus turcosus Hong, Frisvad & Samson, Antonie van Leeuwenhoek 93 (1-2): 97, 2008. **FIGURA 14**

Colonias en CYA, 35-40 mm, de color turquesa grisáceo con bordes desflecados, aterciopeladas, reverso amarillo intenso a naranja. Esporulación asexual abundante. En CYA37 58 - 67 mm, de color verde grisáceo, reverso tostado oscuro. Desarrollo ausente a 50 °C. En MEA, 38 - 42 mm, de color turquesa grisáceo, aterciopeladas, reverso de color amarillo anaranjado. Esporulación asexual abundante. Cabezas aspergilares columnares cortas. Conidióforos lisos. Vesículas claviformes a globosas, 14,8 – 19,1 μ m, uniseriadas. Conidios lisos, subglobosos, 2,7 - 3,3 μ m.



Figura 14: *Aspergillus turcosus*. Columnas A-B. Colonias 7 días a 25 °C. A. CYA. B. MEA. Columna C. Colonias 7 días CYA37. D-F. Conidióforos. G. Conidios.

Materiales examinados: DMic 195902. El aislado fue recuperado de un cultivo de células mesenquimales crioconservadas, pertenecientes a una paciente femenina sin datos de edad ni enfermedad de base.

Observaciones: el aislado presentó características compatibles con *A. turcosus* aunque su desarrollo en MEA fue menor al descripto para la especie (42 - 53 mm) y mayor en CYA37 (48 – 56 mm). El resto de los aspectos morfológicos se ubicaron dentro de los rangos esperados para la especie. El hallazgo más relevante fue que nuestro aislado no presentó desarrollo a 50 °C, característica que se incluye como relevante para diferenciarla de las demás especies (32,104).

Nuestro aislado formó un clado monofilético bien soportado y robusto con la especie tipo de *A. turcosus* con un BS de 100 y una PP de 1, separándose de otras especies cercanas como *A. marvanovae*, *A. assulatus*, entre otras (figura 3).

***Aspergillus udagawae* Horie, Miyaji & Nishim., Mycoscience 36: 199, 1995. FIGURA 15**

Colonias en CYA, 31-67 mm, de color blanca a verde grisáceo, velutinosas, exudado ausente; reverso claro a tostado. Esporulación asexual escasa. En CYA37 55 - 67 mm, de color blanca grisácea, aterciopelada, con surcos radiales y concéntricos, reverso tostado. Desarrollo ausente a 50 °C. En MEA, 39 - 64 mm, de color blanco a verde grisáceo, velutinosas, elevadas; reverso amarillo claro con centro anaranjado. Esporulación asexual abundante. Cabezas aspergilares columnares. Conidióforos lisos, vesículas en forma de matraz a hemiesféricas, 11,5 - 15,6 µm, uniseriadas. Conidios lisos, subglobosos a elipsoidales, 2,6 –3,2 µm.

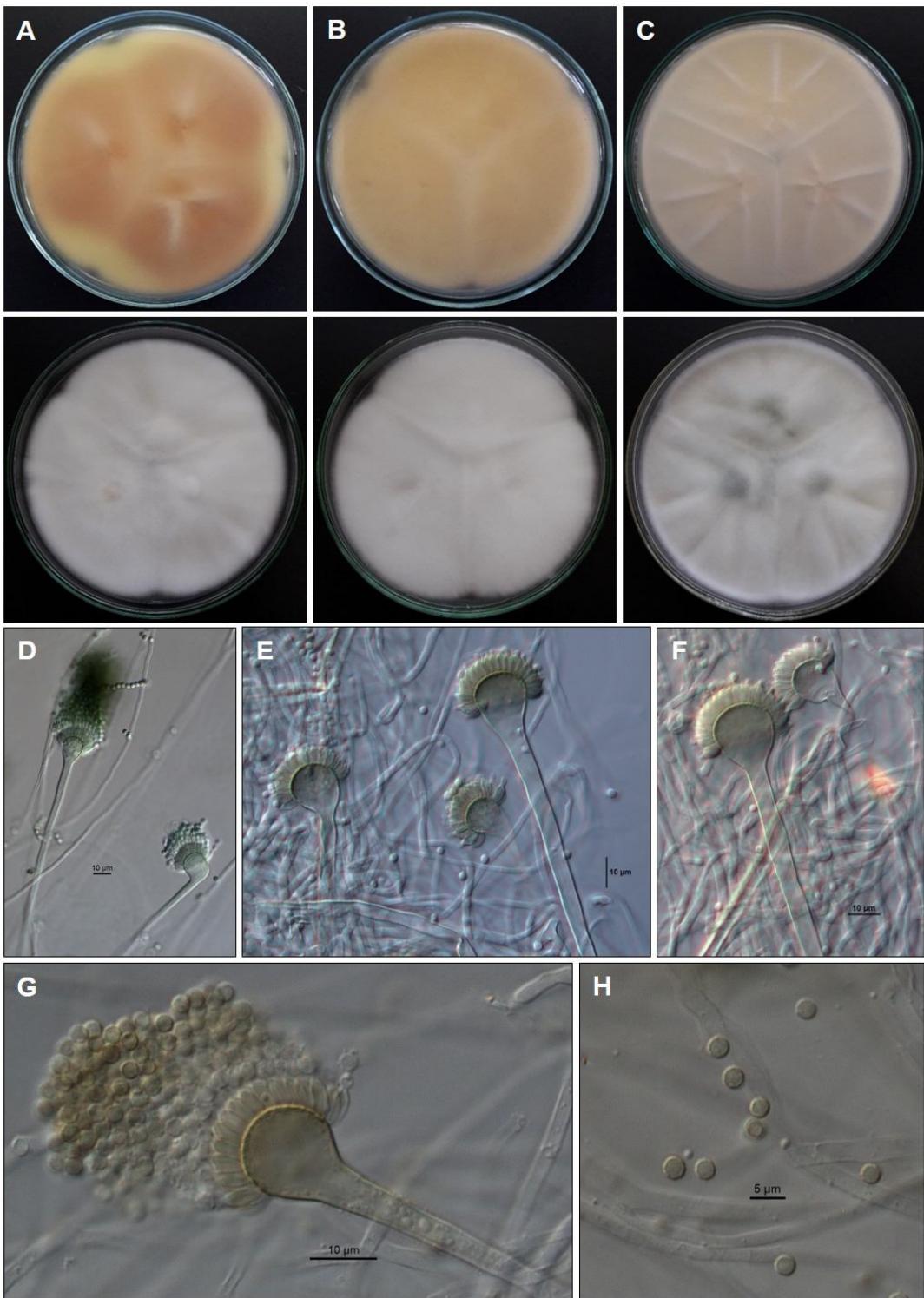


Figura 15: *Aspergillus udagawae*. Columnas A-B. Colonias 7 días a 25°C. A. CYA. B. MEA. Columna C. Colonias 7 días CYA37. D-G. Conidióforos. H. Conidios.

Materiales examinados: DMic 982945, DMic 062877, DMic 062878, DMic 062879, DMic 062881, DMic 062882, DMic 083397, DMic 093518, DMic 093519, DMic 093520, DMic

134311, DMic 175750 (ATCC MYA-4691), DMic 195910 y DMic 195911. El aislado 982945 fue recuperado de una muestra de LBA en el año 1998. Los aislados 062877-78-79-81 y 82 pertenecen a un paciente masculino de 11 años de edad con EGC como enfermedad de base y fueron recuperados de diferentes muestras clínicas. El aislado 083397 fue recuperado de una muestra de humor vítreo de paciente femenina. Los aislados 093518-19 y 20 pertenecen a paciente masculino de 51 años con antecedentes de enfermedad pulmonar y fueron recuperados a partir de diferentes muestras de nariz y senos paranasales. El aislado 134311 fue recuperado de una biopsia pulmonar de paciente masculino de 33 años, con Linfoma no Hodgkin y VIH. Los aislados 195910 y 195911 pertenecen a dos pacientes pediátricos de 5 y 8 años, ambos con EGC y fueron recuperados de biopsia pulmonar y LBA respectivamente.

Observaciones: al comparar las características morfológicas de los aislados pudo verse que presentaron gran variabilidad con respecto a la velocidad de crecimiento, al aspecto de las colonias, al tamaño de las estructuras microscópicas (vesículas y conidios), inclusive esta variabilidad fenotípica también pudo verse cuando se compararon los aislados pertenecientes a un mismo paciente.

El análisis filogenético realizado, mostró que nuestros aislados formaron un clado monofilético bien soportado y robusto con la cepa tipo de *A. udagawae*, con un BS de 97 y una PP de 1, separándose de especies cercanas como *A. acrensis*, *A. aureolus* y las otras especies de la serie *Viridinutantes*. Los aislados recuperados del paciente 34 y los del paciente 36 se separan a su vez, en subclados diferentes a la especie tipo, pero todas dentro de un clado robusto que la contiene (clado inferior). Las cepas de *A. udagawae* recuperadas del resto de los pacientes se ubican en otro clado robusto (clado superior) que contiene a la cepa ATCC MYA-4691. Se puede observar que el clado *A. udagawae* presenta variabilidad genética intraespecie, sin embargo las distancias entre los 2 grandes subclados que se forman, siguen siendo estrechas. Este hallazgo ya fue descrito por Hubka y cols. en 2018 (103).

Pruebas de sensibilidad *in vitro*. Valores de CIM para *Aspergillus* spp. frente a los antifúngicos

Se determinó la sensibilidad *in vitro* a 49 aislados de *Aspergillus* spp. (Tabla 3 y el control *A. fumigatus* DMic 093603) frente a los siguientes antifúngicos: AB, ISA, IZ, TB, VZ, PZ, CAS, AN y MZ. Se consideró la CIM50, CIM90, moda, media geométrica y rango.

La interpretación categórica se basó en los puntos de corte clínicos definidos en el documento Breakpoint v.3 del EUCAST mencionado en materiales y métodos.

Sólo fue posible asignar categoría sensible/resistente a las cepas de *A. fumigatus*, el resto de las especies de la sección *Fumigati* estudiadas, a la fecha, no cuentan con puntos de corte clínicos ni epidemiológicos.

Los resultados de las cepas control *A. fumigatus* ATCC 204305 y *A. flavus* ATCC 204304 se encontraron dentro de los rangos aceptados para el método.

En la tabla 4, se presenta el resumen de resultados de CIM obtenidos por especie. Los datos de cada aislado estudiado se muestran en las tablas IIIa a IIIe del anexo III.

Para *A. felis* (n=2), *A. fumigatiaffinis* (n=2), *A. thermomutatus* (n=2), y *A. turcosus* (n=1) solo fue posible calcular el valor de la CIM y el rango. Los valores de CIM obtenidos con *A. felis*, *A. thermomutatus* y *A. turcosus* para los nueve antifúngicos evaluados fueron ≤ 1 mg/L. Algo similar ocurrió con *A. fumigatiaffinis* con la excepción de AB donde se obtuvieron valores de CIM de 2 y 4 mg/L para los aislados de esta especie. El número de cepas de cada especie fue bajo por lo que no fue posible estimar la tendencia en la distribución de sensibilidad (Tabla 4 y anexo III, tabla IIIa).

Para *A. fumigatus* observamos resistencia frente a la anfotericina B en 3 cepas (15,8%), mientras que para el resto de los antifúngicos no se encontraron resistencias, los valores de CIM fueron ≤ 1 mg/L. Los antifúngicos más activos fueron IZ, VZ y las equinocandinas (rango 0,008-0,064 mg/L) (Tabla 4 y anexo III, tabla IIIb).

Tabla 4: Valores de CIM obtenidos *in vitro* para las especies de la sección *Fumigati* estudiadas, frente a los antifúngicos ensayados.

Especies	CIM	Antifúngicos mg/L								
		AB	ISA	TB	IZ	VZ	AN	CAS	PZ	MZ
A. sección <i>Fumigati</i> n=49	CIM50	1	1	0,125	0,25	0,5	0,015	0,064	0,125	0,015
	CIM90	2	2	0,25	0,5	1	0,032	0,125	0,25	0,032
	Moda	1	1	0,125	0,25	0,5	0,015	0,032	0,125	0,015
	MG	1,03	0,73	0,09	0,23	0,48	0,02	0,05	0,11	0,02
	Rango	0,125-8	0,125-4	0,008-1	0,015-1	0,064-4	0,008-0,064	0,015-0,5	0,015-1	0,008-0,032
<i>Aspergillus fumigatus</i> n=17	CIM50	1	1	0,25	0,25	0,25	0,015	0,064	0,125	0,015
	CIM90	2	2	0,5	0,5	1	0,032	0,125	0,25	0,032
	Moda	1	1	0,125	0,25	0,25	0,015	0,032	0,125	0,015
	MG	0,816	0,783	0,196	0,250	0,391	0,017	0,049	0,126	0,015
	Rango	0,125-2	0,25-2	0,032-1	0,032-0,5	0,25-1	0,008-0,064	0,015-0,125	0,032-0,5	0,015-0,032
<i>Aspergillus udagawae</i> n=13	CIM50	2	1	0,064	0,5	1	0,015	0,032	0,125	0,015
	CIM90	2	4	0,25	1	2	0,015	0,064	0,25	0,015
	Moda	2	1	0,064	0,5	0,5	0,015	0,032	0,125	0,015
	MG	1,90	1,00	0,09	0,34	0,81	0,01	0,05	0,13	0,01
	Rango	1-4	0,25-4	0,032-0,5	0,125-1	0,25-1	0,008-0,125	0,032-0,125	0,032-0,5	0,008-0,032
<i>Aspergillus hiratsukae</i> n=6	Rango	0,25-0,5	0,125-1	0,008-0,125	0,015-0,125	0,064-0,25	0,015-0,032	0,032-0,125	0,015-0,125	0,015
<i>Aspergillus lentulus</i> n=6	Rango	0,5-2	0,25-4	0,064-0,125	0,064-1	0,25-4	0,008-0,032	0,015-0,5	0,125-1	0,008-0,032
<i>Aspergillus felis</i> n=2	Rango	1-2	1	0,125	0,125-0,5	0,5-1	0,015	0,015-0,032	0,032-0,25	0,015
<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i> n=2	Rango	2-4	1-2	0,064	0,5	1-2	0,032	0,032-0,064	0,125	0,015-0,032
<i>Aspergillus thermomutatus</i> n=2	Rango	0,5	1	0,064	0,25	1	0,064	0,125	0,064	0,032
<i>Aspergillus turcosus</i> n=1	CIM	1	0,25	0,008	0,032	0,064	0,032	0,032	0,015	0,015
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	CIM	2	2	0,125	0,25	0,5	0,008	0,032	0,25	0,015
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	CIM	0,5	0,5	0,125	0,25	0,25	0,015	0,064	0,125	0,032
<i>Aspergillus udagawae</i> ATCC	CIM	2	1	0,064	0,5	1	0,008	0,032	0,25	0,008

AB: anfotericina B; ISA: isavuconazol; TB: terbinafina; IZ: itraconazol; VZ: voriconazol; AN: anidulafungina; CAS: caspofungina; PZ: posaconazol; MZ: micafungina; CIM: concentración mínima inhibitoria; CIM50: CIM a la que se inhibe el 50% de los aislados; CIM90: CIM a la que se inhibe el 90 % de los aislados; MG: media geométrica.

Por el contrario, con *A. udagawae* y *A. lentulus* se obtuvieron valores de CIM más elevados, principalmente con AB y los triazoles. (Tabla 4 y anexo III, tablas IIIc y IIId.)

Para *A. hiratsukae* los valores de CIM fueron $\leq 0,5$ mg/L para todos los antifúngicos evaluados a excepción de una cepa que mostró CIM 1 mg/L para isavuconazol. Se observó un rango de CIM ≥ 2 diluciones (Tabla 4 y anexo III, tabla IIIe).

qPCR *CaM*- HRM

Según el análisis in silico realizado sobre las secuencias de los 3 marcadores, se vió que el gen de la calmodulina posee un mayor poder discriminatorio dentro de las especies de la sección. Sobre el análisis del alineamiento de *CaM*, se seleccionó como

marcador un fragmento de 58 pb cuya secuencia es conservada en todas las secuencias analizadas de *A. fumigatus* (anexo IV), pero no en las demás especies de la sección (figura 16 y anexo IV). En el alineamiento de esta secuencia de la figura 16 pueden verse tres polimorfismos de nucleótido único (SNP): las diferentes especies de la sección pueden tener uno, dos y hasta 3 SNPs respecto a *A. fumigatus* e, incluso, *A. hiratsukae* posee una inserción (o delección), también de nucleótico único, en un cuarto sitio.

Según las condiciones de reacción ensayadas se seleccionó para un volumen final de 20 µl, una concentración final de primers de 0,5 µM y 0,1 ng de ADN fúngico.

El 97 % (35/36) de los aislados de *A. fumigatus* se identificaron correctamente con una Tm de $78,6 \pm 0,1$ °C. Por otro lado, el 100% (42/42) de las demás especies estudiadas dentro la sección *Fumigati* se diferenciaron de *A. fumigatus* correctamente, mostrando Tm entre 79,1 y 80,5 °C. En la tabla 5 se muestran los resultados de Tm obtenidos para todos los aislados de *A. sección Fumigati*. Mediante el análisis con el software de HRM los aislados pudieron ordenarse en 4 grupos diferentes. Por un lado todas las cepas de *A. fumigatus* se agruparon juntas (señal roja en figura 17), dentro de la variante 1 (señal amarilla en figura 17) se incluyeron *A. fischeri*, *A. lentulus*, *A. takaki* y *A. thermomutatus*; en la variante 2 (señal azul en figura 17) se incluyeron *A. felis*, *A. fumigatiaffinis* y *A. udagawae*; y por último, en la variante 3 (señal verde en figura 17) se ubicaron *A. auratus*, *A. hiratsukae* y *A. turcosus*. Utilizando los mismos colores, en la figura 18 se muestra la distribución de las Tm obtenidas para cada especie dentro de la sección.

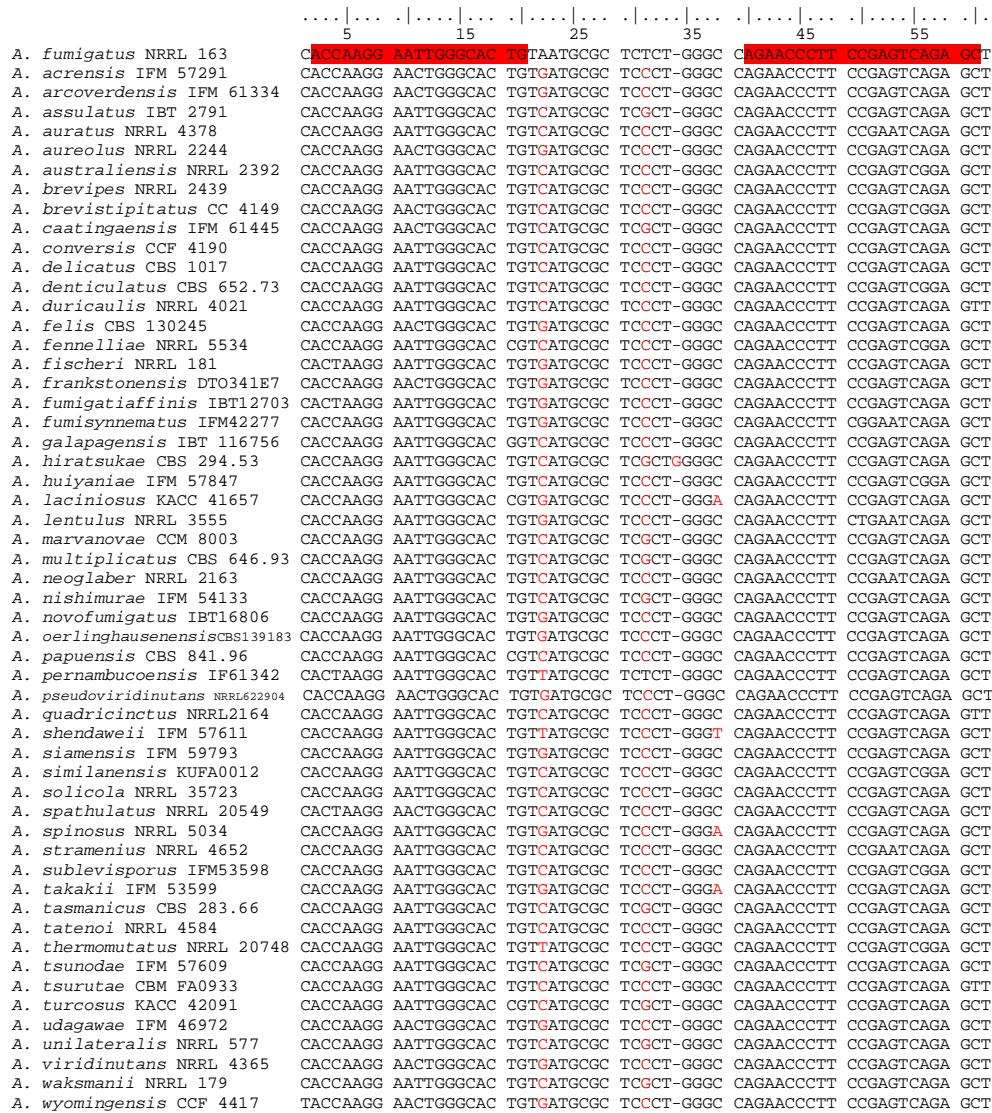


Figura 16: Alineamiento de las secuencias del fragmento de 58 pb del gen CaM seleccionado para la técnica de qPCR- HRM para cada especie de la sección *Fumigati*. Sobre la secuencia correspondiente a *A. fumigatus*, se indica la posición de los primers diseñados (subrayado con color rojo). Las bases nucleotídicas en color rojo indican los polimorfismos de cada secuencia.

Tabla 5. Tm de los *Aspergillus* sección *Fumigati*.

Especies	Tm (°C) [promedio± SD]	Ánálisis HRM
<i>A. fumigatus</i> , n= 36	78,6 ± 0,1 *	AFum
<i>A. fischeri</i> , n= 3	79,7 ± 0,4	
<i>A. lentulus</i> , n= 8	79,6 ± 0,3	
<i>A. takaki</i> , n= 1	79,1 ± 0,1	Variante 1
<i>A. thermomutatus</i> , n= 3	79,4 ± 0,1	
<i>A. felis</i> , n= 2	79,9 ± 0,3	
<i>A. fumigatiaffinis</i> , n= 2	79,9 ± 0,1	Variante 2
<i>A. udagawae</i> , n= 15	79,9 ± 0,1	
<i>A. auratus</i> , n= 1	80,1 ± 0,1	
<i>A. hiratsukae</i> , n= 6	80,5 ± 0,1	Variante 3
<i>A. turcosus</i> , n= 1	80,4 ± 0,1	

* $p < 1 \times 10^{-24}$

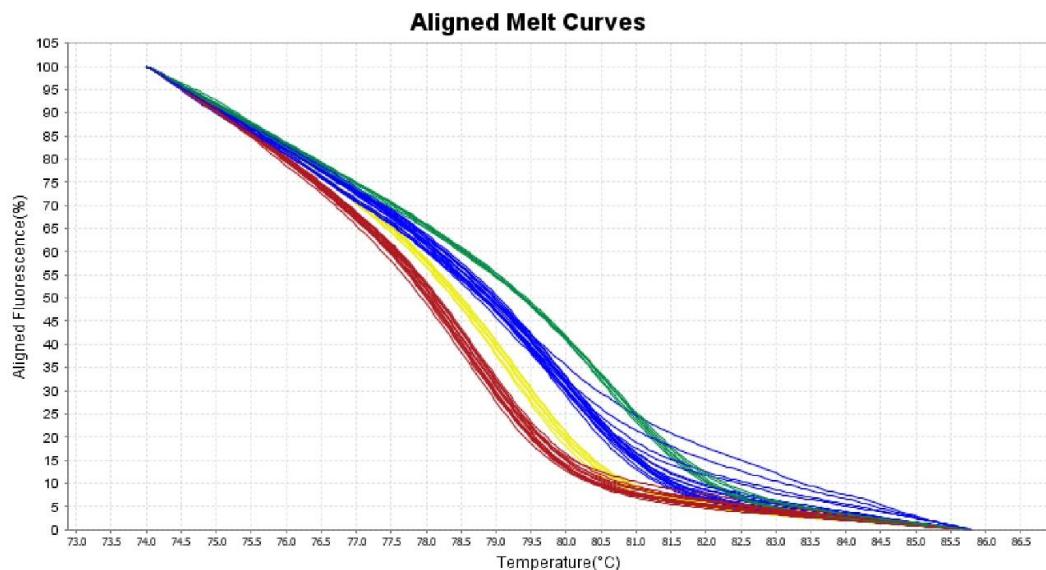


Figura17: Curvas de Melting de especies de la sec. *Fumigati* analizadas con software HRM

Resolution Melt Software v 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Rojo: *A. fumigatus*, Amarillo: variante 1, Azul: variante 2 y Verde: variante 3.

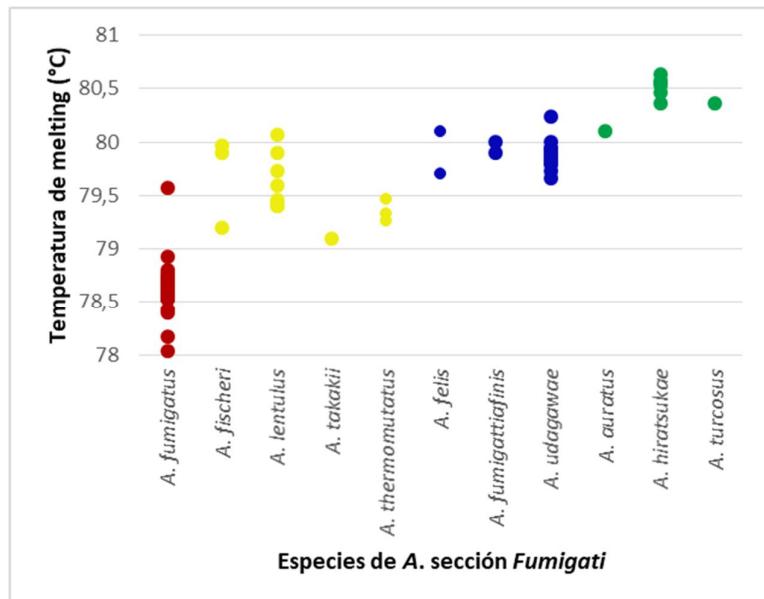


Figura 18: Distribución de las Tm obtenidas para cada especie de la sección *Fumigati*. *A. fumigatus* color rojo, variante 1 color amarillo, variante 2 color azul y variante 3 color verde.

Con el fin de desafiar la performance de la técnica se ensayaron además 15 muestras de ADN de 10 especies de *Aspergillus* de diferentes secciones. Sólo se obtuvo amplificación en dos especies y las mismas mostraron Tm diferentes a los observados para la sección *Fumigati*: *A. clavatus* con Tm de $77,3 \pm 0,1$ °C y *A. terreus* con Tm de $77,8 \pm 0,1$ °C. En el anexo II se muestran los resultados obtenidos para todas las muestras ensayadas.

Todos los controles positivos mostraron señal de amplificación con Tm en el rango esperado mientras que los controles negativos no mostraron señal de amplificación. Se encontraron diferencias significativas entre las Tm de *A. fumigatus* y las demás especies de la sección *Fumigati* con un valor de $p < 1 \times 10^{-24}$.

Discusión

La aspergilosis es una enfermedad con manifestaciones clínicas muy diversas y en las últimas décadas, por su alta mortalidad y morbilidad, ha tomado especial relevancia la aspergilosis invasora, principalmente asociada a patologías o tratamientos inmunodepresores. El surgimiento de nuevas drogas antifúngicas y nuevas especies con perfiles altos en los valores de CIM, dio especial relevancia a los estudios epidemiológicos y a la identificación a nivel de especie para el mejor ajuste de los tratamientos, sean estos empíricos o no.

En este trabajo se estudiaron las cepas de *A. sección Fumigati* derivadas para su identificación durante más de tres décadas, antes identificadas todas ellas utilizando únicamente características morfológicas. Desde la descripción por Balajee y cols. en 2005 de la primera especie críptica de la sección, *A. lentulus*, se han descripto 25 nuevas especies diferentes. Y es razonable suponer que estas especies han circulado en el ambiente en el pasado. Por eso es que en este trabajo se reidentificaron con metodologías de referencia de enfoque polifásico, utilizando la prueba de crecimiento a 50°C como herramienta de screening, atendiendo que sólo tres especies desarrollan a esa temperatura: *A. fumigatus* la especie de mayor relevancia clínica; *A. fischeri*, especie homotálica que desarrolla las estructuras de reproducción sexual en cultivo y de menor importancia clínica; y *A. oerlinghausenensis*, especie heterotálica ambiental muy poco frecuente, resistente intrínsecamente a itraconazol, que fue aislada en medios de cultivo conteniendo el antifúngico desde muestras de suelo en Alemania (34) y hasta la fecha sólo se ha descripto un nuevo hallazgo de origen clínico, desde un muestra de exudado de oído en Portugal (45).

Los resultados incluyeron 356 aislados de 315 pacientes derivados durante 35 años e indicaron que el 12 % mostró morfología o fisiología no acorde a *A. fumigatus*, de los que sólo el 9 % resultó fehacientemente identificado como *A. sección Fumigati* diferente de *A. fumigatus*. Esto representa un 8% de pacientes de los cuales se recuperó al menos

un aislado de alguna especie críptica de la sección *Fumigati*. Además, se incluyeron dos aislados recuperados de elementos asociados al cuidado del paciente, recuperados de una bolsa de solución de dextrosa y de un cultivo de células mesenquimáticas. Si bien estos aislados no fueron recuperados de un paciente con un proceso infeccioso, se incluyeron en el estudio como un hallazgo interesante que sugiere que estas especies crípticas pueden estar en circulación en ambientes hospitalarios o contaminando insumos médicos. Al comparar nuestros resultados con otros estudios similares, podemos observar que el porcentaje de especies no *A. fumigatus* identificadas fue mayor al reportado en la bibliografía, donde se indica que del 3 a 6 % de las AI son causadas por especies crípticas de la sección (40–46). Esta diferencia puede deberse a un sesgo de muestreo del presente trabajo, ya que en nuestro país la derivación al Centro Nacional de Referencia en Micología responde a la necesidad de cada laboratorio de origen. En este trabajo se utilizaron aislados derivados voluntariamente al Departamento Micología, Laboratorio Nacional de Referencia en Micología Clínica, para identificación definitiva y/o pruebas de sensibilidad. Estas muestras presentan un sesgo importante en relación a los aislados que se procesan habitualmente en los laboratorios de micología hospitalarios, ya que comúnmente se derivan aquellas que presentaron alguna dificultad diagnóstica o terapéutica y que no pudieron resolverse en el laboratorio de origen o requieren confirmación. Por ello, los aislados analizados no representan fielmente la epidemiología real de las aspergilosis en nuestro país. Sin embargo, los hallazgos aquí presentados confirman la circulación de estas especies crípticas y permiten hacer una estimación de cuales de ellas circulan en nuestro país. Si bien la prueba de screening a 50°C resultó eficiente para seleccionar rápidamente y a bajo costo las especies sospechosas de no ser *A. fumigatus*, hubo 7 aislados que mostraron un desarrollo dudoso a esa temperatura, donde se observó escaso desarrollo en sólo una de las réplicas o donde se formaron colonias pequeñas de menos de 2 mm de diámetro a los 5 días. En estos casos, los aislados fueron incluídos en el análisis polifásico resultando en que todos ellos fueron finalmente identificados como *A.*

fumigatus, lo que sugiere que un crecimiento pobre a 50 °C es también indicativo de ser *A. fumigatus*. Asimismo, todas las especies crípticas confirmadas como diferentes de *A. fumigatus* mostraron ausencia de desarrollo a esta temperatura, robusteciendo el valor de ese ensayo para la diferenciación de estas especies.

Además, fueron incluidos en el estudio polifásico dos aislados que no cumplieron con el criterio de *screening* (con morfología compatible para *A. fumigatus* y crecimiento a 50 °C), porque fueron recuperados de pacientes con antecedentes de haberles aislado *A. sección Fumigati* diferente de *A. fumigatus* y para estudiar si eran casos de infecciones mixtas por diferentes especies de la misma sección, como ya ha sido documentado por otros autores (41,45,60). Este es el caso de los pacientes 16 y 19. Del primero, ambos aislados resultaron ser *A. fumigatus* que presentaron diferente morfología y pequeñas diferencias en su comportamiento frente a los antifúngicos ensayados (Tabla IIIb del anexo III), aún así el análisis filogenético de los marcadores seleccionados las agrupó juntas y las secuencias de estos marcadores fueron idénticas, concluyendo que con esta información no podemos confirmar ni descartar que se trate de una coinfección por dos cepas diferentes. Sin embargo, en el paciente 19, un paciente con bronquitis crónica, se confirmaron los aislamientos de *A. lentulus* y *A. fumigatus* a partir de muestras de esputo. Lamentablemente, por el tipo de muestra y las características del paciente, no fue posible dilucidar si fue una infección y/o un proceso de colonización. Este hallazgo coincide con lo descripto por Montenegro y cols. donde se describe el hallazgo de estas dos especies en muestra de LBA en una paciente femenina de 43 años de edad con antecedentes de hipertensión arterial, enfermedad renal crónica e inmunosupresión por trasplante renal.

En relación a las muestras de las cuales se aislaron todas las cepas de *A. sección Fumigati*, el 71 % de ellas fueron aisladas de muestras respiratorias, entre las cuales las más frecuentes fueron esputo, seguida de LBA y biopsia de pulmón. En cuarto lugar, se ubican los raspados de córnea con un 5 %, y le siguen senos paranasales, biopsia de cerebro y lavado bronquial en proporciones equivalentes. Al analizar las muestras de

las cuales se aislaron las especies de *A. sección Fumigati* diferentes de *A. fumigatus*, se ve un patrón de distribución similar, donde esputo, LBA y biopsia de pulmón son las más frecuentes, seguidas por muestras oculares y senos paranasales. De modo que las especies crípticas se estarían aislando de localizaciones similares a *A. fumigatus*, lo que sugiere que no hay patrones diferenciales entre ambos grupos. Esto también pudo verse en estudios similares donde al igual que *A. fumigatus*, las especies crípticas son recuperadas en su mayoría desde muestras respiratorias. En el año 2009, Balajee y cols. de un total de 147 aislados de la sección *Fumigati* encuentran 8 aislados de especies crípticas de los cuales 7 son recuperados de muestras respiratorias y uno de piel (40). En el estudio realizado por Sabino y cols. del año 2021, recuperan 18 aislados de especies crípticas (de un total de 337 cepas de la sección *Fumigati*), 16 aisladas desde muestras respiratoria, una de oído y una ambiental (45). Otros estudios similares donde se evalúa la epidemiología de la aspergilosis en diferentes países, no discriminan el tipo de muestras de donde se aíslan las especies crípticas, pero de manera general la mayoría de las muestras analizadas son de origen respiratorio (41,42,44).

Asimismo, los antecedentes médicos de los pacientes con aislados de especies crípticas incluyeron entidades muy diversas, como EGC (20 %) y otras de menor frecuencia como antecedentes de enfermedad pulmonar, transplantados de riñón, fibroquísticos, otras inmunosupresiones (LLA, tratamiento con corticoides, VIH, etc). Es llamativo que estas especies crípticas no fueron recuperadas de ningún paciente con antecedentes de TBC o secuelas por TBC (cavidades o cavernas) siendo que *A. fumigatus* suele recuperarse de aspergilomas o colonizaciones en este tipo de pacientes, como incluso se documenta entre los pacientes que presentaron *A. fumigatus* estudiados en este trabajo (Tabla 3). En estudios realizados previamente en nuestro país ya se habían reportado algunas de estas especies crípticas pero siempre desde muestras ambientales, con excepción del primer caso clínico por *A. lentulus* ya mencionado (60) y un caso de peritonitis por *A. hiratsukae* reportado en 2007 por Predari y cols. (61). En 2016 Romero y cols. recuperaron a partir de muestras de suelos semiáridos de la provincia de Catamarca, *A.*

fumigatus, *A. lentulus*, *A. hiratsukae* y *A. fumigatiaffinis*, además de otras especies de la sección sin importancia clínica (62). Este hallazgo constituyó el primer reporte de *A. fumigatiaffinis* del país. En 2017, Giusiano y cols. reportaron el hallazgo de *A. fumigatiaffinis*, *A. felis* y *A. udagawae* a partir de muestras de suelo de dos eco-regiones diferentes en las provincias de La Rioja y Córdoba. Este estudio confirmó por primera vez la presencia de *A. felis* y *A. udagawae* en muestras ambientales en nuestro país.

Dentro de los 32 aislados clasificados como *A. sec. Fumigati* no *A. fumigatus*, encontramos 7 especies diferentes, siendo *A. udagawae* la especie que causó mayor número de casos (7 pacientes). En uno de los casos causados por *A. udagawae*, el paciente 34, se recuperó el agente de diferentes muestras (biopsias de pulmón, piel y hemocultivo) sugiriendo que se trató de una infección diseminada en un paciente con EGC, hallazgo que ya ha sido reportado por otros autores, así como infecciones en pacientes inmunosuprimidos y un caso de infección ocular (30) como los casos reportados en este estudio (Tabla 3).

En segundo lugar de frecuencia encontramos a *A. lentulus* (6 pacientes). Todos los aislados de esta especie fueron recuperados de muestras respiratorias, 3 pacientes con antecedentes de enfermedad pulmonar, 2 pacientes trasplantados renales y un paciente sin datos epidemiológicos. Estos hallazgos coinciden con los casos reportados en la bibliografía donde se mencionan diferentes enfermedades de base como EPOC, cáncer de órganos sólidos, trasplante renal, cardiopatías, enfermedades autoinmunes, diabetes, entre otras. La mayoría de estos casos son de origen respiratorio, aunque se describen hallazgos en piel y uña (30,41,51,58).

En tercer lugar se ubicó *A. hiratsukae* (5 pacientes y una muestra clínico-ambiental). La mayoría de nuestros aislados clínicos (4/5) fueron recuperados de muestras respiratorias de pacientes con cuadros pulmonares y FQ, y en los pacientes 23, 24 y 25 por el tipo de muestra (no estéril) no puede determinarse si se trató de casos de infección o colonización por el agente. Los casos reportados incluyen rinosinusitis, una infección

cerebral fatal, dos casos de peritonitis en pacientes dializados y aislados de piel, exudado orofaríngeo y córnea (30,51,61).

También se identificó *A. fumigatiaffinis* (2 pacientes), a partir de muestras de biopsia de senos paranasales y lavado broncoalveolar, en pacientes con antecedentes de tratamiento con corticoides y EGC, respectivamente. La descripción de esta especie fue hecha por Hong y cols en el año 2005, a partir de muestras de suelo y de la bolsa de mejilla de un roedor, ambas recuperadas en Estados Unidos (105). Si bien existen reportes clínicos, la mayoría de los estudios mencionan el hallazgo de la especie y el origen de la muestra (LBA, esputo), pero no siempre brindan información epidemiológica o enfermedad de base de los pacientes (30,42,51). Es por ello que no podemos comparar con precisión nuestros hallazgos con los otros reportados en el mundo.

Se identificaron dos aislados de *A. felis* (2 pacientes), provenientes de biopsia de cerebro en un paciente con LLA y de biopsia de córnea en un paciente sin antecedentes de traumatismo previo o de alguna enfermedad de base. Esta especie fue descripta inicialmente a partir de infecciones rinosinusales en gatos de Australia, aunque esa publicación también incluye casos en perros y humanos (21) y posteriormente se han descripto nuevos hallazgos en todo el mundo, la mayoría aislados a partir de muestras pulmonares, pero también de uña y cepas ambientales (30,45,57,63). Teniendo en cuenta los cambios taxonómicos ya mencionados dentro de este grupo de especies, el análisis filogenético llevado a cabo para las especies de la serie *Viridinutantes* permitió ubicar a nuestros aislados dentro del clado de *A. felis*, mostrando una variedad intraespecie ya descripta por otros autores (33,98,103).

Dos aislados proveniente de muestras oculares, pertenecientes a un mismo paciente fueron identificados como *A. thermomutatus*. Los casos reportados en la bibliografía incluyen infecciones de diferentes localizaciones como osteomielitis, endocarditis, infecciones pulmonares, peritonitis y queratitis (30,46,51,106).

Por último, se identificó un aislado como *A. turcosus* (1 muestra clínico-ambiental). En el año 2008, Hong y cols. describieron por primera vez *A. turcosus* aislado de aire de

aires acondicionados en Corea del Sur (104), en el año 2017 Hubka y cols. pudieron inducir el estado sexual de esta especie utilizando estos aislados ambientales (38) y recientemente, en el estudio publicado en 2019 por Parent Michaud y cols. se describieron los primeros hallazgos clínicos desde muestras respiratorias a partir de los cuales se obtiene la primera secuenciación genómica de esta especie (107). A pesar de que en la descripción original de la especie incluyó el desarrollo a 50 °C como una característica útil para diferenciarla de otras especies de la sección, esto no se menciona en ninguna de estas publicaciones posteriores y en las revisiones de la sección *Fumigati* no se incluye dentro de las especies que si desarrollan, coincidiendo con el comportamiento de nuestro aislado (31).

En el estudio llevado a cabo por Dignani y cols. durante los años 2010 y 2013 (59) se registró el primer caso clínico por *A. udagawae* que corresponde al aislado DMic 134311 incluido en este trabajo, pero podemos decir que esta especie ya se encontraba circulando en nuestro país desde hace varios años atrás encontrando aislados conservados en la colección del Departamento Micología desde el año 1998 además de 2006, 2008 y 2009. Este trabajo constituye el reporte de los primeros casos clínicos en nuestro país causados por *A. felis*, *A. fumigatiaffinis* y *A. thermomutatus*, y el primer reporte de detección de *A. turcosus* en el ambiente en Argentina.

En general los aislados estudiados presentaron características morfológicas esperables dentro de la descripción de cada especie con mínimas variaciones, a excepción de los aislados de *A. fumigatus* con morfología aberrante ya mencionados. En todos los aislados el abordaje polifásico permitió ubicar inequívocamente a cada aislado en una especie reforzando la idea que la identificación definitiva y de referencia debe incluir aspectos macro y micromorfológicos y análisis de marcadores moleculares específicos para el género.

La resistencia a los azoles, principalmente en *A. fumigatus* es un tema de preocupación en algunas regiones de Europa, como en Reino Unido y Países Bajos en los que en los últimos años se registra un aumento en la frecuencia de aparición desde el 1,7 al 6%.

Asimismo, en el Sudeste de Asia se encuentran zonas con un 50 % de *A. fumigatus* resistentes (79,108).

En Latinoamérica, la emergencia de resistencia a los antifúngicos en *A. fumigatus* por el momento no parece ser preocupante. En una revisión publicada recientemente por Resendiz Sharpe y cols., sobre 199 *A. fumigatus* aislados del ambiente de México, Paraguay y Perú, se encontraron 14 (7 %) cepas resistentes, dos de las cepas no presentaban mutaciones en su genoma (109). Por otra parte, si bien los hallazgos de cepas resistentes aislados de pacientes son escasos, muestran un incremento sostenido en la última década (110–113).

Evaluamos la sensibilidad *in vitro* de AB, azoles y equinocandinas, frente a *A. fumigatus*, *A. udagawae*, *A. hiratsukae*, *A. lentulus*, *A. felis*, *A. fumigatiaffinis*, *A. thermomutatus* y *A. turcosus*. Al analizar los resultados obtenidos para *A. fumigatus* observamos un 15,8 % de cepas resistentes a la AB, mientras que no se observó resistencia a los azoles ni a las equinocandinas evaluadas. Estos resultados difieren de los presentados por otros autores locales que reportan elevados porcentajes de resistencia a los azoles (113).

En el caso de las especies críticas, se han reportado perfiles de CIM elevadas en *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis*, *A udagawae*, *A. thermomutatus* y *A. felis*, aunque no es un comportamiento que se presenta en todas las cepas, reforzando la importancia de realizar la identificación definitiva y las pruebas de sensibilidad de cada aislado (21,40–43,45,51–54,58,60,114–116).

La técnica de qPCR-HRM es un procedimiento rápido, basado en la discriminación de variantes de amplicones por medio de las diferencias en la temperatura de melting de los fragmentos amplificados.

Esta técnica diferenció correctamente el 98,7 % de los aislados estudiados, incluyendo el 100 % de los aislados diferentes de *A. fumigatus* y el 97 % de los aislados de *A. fumigatus*. Sólo un aislado de *A. fumigatus* fue identificado incorrectamente, lo que la presenta como una valiosa herramienta de screening para la detección presuntiva de

especies crípticas que, luego, deben ser confirmadas con técnicas de referencia. Como la especie predominante es *A. fumigatus*, la aplicación de este procedimiento permite confirmar rápidamente esta especie y enviar a realizar MLST (que es más costoso en tiempo y dinero) sólo a las variantes que se hayan diferenciado por qPCR-HRM. El procedimiento desarrollado demostró ser apropiado para la discriminación entre cultivos de *A. fumigatus* y sus especies crípticas en 96 h, incluidas la extracción de ADN y el análisis qPCR-HRM en tiempo real. Aunque esta técnica no es un método de identificación de referencia, es útil para la rápida diferenciación de *A. fumigatus* (en particular, cuando se observa una morfología aberrante), sin perder de vista que la identificación de referencia implica además la utilización del MLST para alcanzar un resultado de máxima certeza. La utilización de métodos comerciales para la extracción de ADN permitiría agilizar los tiempos de extracción sin la necesidad de partir de cultivos líquidos. Esto reduciría el tiempo de extracción de 72h a 3h, permitiendo que el resultado final de la prueba completa esté disponible en 24h. Resultados preliminares con el kit DNeasy ® Plant Minikit (Qiagen, USA, CA) nos permitió confirmar esta reducción del tiempo del ensayo (datos no mostrados en el presente trabajo).

Los aislados de *A. fumigatus* mostraron una Tm promedio de 78,6 +/- 0,1 °C (todos incluídos en el rango 78,0-78,9 °C), lo que muestra una gran homogeneidad en la secuencia del fragmento estudiado. Sin embargo, un aislado mostró un Tm de 78,9 °C, fuera del rango esperado a pesar de que los datos de MLST confirmaron su identificación. El estudio de la secuenciación de CaM de esa cepa (prueba repetida en 3 ocasiones) mostró una secuencia idéntica a las otras de la misma especie, por lo que este resultado es desconcertante. Una explicación de este hecho podría ser que esta cepa contenga algún gen parálogo de calmodulina en su genoma, que tenga una secuencia levemente diferente y que sea la que está detectando la prueba de qPCR-HRM. Podría ocurrir algo similar a lo descripto para el gen *tubC*, gen parálogo de *BenA* estudiado inicialmente en *A. nidulans* pero también fue detectado en las especies de la sección Nigri (117). Para confirmar o rechazar esta hipótesis deberíamos llevar a cabo

una prueba de secuenciación de genoma completo para evaluar las potenciales variantes de este gen que pudiera contener su genoma.

Por otra parte, las demás especies de la sección fueron diferenciadas correctamente con T_m entre 79 y 80 °C, agrupándose en 3 variantes identificadas automáticamente por el software del equipo. Este resultado era esperable, producto del análisis *in silico* realizado previamente, que nos permitió saber que había diversas variantes génicas en esa región, entre las secuencias de los aislados no *A. fumigatus*. Sin embargo, la diferenciación de estas variantes no refleja necesariamente las relaciones evolutivas ni taxonómicas y no fueron consideradas para la identificación de los aislados, puesto que la confirmación final fue realizada por MLST.

Finalmente, la qPCR-HRM resultó ser una prueba de utilidad para el *screening* de *A. fumigatus* y su diferenciación de sus especies cercanas, permitiendo dirigir recursos para realizar MLST sólo de las especies críticas, mientras que los aislados de *A. fumigatus* pueden identificarse sin la secuenciación. Cabe recalcar que para aquellos aislados de *A. fumigatus* con falla terapéutica, resistencia azólica, cuadros clínicos atípicos o alguna otra característica relevante, el MLST sigue siendo la herramienta de referencia para la confirmación de especie y caracterización del aislado.

Esta herramienta puede ser complementada con la prueba de crecimiento a 50 °C, que presentó resultados concordantes. Cabe aclarar que todos los aislados catalogados como dudosos resultaron ser *A. fumigatus*, lo que sugiere que podría modificarse el criterio de la prueba, considerando como positivas a aquellas cepas que muestran algún crecimiento aunque sea mínimo.

Estos resultados tienen un sesgo de autoconfirmación, que no pudo resolverse por limitaciones en el diseño del estudio: los 330 aislados con crecimiento a 50 °C y morfología en CYA compatible, fueron consideradas como *A. fumigatus* siguiendo la información bibliográfica, por lo que no todos fueron secuenciados para confirmar dicha identificación. Puesto que no se han reportado estudios de sensibilidad y especificidad de estas pruebas (morfología y prueba de 50 °C), no podemos asegurar con completa

certeza que alguno de esos resultados sea un falso positivo y, por ende, haya alguna otra especie subestimada entre esos 330 aislados. Sin embargo, el hecho de que el 100 % de las dudosas (por morfología aberrante o falta de crecimiento a 50 °C) hayan sido identificadas como *A. fumigatus*, sugiere que esto es poco probable.

Las especies de secciones diferentes de *Fumigati* pueden ser fácilmente diferenciadas mediante la observación morfológica de sus estructuras; sin embargo, para conocer cómo funciona la técnica de qPCR-HRM frente a estas otras especies, se probó su funcionamiento con ADN de aislados de las secciones *Favi*, *Nigri*, *Terrei*, *Nidulantes*, y *Clavati*. La mayoría de los aislados no mostró señal alguna, aunque *A. terreus* y *A. clavatus* mostraron amplificación del fragmento de *CaM*. Sin embargo, las Tm fueron de 77,8 y 77,3 °C respectivamente lo que fácilmente permite diferenciarlos de los *Aspergillus* de la sección *Fumigati*, que muestran Tm entre 78,6 y 81,5 °C, dependiendo de la especie. Esto robustece la técnica, porque es sabido que los caracteres morfológicos son útiles para diferenciar las diferentes secciones, entonces estos resultados demuestran que, en caso de aislados con morfologías aberrantes o contaminación, la técnica no va a dar reacciones cruzadas que pudieran derivar en una identificación errónea.

El presente trabajo permitió profundizar en las técnicas de identificación morfológica, fisiológica y molecular para la identificación de referencia del género *Aspergillus*, con foco en la sección con mayor impacto en el ámbito de la salud. La hipótesis fue confirmada, puesto que se detectaron 32 aislados de 7 especies de la sección *Fumigati* diferentes de *A. fumigatus*, entre los aislados derivados al DM entre 1984 y 2019. Estos resultados permitieron una estimación de que alrededor del 8 % de los aislados de la sección *Fumigati* circulantes en Argentina podrían no ser *A. fumigatus*, lo que adquiere particular relevancia por los valores de sensibilidad aumentados en algunas de estas especies.

Por otra parte, la qPCR-HRM resultó efectiva como prueba de screening para la identificación presuntiva de *A. fumigatus* con gran capacidad de diferenciación de sus

especies crípticas, acortando los tiempos de identificación de esta especie, sin la necesidad de recurrir a la secuenciación.

Estudios controlados prospectivos multicéntricos son deseables para poder tener un conocimiento acabado y preciso de la incidencia y prevalencia de las especies circulantes en Argentina y su asociación a diferentes enfermedades de base, pero los resultados aquí presentados son una estimación que permite conocer las especies que están circulando en nuestro país, hace ya muchos años.

Conclusiones

En Argentina circulan desde 1998 especies de la sección *Fumigati* diferentes a *A. fumigatus* y estas fueron recuperadas de un 8% de los pacientes estudiados

Las especies crípticas detectadas en orden de frecuencia fueron *A. udagawae*, *A. lentulus*, *A. hiratsukae*, *A. fumigatiaffinis*, *A. felis*, *A. thermomutatus* y *A. turcosus*.

Este trabajo constituye el reporte de los primeros casos clínicos en Argentina causados por *A. fumigatiaffinis*, *A. felis* y *A. thermomutatus*, y el primer reporte de *A. turcosus* en nuestro país.

Las pruebas de sensibilidad de las especies crípticas frente a los antifúngicos coincidieron con lo reportado por otros autores. En este estudio se demuestra que los perfiles de sensibilidad a los antifúngicos para todas las cepas DMic de las especies estudiadas de Argentina, tienen un comportamiento variable similar a lo descripto a nivel mundial, por lo que es necesario la determinación *in vitro* de cada aislado.

Es de particular interés la detección de 3 aislados de *A. fumigatus* resistentes a anfotericina B, sin que esto represente un hallazgo alarmante en los perfiles de resistencia habitualmente reportados para esta especie en nuestro país.

Este trabajo contiene descripciones taxonómicas y registros fotográficos de macro y micromorfología de las especies detectadas en nuestro país.

Una herramienta como qPCR-HRM se incorporó a la rutina de laboratorio para la identificación de *A. fumigatus*, en combinación con la prueba de crecimiento a 50 °C, para reducir costos y mejorar los tiempos de identificación.

Este trabajo resalta la importancia de realizar estudios multicéntricos para comprender con precisión la epidemiología de las especies de esta sección a nivel nacional o regional.

Bibliografia

1. Index Fungorum. <https://www.indexfungorum.org/>.
2. Rippon J. Tratado en Micología Médica. IM G-H, editor. Mexico D.F.; 1990.
3. Thom C, Church MB. The Aspergilli. Baltimore: Williams & Wilkins; 1926. 272 p.
4. Raper KB, Fennell DI. The Genus Aspergillus. Baltimore: Williams & Wilkins; 1965. 686 p.
5. Gams W, Christensen M, Onions AH, Pitt JI, Samson RA. Infrageneric Taxa of Aspergillus. *Adv Penicillium Aspergillus Syst.* 1986;55–62.
6. Peterson SW. Phylogenetic analysis of Aspergillus species using DNA sequences from four loci. *Mycologia.* 2008;100(2):205–26.
7. Peterson SW, Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Phylogeny and subgeneric taxonomy of Aspergillus. In: Varga J, Samson RA, editors. *Aspergillus in the genomic era.* Wageningen Academy Publishers; 2008. p. 33–56.
8. Houbraken J, Samson RA. Phylogeny of Penicillium and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Stud Mycol.* 2011 Sep;70:1–51.
9. Houbraken J, de Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically important aspergillus and penicillium species. 1st ed. Vol. 86, *Advances in Applied Microbiology.* Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.; 2014. 199–249 p.
10. Visagie CM, Houbraken J. Updating the taxonomy of Aspergillus in South Africa. *Stud Mycol.* 2020;95:253–92.
11. Kocsimbé S, Perrone G, Magistà D, Houbraken J, Varga J, Szigeti G, et al. Aspergillus is monophyletic: evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Stud Mycol.* 2016;(January 2017).
12. Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsimbé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. *Stud Mycol.* 2014;78(1):343–71.
13. Pitt JI, Taylor JW. Aspergillus, its sexual states, and the new International Code of Nomenclature. *Mycologia.* 2014;106(5):1051–62.
14. Taylor JW, Göker M, Pitt JI. Choosing one name for pleomorphic fungi: The example of Aspergillus versus Eurotium, Neosartorya and Emericella. *Taxon.* 2016;65(3):593–601.
15. Samson RA, Hubka V, Varga J, Houbraken J, Hong SB, Klaassen CHW, et al. Response to pitt & taylor 2016: Conservation of Aspergillus with a. Niger as the conserved type is unnecessary and potentially disruptive. *Taxon.* 2017;66(6):1439–46.
16. Houbraken J, Kocsimbé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, et al. Classification of Aspergillus, Penicillium, Talaromyces and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol.* 2020;95:5–169.
17. Hawksworth D. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus.* 2011;2(2):155–62.

18. International Commission of Penicillium and Aspergillus. <https://www.aspergilluspenicillium.org/>.
19. Hubka V, Kolařík M, Kubátová A, Peterson SW. Taxonomic revision of Eurotium and transfer of species to Aspergillus. *Mycologia*. 2013;105(4):912–37.
20. Hubka V, Peterson SW, Frisvad JC, Yaguchi T, Kubátová A, Kolařík M. *Aspergillus waksmanii* sp. nov. and *Aspergillus marvanovae* sp. nov., two closely related species in section Fumigati. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(PART2):783–9.
21. Barrs VR, van Doorn TM, Houbraken J, Kidd SE, Martin P, Pinheiro MD, et al. *Aspergillus felis* sp. nov., an Emerging Agent of Invasive Aspergillosis in Humans, Cats, and Dogs. Goldman GH, editor. *PLoS One*. 2013 Jun 14;8(6):e64871.
22. Matsuzawa T, Horie Y, Abliz P, Gonoi T, Yaguchi T. *Aspergillus huiyanaiae* sp. nov., a teleomorphic species in sect. Fumigati isolated from desert soil in China. *Mycoscience*. 2014;55(3):213–20.
23. Eamvijarn A, Manoch L, Chamswarng C, Piasai O, Visarathanonth N, Luangsa-ard JJ, et al. *Aspergillus siamensis* sp. nov. from soil in Thailand. *Mycoscience*. 2013;54(6):401–5.
24. Matsuzawa T, Campos Takaki GM, Yaguchi T, Okada K, Gonoi T, Horie Y. Two new species of *Aspergillus* section Fumigati isolated from caatinga soil in the State of Pernambuco, Brazil. *Mycoscience*. 2014;55(2):79–88.
25. Nováková A, Hubka V, Dudová Z, Matsuzawa T, Kubátová A, Yaguchi T, et al. New species in *Aspergillus* section Fumigati from reclamation sites in Wyoming (U.S.A.) and revision of *A. viridinutans* complex. *Fungal Divers*. 2014 Jan 14;64(1):253–74.
26. Hong SB, Lee M, Kim DH, Meijer M, Majoor E, VanKuyk PA, et al. *Aspergillus cibarius* sp. nov., from traditional meju in Korea. *J Microbiol*. 2012;50(4):712–4.
27. Asgari B, Zare R, Zamanizadeh HR, Rezaee S. *Aspergillus osmophilus* sp. nov., and a new teleomorph for *A. proliferans*. *Mycoscience*. 2014;55(1):53–62.
28. Kim DH, Kim SH, Kwon SW, Lee JK, Hong SB. *Aspergillus cumulatus* sp. nov., from rice straw and air for Meju fermentation. *J Microbiol Biotechnol*. 2014;24(3):334–6.
29. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(2).
30. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed SA, Al-Hatmi AMS, Figueras MJ, et al. *Atlas of Clinical Fungi*. 4th. Hilversum: Foundation Atlas of Clinical Fungi; 2020.
31. Arastehfar A, Carvalho A, Houbraken J, Lombardi L, Garcia-Rubio R, Jenks JD, et al. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. *Stud Mycol*. 2021;100.
32. Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol*. 2007;59:147–203.
33. Sugui JA, Peterson SW, Figat A, Hansen B, Samson RA, Mellado E, et al. Genetic Relatedness versus Biological Compatibility between *Aspergillus fumigatus* and Related Species. Warnock DW, editor. *J Clin Microbiol*. 2014

- Oct;52(10):3707–21.
34. Houbraken J, Weig M, Grob U, Meijer M, Bader O. *Aspergillus oerlinghausenensis*, a new mould species closely related to *A. fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(3):1–6.
 35. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J, et al. Aspergillus species identification in the clinical setting. *Stud Mycol.* 2007;59:39–46.
 36. O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* 2009 Jan 22;457(7228):471–4.
 37. Swilaiman SS, O’Gorman CM, Balajee SA, Dyer PS. Discovery of a Sexual Cycle in *Aspergillus lentulus*, a Close Relative of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2013 Jul;12(7):962–9.
 38. Hubka V, Dudová Z, Kubátová A, Frisvad JC, Yaguchi T, Horie Y, et al. Taxonomic novelties in *Aspergillus* section Fumigati: *A. tasmanicus* sp. nov., induction of sexual state in *A. turcosus* and overview of related species. *Plant Syst Evol.* 2017;(April).
 39. Binder U, Lass-Flörl C. New Insights into Invasive aspergillosis- from the Pathogen to the Disease. *Curr Pharm Desing.* 2013;19(20):3879–3688.
 40. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3138–41.
 41. Escribano P, Peláez T, Muñoz P, Bouza E, Guinea J. Is Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* a Problem in Spain? *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun;57(6):2815–20.
 42. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, et al. Population-Based Survey of Filamentous Fungi and Antifungal Resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jul;57(7):3380–7.
 43. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. Antifungal Susceptibility Profile of Cryptic Species of *Aspergillus*. *Mycopathologia.* 2014 Dec 28;178(5–6):427–33.
 44. Sabino R, Verissimo C, Parada H, Brandao J, Viegas C, Carolino E, et al. Molecular screening of 246 Portuguese *Aspergillus* isolates among different clinical and environmental sources. *Med Mycol.* 2014 Jul 1;52(5):519–29.
 45. Sabino R, Gonçalves P, Melo AM, Simões D, Oliveira M, Francisco M, et al. Trends on aspergillus epidemiology—perspectives from a national reference laboratory surveillance program. *J Fungi.* 2021;7(1):1–18.
 46. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol.* 2016;7(May):1–8.
 47. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd Edition. CLSI standard M38. 3rd ed. 2017;1–31.
 48. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.4 Method for the determination of broth

- dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. <http://www.eucast.org>. 2022;(2):1–25.
49. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. 4th ed. CLSI supplement M57S. 2022;
 50. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.3, E. Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures. <http://www.eucast.org>. 2022;3:0–8.
 51. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Aspergillus section Fumigati: Antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(4):1244–51.
 52. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2005 Mar;4(3):625–32.
 53. van der Linden JWM, Arendrup MC, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser PM, et al. Prospective Multicenter Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(6):1041–4.
 54. Negri CE, Gonçalves SS, Xafranski H, Bergamasco MD, Aquino VR, Castro PTO, et al. Cryptic and Rare *Aspergillus* species in Brazil: Prevalence in clinical samples and in Vitro susceptibility to Triazoles. *J Clin Microbiol*. 2014;52(10):3633–40.
 55. Frisvad JC, Larsen TO. Extrolites of *aspergillus fumigatus* and other pathogenic species in *aspergillus* section *fumigati*. *Front Microbiol*. 2016;6(JAN):1–14.
 56. Talbot JJ, Barrs VR. One-health pathogens in the *Aspergillus viridinutans* complex. *Med Mycol*. 2018;56(1):1–12.
 57. Paccoud O, Guery R, Poirée S, Jouvon G, Bougnoux ME, Catherinot E, et al. *Aspergillus felis* in Patient with chronic granulomatous disease. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(12):2319–21.
 58. Yagi K, Ushikubo M, Maeshima A, Konishi M, Fujimoto K, Tsukamoto M, et al. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus lentulus* in an adult patient: A case report and literature review. *J Infect Chemother*. 2019;25(7):547–51.
 59. Abrantes RA, Refojo N, Córdoba S, Dignani MC, Davel G, Brandt M, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of opportunistic molds from immunocompromised patients in Argentina. In: ICAAC 54th. 2014. p. POM-026.
 60. Montenegro G, Puch SS, Jewtuchowicz VM, Pinoni M V., Reloso S, Temporitti E, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis. *J Med Microbiol*. 2009;58(3):391–5.
 61. Predari SC, De Paulis AN, Verón D, Zucchini A, Santoianni JE. Fungal peritonitis in patients on peritoneal dialysis: Twenty five years of experience in a teaching hospital in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2007;39(4):213–7.
 62. Romero SM. Ascomicetes termorresistentes de suelos semiáridos de la Provincia de Catamarca, República Argentina. Exploración de su potencial como productores de moléculas bioactivas. UBA; 2016.

63. Giusiano GE, Piontelli E, Fernández MS, Mangiaterra ML, Cattana ME, Kocsuhé S, et al. Biodiversity of species of *Aspergillus* section *Fumigati* in semi-desert soils in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2017;49(3):247–54.
64. Kostrzewska M. Application of the MALDI Biotyper to clinical microbiology: progress and potential. *Expert Rev Proteomics.* 2018;15(3):193–202.
65. Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez De Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar J. Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol.* 2018;56(7):838–46.
66. Imbert S, Normand AC, Gabriel F, Cassaing S, Bonnal C, Costa D, et al. Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of cryptic and rare species of *Aspergillus* by MALDI-TOF. *Med Mycol.* 2019;57(8):962–8.
67. Américo FM, Machado Siqueira LP, Del Negro GMB, Favero Gimenes VM, Trindade MRS, Motta AL, et al. Evaluating VITEK MS for the identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Med Mycol.* 2020;58(3):322–7.
68. Alonso M, Escribano P, Guinea J, Recio S, Simon A, Peláez T, et al. Rapid Detection and Identification of *Aspergillus* from Lower Respiratory Tract Specimens by Use of a Combined Probe–High-Resolution Melting Analysis. *J Clin Microbiol.* 2012 Oct;50(10):3238–43.
69. Erali M, Pounder JI, Woods GL, Petti CA, Wittwer CT. Multiplex Single-Color PCR with Amplicon Melting Analysis for Identification of *Aspergillus* Species. *Clin Chem.* 2006 Jul 1;52(7):1443–5.
70. Plaignaud M. Observation sur un fungus du sinus maxillaire. *J Med Chir Pharm.* 1791;87:244–51.
71. Fresenius G. Beitrage zur Mykologie. Frankfurt: H.L. Brönnner; 1863. 81–82 p.
72. Latgé J-P, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Washington, DC: ASM Press; 2009. 1–568 p.
73. Castón Osorio JJ, Román AR, Torre-Cisneros J. Espectro y factores de riesgo de la infección fúngica invasora. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2007;25(7):467–76.
74. Stevens D a, Kan VL, Judson M a, Morrison V a, Dummer S, Denning DW, et al. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis.* 2000;30(4):696–709.
75. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Chap. 11: Aspergillosis. In: *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p. 201–47.
76. Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of Invasive Mold Infections in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Biological Risk Factors for Infection According to Time after Transplantation. *Clin Infect Dis.* 2008;47(8):1041–50.
77. Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(2):310–50.
78. Latgé J-P, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(1):1–75.
79. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2021;35(2):415–34.

80. Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis.* 2021;(January):19–21.
81. Zhou W, Li H, Zhang Y, Huang M, He Q, Li P, et al. Diagnostic value of galactomannan antigen test in serum and bronchoalveolar lavage fluid samples from patients with nonneutropenic invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2153–61.
82. Patterson TF, Donnelly JP. New concepts in diagnostics for invasive mycoses: Non-culture-based methodologies. *J Fungi.* 2019;5(1):1–10.
83. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Pruell F, Raggam RB, et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and pcr tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(6):2039–45.
84. Buchheidt D, Reinwald M, Hoenigl M, Hofmann WK, Spiess B, Boch T. The evolving landscape of new diagnostic tests for invasive aspergillosis in hematology patients: Strengths and weaknesses. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(6):539–44.
85. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJG, McCulloch E, Schulz B, et al. Aspergillus PCR: One step closer to standardization. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1231–40.
86. White PL, Barnes RA, Springer J, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Morton CO, et al. Clinical performance of aspergillus PCR for testing serum and plasma: A study by the European aspergillus PCR initiative. *J Clin Microbiol.* 2015;53(9):2832–7.
87. Springer J, Lackner M, Nachbaur D, Girschkofsky M, Risslegger B, Mutschlechner W, et al. Prospective multicentre PCR-based Aspergillus DNA screening in high-risk patients with and without primary antifungal mould prophylaxis. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(1):80–6.
88. Egger M, Jenks D, Hoenigl M, Prattes J. Blood Aspergillus PCR : The Good , the Bad, and the Ugly. *J Fungi.* 2020;6(18):1–14.
89. Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Caliendo AM, Mylonakis E. PCR in Diagnosis of Invasive Aspergillosis : a Meta-Analysis of Diagnostic Performance. *J Clin Microbiol.* 2014;52(10):3731–42.
90. Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clin Infect Dis.* 2000;31(6):1524–8.
91. Tong KB, Lau CJ, Murtagh K, Layton AJ, Seifeldin R. The economic impact of aspergillosis: analysis of hospital expenditures across patient subgroups. *Int J Infect Dis.* 2009;13(1):24–36.
92. Zilberberg MD, Harrington R, Spalding JR, Shorr AF. Burden of hospitalizations over time with invasive aspergillosis in the United States, 2004-2013. *BMC Public Health.* 2019;19(1):1–7.
93. Benedict K, Jackson BR, Chiller T, Beer KD. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. *Clin Infect Dis.* 2019;68(11):1791–7.
94. Dignani M, Celano C, Remaggi C, Aiello E, Devoto F, Desmery P, et al. Costo

- atribuible a aspergilosis invasiva: datos preliminares. Mar del Plata, Buenos Aires; 2006.
95. Davel GO, Mazza M, Canteros CE, Córdoba SB, Refojo N, Taverna CG, et al. Contribution of the National Mycology Laboratory Network to Surveillance of Fungal Diseases in Argentina. In: 17th INFOCUS. San Salvador, Bahía, Brasil; 2019.
 96. Sangi AR, Rogers WM, Longacre TA, Montoya JG, Baron EJ, Banaei N. Challenges and Pitfalls of Morphologic Identification of Fungal Infections in Histologic and Cytologic Specimens. *Am J Clin Pathol*. 2009 Mar 1;131(3):364–75.
 97. Tuon FF. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24(2):89–94.
 98. Talbot JJ, Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA, Kidd SE, Pitt J, et al. Discovery of *Aspergillus frankstonensis* sp. nov. During environmental sampling for animal and human fungal pathogens. *PLoS One*. 2017;12(8):1–17.
 99. Schmitt I, Crespo A, Divakar PK, Fankhauser JD, Herman-Sackett E, Kalb K, et al. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi*. 2009;23:35–40.
 100. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725–9.
 101. Nylander JAA. MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evol Biol Cent Uppsala Univ*. 2004;2(January 2004):1–2.
 102. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001;17(8):754–5.
 103. Hubka V, Barrs V, Dudová Z, Sklenář F, Kubátová A, Matsuzawa T, et al. Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (Section *fumigati*): Opportunistic human and animal pathogens capable of interspecific hybridization. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi*. 2018;41(June):142–74.
 104. Hong SB, Shin HD, Hong J, Frisvad JC, Nielsen P V., Varga J, et al. New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2008;93(1–2):87–98.
 105. Hong S-B, Go S-J, Shin H-D, Frisvad JC, Samson R a. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*. 2005;97(6):1316–29.
 106. Balajee SA, Gribkov J, Brandt M, Ito J, Fothergill A, Marr KA. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(12):5996–9.
 107. Parent-michaud M, Dufresne PJ, Fournier É, Martineau C, Moreira S, Perkins V. Draft Genome Susceptible *Aspergillus turcosus* Clinical Isolates Recovered. 2019;(January):19–21.
 108. Duong TMN, Le T Van, Tran KLH, Nguyen PT, Nguyen BPT, Nguyen TA, et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* is highly prevalent in the environment of Vietnam, with marked variability by land use type. *Environ Microbiol*. 2021;23(12):7632–42.
 109. Resendiz-Sharpe A, Dewaele K, Merckx R, Bustamante B, Vega-Gomez MC,

- Rolon M, et al. Triazole-resistance in environmental *Aspergillus fumigatus* in Latin American and African countries. *J Fungi*. 2021;7(4):1–14.
110. Isla G, Leonardelli F, Tiraboschi IN, Refojo N, Hevia A, Vivot W, et al. First Clinical Isolation of an Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* isolate harboring a TR46 Y121F T289A mutation in South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10):1–5.
111. Macedo D, Leonardelli F, Gamarra S, Garcia-Effron G. Emergence of Triazole Resistance in *Aspergillus* spp. in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep*. 2021;15(3):93–103.
112. Leonardelli F, Theill L, Nardin ME, Macedo D, Dudiuk C, Mendez E, et al. First itraconazole resistant *Aspergillus fumigatus* clinical isolate harboring a G54E substitution in Cyp51Ap in South America. *Rev Iberoam Micol*. 2016;(xx):1–9.
113. Brito Devoto T, Hermida-Alva K, Posse G, Finquelievich JL, García-Effrón G, Cuestas ML. High prevalence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* sensu stricto in an Argentinean cohort of patients with cystic fibrosis. *Mycoses*. 2020;63(9):937–41.
114. de Azevedo Bastos VR, de Castro Lima Santos DW, Padovan ACB, Melo ASA, de Abreu Mazzolin M, Camargo LFA, et al. Early Invasive Pulmonary Aspergillosis in a Kidney Transplant Recipient Caused by *Aspergillus lentulus*: First Brazilian Report. *Mycopathologia*. 2015;179(3–4):299–305.
115. Romero M, Messina F, Marin E, Arechavala A, Depardo R, Walker L, et al. Antifungal resistance in clinical isolates of *Aspergillus* spp.: When local epidemiology breaks the norm. *J Fungi*. 2019;5(2):1–7.
116. Imbert S, Normand AC, Cassaing S, Gabriel F, Kristensen L, Bonnal C, et al. Multicentric Analysis of the Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Cryptic Isolates from *Aspergillus* Section Fumigati. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(12):17–22.
117. Hubka V, Kolarik M. β -tubulin parologue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section Nigri taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi*. 2012;29:1–10.

ANEXOS

Anexo I

Secuencias de referencia de las especies de *Aspergillus* Sección *Fumigati* utilizados para el análisis filogenético en este trabajo.

CEPAS TIPO	Número de acceso de GenBank				
	ITS	BenA	CaM	Tsr1	Mcm7
<i>Aspergillus acrensis</i> IFM 57291 ^T	n.a.	LT795980	LT795981	n.a.	n.a.
<i>Aspergillus arcoverdensis</i> IFM 61334 ^T	MN431385	AB818845	AB818856	n.a.	KY808892
<i>Aspergillus assulatus</i> IBT 27911 ^T	HF545007	DQ114123	MN969222	-	-
<i>Aspergillus auratus</i> NRRL 4378 ^T	EF669979	EF669835	EF669905	-	-
<i>Aspergillus aureolus</i> NRRL 2244 ^T	EF669950	EF669808	EF669877	LT796756	KY808895
<i>Aspergillus australiensis</i> NRRL 2392 ^T	EF669953	EF669811	EF669880	-	-
<i>Aspergillus brevipes</i> NRRL 2439 ^T	EF669954	EF669812	EF669881	-	-
<i>Aspergillus brevistipitatus</i> CCF 4149 ^T	HF937386	HF933364	HF933388	-	-
<i>Aspergillus caatingaensis</i> IFM 61335 ^T	MN431362	AB743854	AB743860	-	-
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1 ^T	EF669942	EF669802	EF669871	-	-
<i>Aspergillus conversis</i> CCF 4190 ^T	HF937385	HF933363	HF933387	-	-
<i>Aspergillus delicatus</i> CBS 101754 ^T	MN431364	DQ114124	DQ114132	-	-
<i>Aspergillus denticulatus</i> CBS 652.73 ^T	MN431365	DQ114125	DQ114133	-	-
<i>Aspergillus duricaulis</i> NRRL 4021 ^T	EF669971	EF669827	EF669897	-	-
<i>Aspergillus felis</i> CBS 130245 ^T	MN431358	MN969363	JX021715	LT796745	KY808871
<i>Aspergillus felis</i> NRRL 62900 (ex <i>A. parafelis</i> T)	n.a.	KJ914692	KJ914702	LT796734	KJ914720
<i>Aspergillus felis</i> NRRL 62903 (ex <i>A. pseudofelis</i> T)	n.a.	KJ914697	KJ914705	LT796749	KJ914723
<i>Aspergillus fennelliae</i> NRRL 5534 ^T	EF669994	AF057320	EF669920	-	-
<i>Aspergillus fischeri</i> NRRL 181 ^T	EF669936	EF669796	EF669865	-	-
<i>Aspergillus frankstonensis</i> DTO 341-E7 ^T	KY808756	KY808594	KY808724	LT904842	KY808906
<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i> IBT 12703 ^T	MN431367	DQ094885	DQ094891	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 163 ^T	EF669931	EF669791	EF669860	XM750526	JQ689988
<i>Aspergillus fumisynnematus</i> IFM 42277 ^T	AB250779	AB248076	AB259968	-	-
<i>Aspergillus galapagensis</i> IBT 16756 ^T	MN431368	DQ534145	DQ534151	-	-
<i>Aspergillus hiratsukae</i> CBS 294.93 ^T	MN431369	AF057324	AY870699	-	-
<i>Aspergillus huiyaniae</i> IFM 57847 ^T	MN431370	AB787219	AB787564	-	-
<i>Aspergillus laciniosus</i> KACC 41657 ^T	AB299413	AY870756	AY870716	-	-
<i>Aspergillus lentulus</i> NRRL 35552 ^T	EF669969	EF669825	EF669895	-	-
<i>Aspergillus marvanovae</i> CCM 8003 ^T	HE974450	HE974387	HE974389	-	-
<i>Aspergillus multiplicatus</i> CBS 646.95 ^T	HE974445	DQ114129	DQ114137	-	-
<i>Aspergillus neoglaber</i> NRRL 2163 ^T	EF669948	EU014107	EU014120	-	-
<i>Aspergillus nishimurae</i> IFM 54133 ^T	HE974449	AB201360	HE974392	-	-
<i>Aspergillus novofumigatus</i> IBT 16806 ^T	MN431372	DQ094886	DQ094893	-	-
<i>Aspergillus oerlinghausenensis</i> CBS139183 ^T	KT359601	KT359603	KT359605	-	-
<i>Aspergillus papuensis</i> CBS 841.96 ^T	EU220280	AY870738	AY870697	-	-
<i>Aspergillus pernambucoensis</i> IFM 61342 ^T	MN431373	AB743856	AB743862	-	-
<i>Aspergillus pseudoviridinutans</i> NRRL62904 ^T	MN431384	KJ914690	KJ914708	LT796717	KJ914727
<i>Aspergillus quadricinctus</i> NRRL 2154 ^T	EF669947	EF669806	EF669875	-	-
<i>Aspergillus shendawei</i> IFM 57611 ^T	MN431374	AB488754	AB488762	-	-
<i>Aspergillus siamensis</i> IFM 59793 ^T	MN431375	AB646989	AB776704	n.a.	KY808886
<i>Aspergillus similanensis</i> KUFA 0012 ^T	n.a.	KM095494	KC920701	-	-
<i>Aspergillus solicola</i> NRRL 35723 ^T	EU220279	MN969370	EU220284	-	-
<i>Aspergillus spathulatus</i> NRRL 20549 ^T	EF669943	EF669803	EF669872	-	-
<i>Aspergillus spinosus</i> NRRL 5034 ^T	EF669988	EF669844	EF669914	-	-
<i>Aspergillus stramenius</i> NRRL 4652 ^T	EF669984	EF669840	EF669910	-	-
<i>Aspergillus sublevisporus</i> IFM 53598 ^T	MN431376	AB488759	AB488767	-	-

<i>Aspergillus takakii</i> IFM 53599 ^T	MN431378	AB787221	AB787566	-	-
<i>Aspergillus tasmanicus</i> CBS 283.66 ^T	AB185279	AY685180	AY689367	-	-
<i>Aspergillus tatenoi</i> NRRL 4584 ^T	EF669982	EF669838	EF669908	-	-
<i>Aspergillus thermomutatus</i> NRRL 20748 ^T	EF669946	EF669805	EF669874	-	-
<i>Aspergillus tsunodae</i> IFM 57609 ^T	HE974447	AB488755	AB488763	-	-
<i>Aspergillus tsurutae</i> CBM FA-0933 ^T	MN431382	AB488760	AB488768	-	-
<i>Aspergillus turcosus</i> KACC 42091 ^T	MN431383	DQ534143	DQ534148	-	-
<i>Aspergillus udagawae</i> IFM 46972 ^T	AB185265	LT796063	LT796064	KJ572801	KY808880
<i>Aspergillus unilateralis</i> NRRL 577 ^T	EF669997	EF669852	EF669923	-	-
<i>Aspergillus viridinutans</i> NRRL 4365 ^T	EF669978	EF661252	DQ534162	KJ914751	KY808862
<i>Aspergillus waksmanii</i> NRRL 179 ^T	EF669934	EF669794	EF669863	-	-
<i>Aspergillus wyomingensis</i> CCF 4417 ^T	HG324081	HF933359	HF933397	LT796757	KY808896

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.

CBS: Culture Collection of the Westerdijk Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

CCF: Culture Collection of Fungi- Department of Botany, Faculty of Science Charles University, Prague, Czech Republic.

CCM: Czech Collection of Microorganisms, Czech Republic.

CMB: Natural History Museum and Institute Chiba, Japan.

DTO: in-house collection ID number at Westerdijk Institute, the Netherlands.

FMR: colección de cultivos de la Facultad de Medicina de Reus, España.

IBT: Bioengineering Department of Biotechnology and Biomedicine. Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.

IFM: Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University. Japan.

KACC: Korean Agricultural Culture Collection, National Academy of Agricultural Science, Korea.

KUFA: Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Thailand.

NRRL: Northern Regional Research Laboratory- Agricultural Research Service Culture Collection Database, Illinois, USA.

UTHSC: colección del Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA.

Anexo II

Muestras de ADN incluidas para evaluar performance de la técnica de HRM, resultado de Tm obtenido y origen del aislado.

Nº de cultivo	Sección	Especie	Tm promedio (°C)	Origen
DMic 144803	<i>Fumigati</i>	<i>A. auratus</i>	80,1 ± 0,1	no autóctona
DMic 175403	<i>Fumigati</i>	<i>A. fischeri</i>	80,0 ± 0,1	ambiental
DMic 175404	<i>Fumigati</i>	<i>A. fischeri</i>	79,2 ± 0,1	ambiental
DMic 175408	<i>Fumigati</i>	<i>A. fischeri</i>	79,9 ± 0,1	ambiental
DMic 951739	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,6 ± 0,1	clínica
DMic 073168	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,8 ± 0,1	no autóctona
DMic 093515	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,7 ± 0,1	clínica
DMic 093560	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,0 ± 0,5	no autóctona
DMic 093658	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,7 ± 0,1	clínica
DMic 114111	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,5 ± 0,1	clínica
DMic 114113	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,5 ± 0,1	clínica
DMic 124153	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,4 ± 0,1	clínica
DMic 124165	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,8 ± 0,1	no autóctona
DMic 124185	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,5 ± 0,1	clínica
DMic 124186	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,8 ± 0,1	clínica
DMic 124187	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,7 ± 0,1	clínica
DMic 134309	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,6 ± 0,1	clínica
DMic 165253	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,2 ± 0,5	clínica
DMic 175482	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,8 ± 0,1	clínica
DMic 195909	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,6 ± 0,1	clínica
DMic 216578	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,9 ± 0,1	clínica
DMic 216579	<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	78,6 ± 0,1	clínica
DMic 165268	<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i>	80,1 ± 0,1	no autóctona
DMic 216437	<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i>	79,4 ± 0,3	clínica
DMic 175409	<i>Fumigati</i>	<i>A. takakii</i>	79,1 ± 0,1	ambiental
DMic 124168	<i>Fumigati</i>	<i>A. thermomutatus</i>	79,5 ± 0,1	no autóctona
DMic 216358	<i>Fumigati</i>	<i>A. udagawae</i>	80,2 ± 0,1	clínica
DMic 84050	<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	77,3 ± 0,1	clínica
DMic 114114	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	Negativo	clínica
DMic 124206	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	Negativo	clínica
DMic 134326	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	Negativo	clínica
DMic 144730	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	Negativo	ATCC
DMic 84052	<i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	Negativo	clínica
DMic 103781	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	Negativo	clínica
DMic 144728	<i>Nigri</i>	<i>A. brasiliensis</i>	Negativo	ATCC
DMic 114012	<i>Terrei</i>	<i>A. alabamensis</i>	Negativo	clínica
DMic 031772	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	77,8 ± 0,1	clínica
DMic 134303	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	77,8 ± 0,1	clínica
DMic 134331	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	77,8 ± 0,1	clínica
DMic 103755	<i>Nidulantes</i>	<i>A. versicolor</i>	Negativo	ambiental
DMic 124220	<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulantes</i>	Negativo	clínica
DMic 114034	<i>Nidulantes</i>	<i>A. sydowii</i>	Negativo	clínica

Anexo III

Sensibilidad de cada aislado estudiado. AB: anfotericina B; ISA: isavuconazol; TB: terbinafina; IZ: itraconazol; VZ: voriconazol; AN: anidulafungina; CAS: caspofungina; PZ: posaconazol; MZ: micafungina; CIM: concentración mínima inhibitoria

Tabla IIIa.

Especie y N° de cultivo	Antifúngicos mg/L								
	AB	ISA	TB	IZ	VZ	AN	CAS	PZ	MZ
<i>A. felis</i> DMic 134555	1	1	0,125	0,125	0,5	0,015	0,015	0,032	0,015
<i>A. felis</i> DMic 134377	2	1	0,125	0,5	1	0,015	0,032	0,25	0,015
<i>A. fumigatiaffinis</i> DMic 154900	4	1	0,064	0,5	1	0,032	0,032	0,125	0,015
<i>A. fumigatiaffinis</i> DMic 154904	2	2	0,064	0,5	2	0,032	0,064	0,125	0,032
<i>A. thermomutatus</i> DMic 134305	0,5	1	0,064	0,25	1	0,064	0,125	0,064	0,032
<i>A. thermomutatus</i> DMic 134306	0,5	1	0,064	0,25	1	0,064	0,125	0,064	0,032
<i>A. turcosus</i> DMic 195902	1	0,25	0,008	0,032	0,064	0,032	0,032	0,015	0,015

Tabla IIIb.

A. fumigatus n=17	Antifúngicos mg/L								
	N° de cultivo	AB	ISA	TB	IZ	VZ	AN	CAS	PZ
DMic 84049	1	0,5	0,125	0,25	0,25	0,015	0,032	0,25	0,015
DMic 00293	0,25	2	0,125	0,25	0,5	0,008	0,032	0,125	0,008
DMic 083241	2	1	0,125	0,25	0,5	0,015	0,032	0,25	0,015
DMic 114104	1	2	0,032	0,5	0,25	0,008	0,064	0,25	0,008
DMic 165183	1	0,5	1	0,25	0,25	0,015	0,015	0,064	0,015
DMic 165251	0,5	1	0,25	0,032	1	0,032	0,125	0,064	0,015
DMic 195907	1	1	0,125	0,25	0,25	0,032	0,064	0,032	0,032
DMic 175537	0,125	0,5	0,125	0,125	0,25	0,015	0,032	0,125	0,015
DMic 195913	1	0,5	0,25	0,25	1	0,064	0,125	0,064	0,015
DMic 216474	2	0,5	0,125	0,25	0,25	0,015	0,064	0,25	0,032
DMic 951741	1	0,5	0,25	0,25	1	0,032	0,125	0,25	0,015
DMic 993316	2	1	0,25	0,5	0,5	0,015	0,032	0,125	0,015
DMic 195899	1	1	1	0,5	0,25	0,015	0,064	0,25	0,015
DMic 195908	1	1	0,25	0,5	0,5	0,032	0,015	0,125	0,032
DMic 00371	0,25	1	0,125	0,25	0,25	0,008	0,064	0,032	0,015
DMic 195900	1	0,25	0,25	0,25	0,5	0,008	0,032	0,125	0,008
DMic 093603	1	1	0,25	0,25	0,25	0,015	0,125	0,25	0,015

Tabla IIIc

<i>A. udagawae</i> n=13	Antifúngicos mg/L								
Nº de cultivo	AB	ISA	TB	IZ	VZ	AN	CAS	PZ	MZ
DMic 062877	2	0,5	0,032	0,5	0,5	0,015	0,064	0,25	0,008
DMic 062878	2	4	0,125	1	4	0,008	0,064	0,5	0,015
DMic 062879	2	0,5	0,5	0,5	1	0,015	0,064	0,25	0,015
DMic 062881	2	1	0,064	0,25	0,5	0,015	0,032	0,25	0,015
DMic 062882	1	0,5	0,064	0,25	0,5	0,008	0,064	0,125	0,008
DMic 083397	2	1	0,015	0,5	1	0,032	0,064	0,125	0,015
DMic 093518	1	1	0,064	0,125	1	0,015	0,032	0,064	0,015
DMic 093519	2	0,5	0,125	0,125	0,25	0,008	0,032	0,032	0,015
DMic 093520	2	2	0,25	0,5	1	0,015	0,032	0,125	0,015
DMic 134311	2	0,25	0,064	0,25	0,5	0,008	0,032	0,125	0,015
DMic 195910	2	1	0,125	0,125	0,5	0,015	0,032	0,032	0,015
DMic 195911	8	2	0,25	0,5	1	0,015	0,032	0,125	0,015
DMic 982945	1	4	0,032	1	2	0,008	0,125	0,25	0,032

Tabla IIId

<i>A. lentulus</i> n=6	Antifúngicos mg/L								
Nº de cultivo	AB	ISA	TB	IZ	VZ	AN	CAS	PZ	MZ
DMic 093640	2	0,5	0,125	0,125	0,5	0,015	0,064	0,064	0,032
DMic 114054	0,5	0,25	0,064	0,064	0,25	0,032	0,5	0,25	0,008
DMic 175587	1	4	0,064	1	4	0,015	0,064	1	0,008
DMic 195904	2	4	0,125	1	2	0,015	0,125	0,125	0,032
DMic 195912	1	0,5	0,125	0,25	0,5	0,032	0,064	0,125	0,032
DMic 196112	0,5	0,5	0,064	0,125	0,5	0,008	0,015	0,125	0,008

Tabla IIIe

<i>A. hiratsukae</i> n=6	Antifúngicos mg/L								
Cepario	AB	ISA	TB	IZ	VZ	AN	CAS	PZ	MZ
DMic 01642	0,5	1	0,125	0,125	0,064	0,015	0,064	0,125	0,015
DMic 134280	0,5	0,125	0,015	0,015	0,25	0,032	0,064	0,015	0,015
DMic 165344	0,25	0,25	0,008	0,125	0,25	0,015	0,125	0,032	0,015
DMic 195905	0,5	0,125	0,008	0,125	0,064	0,015	0,032	0,064	0,015
DMic 195906	0,5	0,125	0,064	0,015	0,125	0,032	0,125	0,125	0,015
DMic 216415	0,5	0,125	0,008	0,125	0,064	0,015	0,032	0,064	0,015

Anexo IV

Alineamiento de las secuencias del fragmento de 58 pb del gen *CaM* seleccionado para la técnica de qPCR- HRM. Se incluyen secuencias de diferentes cepas de referencia de *A. fumigatus*, obtenidas de GenBank y las secuencias generadas en este trabajo para los aislados de *A. fumigatus* estudiados. Sobre la secuencia correspondiente a *A. fumigatus* NRRL 163^T, se indica la posición de los primers diseñados (marcado en color gris).

	10	20	30	40	50	60
<i>A. fumigatus</i>						
NRRL 163 ^T	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
NRRL 164	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
NRRL 165	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
NRRL 4661	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
NRRL 5517	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
NRRL 5587	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
NRRL 6113	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
NRRL 62427	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
NRRL 62428	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
CBS 487.65	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
KACC 41145	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
KACC 41146	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
KACC 41191	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
ATCC MYA3627	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
ATCC MYA3626	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
ATCC MYA4609	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 00293	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 00371	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 083241	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 093603	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 114104	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 144729	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 165183	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 165251	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 175537	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 195899	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 195900	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 195907	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 195908	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 195913	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 216474	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 84049	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 951741	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					
DMic 993316	C A C C A A G G G A A T T G G G C A C T G T A A T G C G C T C T C T G G G C C A G A A C C C T T C C G A G T C A G A G C T					