

Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Medicina

Maestría en Micología Médica

2014

**ENFERMEDAD PULMONAR POR *Aspergillus*
spp.:
DISTRIBUCION DE ESPECIES Y SENSIBILIDAD
FRENTE A ANTIFUNGICOS**

María de las Mercedes Romero

Director: Dra. Alicia Irene Arechavala

Co-Director: Dra. Gabriela María Santiso

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Desde un profundo agradecimiento, quiero dedicarle este trabajo a los grandes maestros que Dios ha puesto en mi camino. A mis padres que son mis maestros en la vida, que me enseñaron el valor de la honestidad, el esfuerzo y el trabajo, y a mis maestros de la micología, que con dedicación y generosidad me han contagiado su pasión y me han transmitido sus conocimientos, Ricardo Negroni, magnánimo profesor, Alicia Arechavala, siempre dulce pero rigurosa, Gabriela Santiso, que con cariño de amiga y paciencia de madre me acompañó en mi aprendizaje y mi trabajo, Ariel Gianecinni, que fue mi guía en mis primeros pasos, Roxana Depardo, Fernando Messina, Mario Bianchi, Elena Maiolo, Laura Walker, y el resto del equipo de micología del Muñiz, que tanto me han enseñado.

Gracias a todas aquellas personas que afectuosa y desinteresadamente me ayudaron a realizar este trabajo, mis queridas colegas que me cedieron sus cepas, Silvana Cataldi, Eugenia Ochiussi, Karina Ardizzoli y Gloria Pineda; gracias a Gustavo Ayala, que incansablemente me preparó cuantos medios necesité, y gracias a mis amigos y a Diego, mi gran amor, por su apoyo incondicional.

Finalmente gracias a Patricia Santos que con cariño y confianza me abrió sus puertas dándome la posibilidad de continuar mi camino en la micología.

INDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	8
Justificación.....	24
Hipótesis.....	29
Objetivos.....	30
Materiales y Métodos.....	31
Resultados.....	47
Discusión.....	59
Conclusiones.....	64
Bibliografía.....	68

RESUMEN

Las especies del género *Aspergillus* incluyen a hongos filamentosos ambientales ubicuos de distribución mundial, que se desarrollan sobre materia orgánica en descomposición, produciendo conidios que se aerosolizan fácilmente. Cotidianamente inhalamos miles de conidios sin que esto represente complicación alguna, excepto para una minoría de individuos para quienes la infección por estos microorganismos tiene una marcada morbilidad y mortalidad. Esto sucede ya que el cuadro clínico de la aspergilosis está determinado por la respuesta inmune del hospedador, y puede variar desde una simple respuesta inflamatoria inapropiada que deriva en un cuadro alérgico, hasta infecciones diseminadas cuya tasa de mortalidad puede alcanzar el 100%. La aspergilosis puede definirse entonces como una micosis oportunista, que afecta pacientes neutropénicos, atópicos, oncohematológicos, trasplantados de órganos sólidos y de médula ósea, enfermos con SIDA y pacientes con secuelas por enfermedades pulmonares previas, especialmente tuberculosis, y pacientes con afecciones pulmonares crónicas como aquellos con fibrosis quística.

Aspergillus puede ser un simple colonizante, causar alergia, infecciones localizadas o cuadros graves diseminados. Algunas de las patologías que causa con frecuencia son: sinusitis alérgica, asma, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergilomas, aspergilosis pulmonar invasora, aspergilosis necrosante crónica, y otros cuadros menos frecuentes como onicomycosis, otomicosis, endocarditis, aneurismas micóticos, infección de prótesis vasculares, osteomielitis, endoftalmitis y afección de órganos sólidos.

Aspergillus ha emergido en los últimos años como una importante amenaza para los pacientes inmunocomprometidos. Aunque la especie aislada con más frecuencia continúa siendo *Aspergillus fumigatus*, otras especies como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger* han cobrado importancia en el último tiempo. Cabe destacar que lo que antes se

consideraban especies, en la actualidad son complejos que se incluyen dentro de las denominadas *Secciones*. Así, por ejemplo *A. fumigatus* se encuentra en la Sección *Fumigati*, donde también se incluyen especies como *Aspergillus lentulus* que es más resistente a los antifúngicos.

Para el diagnóstico, se utilizan herramientas clínicas, radiológicas, histológicas y de laboratorio. Dentro de estas últimas se destaca el estudio micológico de distintas muestras clínicas. En ellas, el examen directo en fresco o con una preparación con hidróxido de potasio, en el que observaremos hifas hialinas ramificadas y tabicadas; y el cultivo en medios convencionales para hongos, como Sabouraud. También son útiles las pruebas inmunológicas, las cuales tienen diferente sensibilidad de acuerdo a la forma clínica; se ha visto que tienen especial importancia en las aspergilosis intracavitarias ya que aproximadamente el 90% de los pacientes con esta forma clínica tienen anticuerpos detectables y el 70% en ABPA. Las técnicas más utilizadas son la inmunodifusión en gel de agar y la contrainmunolectroforesis en gel de agarosa. También se puede utilizar el ELISA.

Actualmente, también existen métodos de detección de antígenos, como los galactomananos, muy útiles en las formas invasoras, y métodos de biología molecular con alta sensibilidad y especificidad, aunque estos últimos aún no han sido implementados en el laboratorio de diagnóstico micológico asistencial en nuestro medio.

En cuanto al tratamiento, que será elegido en base a distintos factores relacionados con la forma clínica, el estado del paciente y la especie fúngica implicada, los fármacos más usados son la anfotericina B y los azoles (itraconazol, voriconazol y posaconazol).

Cualquiera sea la forma de presentación, la instauración de un tratamiento temprano y adecuado es crucial para la correcta evolución del paciente. Esto se evidencia, por ejemplo en

el caso de los pacientes con aspergilosis invasora, ya que la tasa de mortalidad de pacientes tratados y no tratados es 50% y 100% respectivamente.

Desde 1990 existen comunicaciones acerca de la resistencia adquirida de *Aspergillus* frente a los azoles, pero con escasa frecuencia. Sin embargo estos datos de resistencia se han incrementado de forma marcada en los últimos años. Lo mismo sucede con la anfotericina B.

La resistencia a los antifúngicos en *Aspergillus* podría ser aún mucho más común de lo que se espera, y por ello, realizar estudios de sensibilidad para conocer la prevalencia de los aislamientos con sensibilidad disminuida a los antifúngicos es valioso y necesario. Hoy en día tenemos la posibilidad de estudiar la sensibilidad ya que el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ha desarrollado métodos de referencia para evaluar la sensibilidad a antifúngicos de hongos filamentosos (documento M38-A2), y, por otro lado, ha definido el concepto de punto de corte epidemiológico (ECV) para diferenciar cepas salvajes de aquellas que presentan sensibilidad disminuida.

Con el objetivo de tipificar y estudiar la sensibilidad a antifúngicos de cepas de *Aspergillus* aisladas de pacientes con aspergilosis o colonización de vías aéreas por dicho hongo, en este trabajo se han utilizado 76 muestras provenientes de 71 pacientes. Las enfermedades de base de dichos pacientes correspondieron a: 47% tuberculosis (actual o pasada), 14% coinfección de HIV y tuberculosis, 4% oncológicos, 17% fibrosis quística, 10% HIV y 8% otras patologías. Las muestras fueron un 76% de esputos, 20% lavados broncoalveolares y 4% biopsias (pulmonares y otras).

Se tipificaron los aislamientos por características macro y micromorfológicas, observándose un 75% de *A. fumigatus*, 8% *A. terreus*, 8% *A. flavus* y 9% *A. niger*.

Luego se estudió el perfil de sensibilidad de los aislamientos por el método de referencia propuesto por el CLSI (microdilución en placa) y se comparó los resultados con los ECV propuestos y publicados por diversos autores. Los antifúngicos estudiados fueron: anfotericina B, voriconazol, itraconazol, posaconazol y albaconazol (a pesar de que no existen aun publicados puntos de corte epidemiológicos para este último). Se observó en la población de *Aspergillus* estudiada un 9,2% de aislamientos con valores de concentración inhibitoria mínima mayores que el ECV para itraconazol, es decir con probable sensibilidad disminuida a dicho antifúngico. Para el resto de los antifúngicos todos los aislamientos resultaron sensibles.

Posteriormente, se realizó la comparación entre la técnica de referencia y una técnica alternativa más sencilla: la difusión en medio sólido (en agar Mueller Hinton) con tiras comerciales con gradiente de concentración de antifúngicos: Etest® (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia). En este caso, los antifúngicos ensayados fueron voriconazol, itraconazol y anfotericina B. La comparación se realizó mediante matrices dinámicas para observar el acuerdo entre técnicas y mediante prueba estadística de concordancia *kappa* (κ). Se vio que la concordancia fue muy buena entre ambas técnicas solo para anfotericina y voriconazol, teniendo en cuenta un error de una dilución entre métodos, adjudicado a la variabilidad inherente a cada técnica.

El estudio de la sensibilidad a antifúngicos es importante en el abordaje de pacientes con aspergilosis, como herramienta para la toma de decisiones apropiadas en cuanto a la terapéutica y también en el aspecto epidemiológico para que podamos conocer la prevalencia de aislamientos con sensibilidad disminuida a los antifúngicos en nuestro medio.

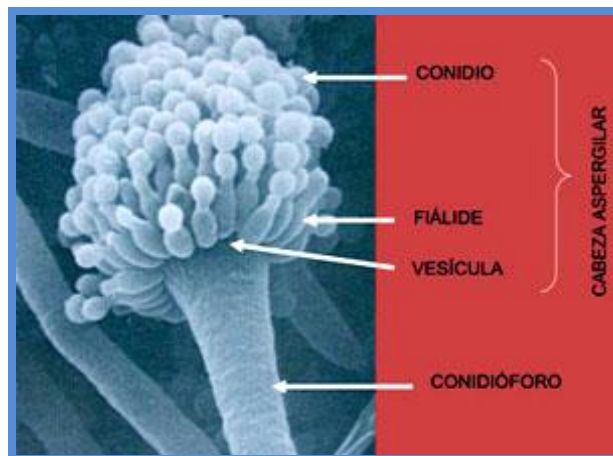
INTRODUCCIÓN

El género *Aspergillus* comprende aproximadamente 180 especies (recordemos que en algunos casos lo que antes se consideraban especies, en la actualidad son complejos que se incluyen dentro de las denominadas Secciones; así, por ejemplo *A. fumigatus* se encuentra en la Sección *fumigati*, donde también se incluyen especies como *A. lentulus* que es más resistente a los antifúngicos (1). Una gran cantidad de *Aspergillus* pueden causar patología en humanos. Entre las especies (o complejos) más frecuentes se encuentran *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Aspergillus nidulans*, y en menor medida otros como *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, y *Aspergillus glaucus*. La clasificación tradicional de especies se basa en las características morfológicas del hongo: tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, y en la presencia de células de Hülle y esclerocios (2).

Son hongos filamentosos, hialinos, ramificados y tabicados, ubicuos, de distribución universal, que se encuentran ampliamente diseminados en el ambiente, que se reproducen con facilidad y están presentes en suelo, agua, plantas y materia orgánica en descomposición.

Aspergillus fue descrito por Micheli y Link en el año 1729, y recibió el nombre por su morfología característica que recuerda el elemento que utilizan los sacerdotes para esparcir agua bendita: del latín “*aspergilium*”.

Imagen obtenida
de la web



La descripción hecha por Micheli de este hongo en su obra *Nova Plantarum Genera*, tiene importancia histórica, al ser reconocido como el punto inicial de la micología.

El género, que actualmente pertenece al Filo *Ascomycota*, Clase *Eurotiomycetes*, Orden *Eurotiales* y Familia *Trichocomaceae*, cobró importancia a partir del año 1729 cuando fue descrito por primera vez implicado en patología humana (3).

Hoy se sabe que los hongos de este género pueden producir una gran variedad de afecciones de gravedad muy variable, desde las que pueden cursar de forma benigna, hasta aquellas que pueden tener una tasa de mortalidad del 100% si no se tratan adecuadamente. Sin embargo, esto depende estrechamente de la respuesta inmune del hospedador, por ello *Aspergillus* actúa como un patógeno oportunista. No representa una amenaza para los huéspedes inmunocompetentes, que inhalan diariamente miles de conidios sin que esto presente complicaciones, sino que debe existir algún defecto en la inmunidad para que pueda desarrollarse la enfermedad o la colonización. Este puede ser leve, como una simple respuesta inflamatoria inapropiada, como el caso de los pacientes atópicos, más grave, como cuadros de inmunosupresión que pueden sufrir pacientes hemato-oncológicos, con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), trasplantados de órganos sólidos, neutropénicos, entre otros, o secundarias a otras patologías, como pacientes con cavidades pulmonares secuelas o pacientes con fibrosis quística (4, 5, 6).

Si bien *Aspergillus* no es un hongo con muchos factores de virulencia reconocidos, su patogenicidad se basa en el pequeño tamaño de sus conidios, que permite que sean aspiradas y causen afección en el pulmón y los senos paranasales; su capacidad de crecer a 37 °C, que lo hace idóneo para afectar al ser humano; su capacidad de adherirse a epitelios y endotelios, su tropismo por los vasos sanguíneos; y la producción de una gran cantidad de compuestos extracelulares que resultan tóxicos para las células humanas.

Tanto la inmunidad innata como la adquirida tienen funciones cruciales en la defensa contra *Aspergillus* spp. Al entrar los conidios en el pulmón tras ser inhaladas, los macrófagos alveolares los fagocitan, liberando una cantidad mínima de citoquinas. Si esta barrera no es efectiva, los conidios germinan a hifas, que constituyen una forma más invasiva, exponen β -glucanos, y entran en juego ahora receptores tipo Toll y de dectina, con la concomitante producción de citoquinas proinflamatorias, y la atracción al sitio de infección del resto de las células de la inmunidad. Los estudios en animales han demostrado que se desencadena una importante respuesta de neutrófilos vital para evitar la evolución a una aspergilosis invasora. Además se produce un gran infiltrado linfocitario. En este punto una respuesta CD4 Th1 sería protectora y una respuesta CD4 Th2 implicaría la imposibilidad de resolver la situación y la consecuente presentación de un cuadro alérgico. La razón por la cual algunos individuos desarrollan respuestas Th2 en lugar de Th1 aún no es bien conocida.

La aspergilosis, patología oportunista causada por *Aspergillus*, comprende entonces un grupo de enfermedades que podrían categorizarse, excluyendo las que se producen por ingestión de alimentos contaminados con sus toxinas (micotoxicosis), en alérgicas, formas de colonización saprofítica y formas invasoras.

Cuando hablamos de enfermedad alérgica, la afección está causada por la interacción del huésped sensibilizado con los antígenos fúngicos inmunológicamente activos. La hipersensibilidad puede ser congénita, y en estos casos *Aspergillus* sólo actúa como lo harían otros antígenos ambientales, ocasionando desde una rinitis alérgica hasta cuadros graves de asma, que se acompaña de títulos elevados de IgE; o puede producirse por exposición a grandes inóculos de los propágulos del hongo, como sucede con las personas que trabajan en contacto con almacenes de granos por ejemplo, y en estos casos se constata un aumento de IgG. Las afecciones que categorizamos como alérgicas, se producen generalmente en el árbol

respiratorio, pero en ausencia de invasión de micelio al tejido; las formas clínicas que comprenden son:

- ◆ Alveolitis extrínseca: se presenta generalmente en individuos inmunológicamente reactivos que trabajan expuestos a grandes inóculos de conidios y desechos fúngicos. En este grupo se incluye el conocido “pulmón de granjero”. El cuadro se manifiesta con tos, disnea, fiebre y escalofríos y se producen unas pocas horas post-exposición. El daño pulmonar puede ser irreversible si la exposición es continua y el paciente no recibe tratamiento, traduciéndose en fibrosis intersticial y engrosamiento de la pared alveolar por la presencia de infiltrados plasmocitarios y eosinófilos. En general se observa un título elevado de anticuerpos séricos que pueden ser detectados por las técnicas convencionales.
- ◆ Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA): puede considerarse una forma extrema de asma causada por *Aspergillus* spp. La enfermedad se manifiesta con una intensa respuesta Th2 en los pulmones y la producción de altos niveles de IgE e IgG específicas. El síndrome se caracteriza por bronquiectasias, asma, infiltrados pulmonares, e incluso fiebre y hemoptisis. La prevalencia es de 1 a 2% en pacientes asmáticos, y de 16 a 25% en pacientes con fibrosis quística. El diagnóstico se alcanza por una combinación de parámetros clínicos, radiológicos (infiltrados pulmonares y bronquiectasias) y de laboratorio. Los pacientes suelen tener “prick-test” positivo, niveles de IgE e IgG específicas elevados, y suelen expectorar tapones mucosos que contienen hifas, eosinófilos y cristales de Charcot-Leyden, que pueden ser observados en los estudios micológicos.
- ◆ Sinusitis alérgica: es una sinusitis inflamatoria recurrente pero no invasora que ocurre como una respuesta alérgica local a la infección por *Aspergillus*. A esta patología se asocian pólipos nasales, cristales de Charcot-Leyden, prueba cutánea positiva con

antígenos de *Aspergillus* y bajos títulos de anticuerpos específicos. En el moco se observa una gran cantidad de eosinófilos.

Cuando hablamos de formas patogénicas (que incluye formas de colonización y formas de invasión), nos referimos a manifestaciones de base infecciosa, donde los agentes causales son los propágulos del hongo, que en este caso actúan de forma oportunista. Aquí debemos considerar:

- ◆ Aspergiloma o aspergilosis intracavitaria. Son bolas fúngicas que crecen en zonas desvitalizadas del pulmón, como puede ser un quiste pulmonar, un área dañada del árbol bronquial (que puede devenir de ABPA), o cavidades secuelas de enfermedades como tuberculosis, sarcoidosis, silicosis, paracoccidioidomicosis, etc. Pueden ser asintomáticas y sólo evidenciarse radiológicamente o pueden provocar cuadros de hemoptisis grave debido a las enzimas proteolíticas que genera el hongo y a la fricción mecánica que provoca la masa fúngica. Lo más habitual es que se encuentren en los lóbulos pulmonares superiores por la relación con cavidades secuelas de tuberculosis. Los pacientes suelen tener serología positiva (7).



Aspergiloma en el área central del campo pulmonar derecho. Imagen tomada de (7).

- ◆ Aspergilosis necrosante crónica (semi-invasora). Es una forma menos común de presentación que se podría pensar como una forma intermedia entre una colonización y una forma invasora. Se caracteriza por inflamación parenquimatosa pero sin invasión de los vasos sanguíneos. Ocurre generalmente en enfermos crónicos con alteración de los mecanismos de defensa pulmonar. Se presenta con tos, expectoración mucopurulenta, fiebre, pérdida de peso y leucocitosis.
- ◆ Aspergilosis invasora. Representa una falla del sistema inmune para controlar localmente la infección, con una tasa de mortalidad que puede alcanzar el 100%, es merecidamente una de las infecciones más temidas en la población de pacientes inmunocomprometidos. Es una enfermedad que depende directamente de la susceptibilidad del huésped, principalmente relacionada con la neutropenia o la falta de funcionalidad de los neutrófilos, por ello los pacientes con mayor riesgo son aquellos con enfermedades neoplásicas, granulocitopenia, y sometidos a corticoterapia por períodos prolongados. En pacientes infectados con virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) se presenta en general con otra patología del árbol bronquial o con funcionalidad defectuosa de los neutrófilos, provocando una invasión exacerbada, aunque algunos autores encuentren controvertida la asociación entre SIDA y aspergilosis invasora.

Esta forma de aspergilosis es la más grave y fatal, se la puede definir como una neumonitis necrotizante con invasión de los vasos sanguíneos secundaria a la colonización del parénquima pulmonar. Se suele presentar con fiebre, neumonía, hemoptisis, infarto hemorrágico, abscesos pulmonares múltiples o únicos, invasión de las estructuras contiguas de la cavidad torácica y posterior diseminación a otros sistemas de la economía.

Dentro de los pacientes gravemente inmunocomprometidos, los factores que aumentan el riesgo de muerte por aspergilosis invasora son: trasplante de células madre hematopoyéticas, enfermedad injerto versus huésped, neutropenia prolongada (<500 neutrófilos/ mm^3 durante 2 semanas o más), seropositividad para citomegalovirus, uso prolongado de corticoides, inmunosupresión prolongada, carga fúngica, aspergilosis invasora diseminada, presencia de efusión pleural, recuento de monocitos menor a 120 células/ mm^3 , entre otras (8).

Radiológicamente puede observarse en algunos casos:



Paciente femenina con aspergilosis pulmonar invasora. Imagen tomada de (7).

En la tomografía axial computada (TAC) en aspergilosis invasora, típicamente puede verse:



Signo de la semiluna. Imagen obtenida de la web.



Signo del halo. Imagen obtenida de la web.

17

También debe considerarse la aspergilosis en localizaciones extrapulmonares menos frecuentes (9, 10, 11, 12) como:

- ◆ Aspergilosis del sistema nervioso central
- ◆ Aspergilosis cutánea primaria y secundaria



Aspergilosis cutánea primaria en paciente pediátrico con leucemia que sufrió una inoculación con un material vegetal. Es una manifestación poco frecuente que puede ocurrir en pacientes inmunocomprometidos. El desarrollo es localizado con necrosis del tejido adyacente, angio-invasión (que puede diseminar la infección) y trombosis.

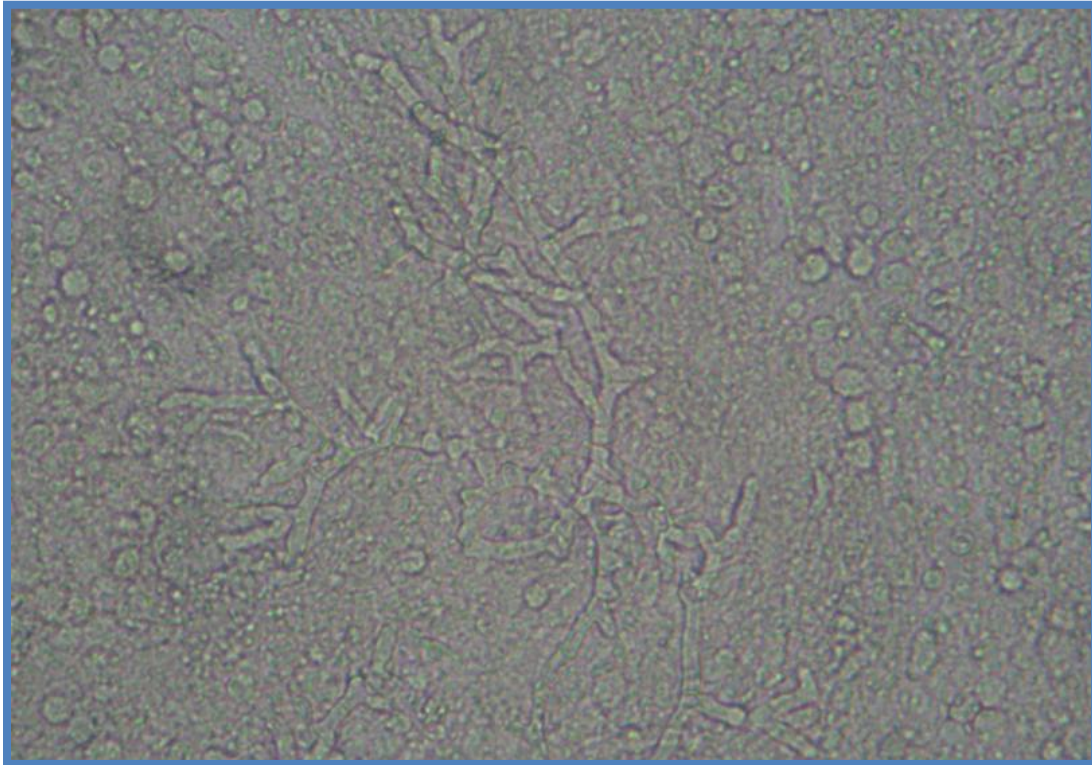
- ◆ Otitis
- ◆ Queratitis y endoftalmitis
- ◆ Endocarditis
- ◆ Aneurismas micóticos
- ◆ Infección de prótesis vasculares
- ◆ Osteomielitis
- ◆ Onicomycosis

El diagnóstico de aspergilosis requiere de varios componentes: clínicos, radiológicos, microbiológicos e histológicos, fundamentalmente para tener herramientas suficientes para jerarquizar a *Aspergillus* como agente causal de la patología en estudio, y descartar su presencia (especialmente en los cultivos) como mero contaminante.

El análisis de diversas muestras obtenidas de las zonas afectadas es muy importante para alcanzar el diagnóstico dentro del amplio espectro de la aspergilosis. Podemos enfrentarnos, dependiendo la forma clínica, a muestras de esputo, lavado broncoalveolar (BAL), biopsias pulmonares o de otros sitios, raspados oftálmicos, secreciones óticas, lavados de senos paranasales, etc.

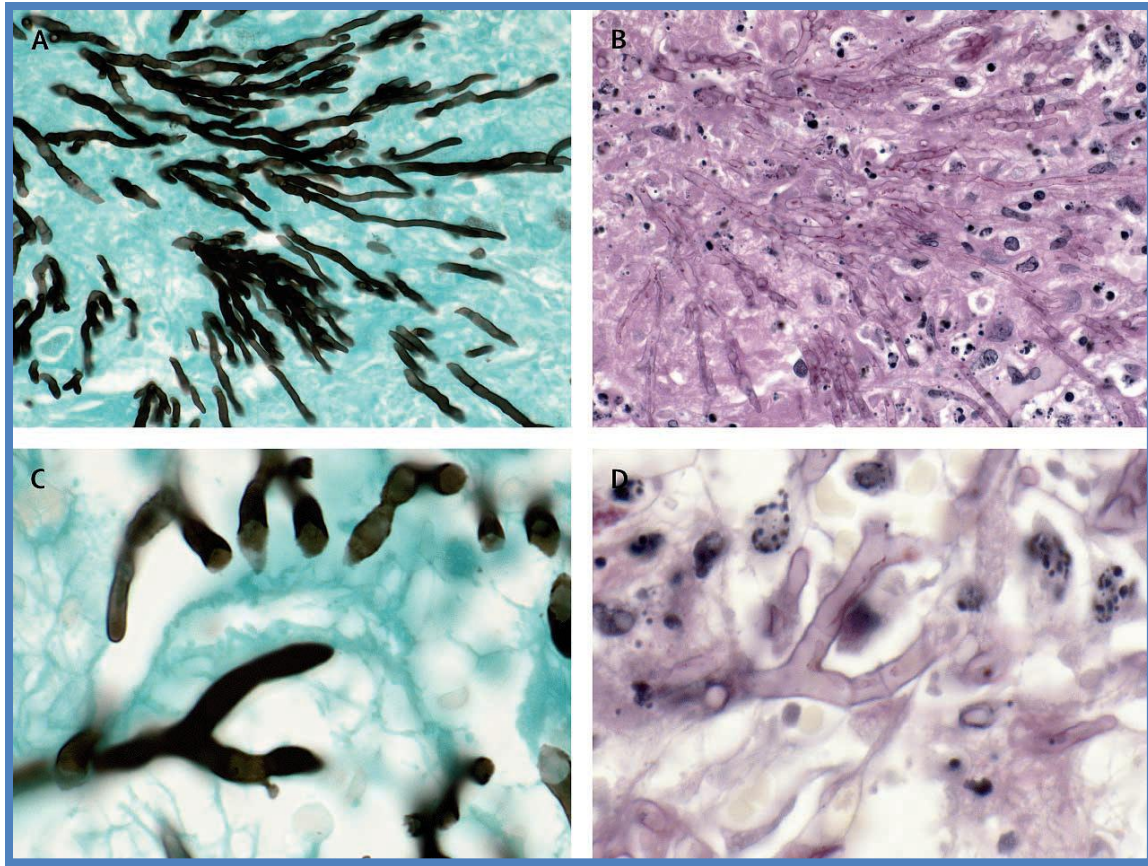
El primer paso para alcanzar el diagnóstico, es realizar el examen directo. Este tiene la ventaja de ser rápido y sensible pero la desventaja es que ante la presencia de hifas no nos permite diferenciar entre *Aspergillus* y otros hongos filamentosos que pudieran estar afectando al paciente. Puede realizarse en fresco o con el agregado de hidróxido de potasio al 10%. Posteriormente es muy útil realizar tinciones específicas para hongos como la de metenamina de plata de Gomori-Grocott para aumentar la sensibilidad. También existen técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia e hibridización in-situ, que aumentan notablemente

la sensibilidad y especificidad pero lamentablemente son costosas y su disponibilidad es limitada.



Examen directo en fresco de una muestra de lavado broncoalveolar de un paciente con aspergilosis.

Cuando fuera posible, por las características del material en estudio, es de gran valor contar con estudios histológicos. En este caso, cuando los cortes revelan hifas invadiendo el tejido y luego se recupera el hongo en el cultivo se está en presencia de un diagnóstico definitivo. En los cortes histológicos, *Aspergillus* aparece típicamente como hifas tabicadas con ramificaciones dicotómicas en ángulo de 45° (aunque como se dijo antes, no se puede aseverar su identidad hasta que se obtenga en el cultivo, por el riesgo de que se trate de otro hongo filamentoso).



Apariencia de Aspergillus spp. en los cortes histológicos. (A) tinción de Gomori Grocott en un pulmón de ratón con aspergilosis invasora experimental (x400). (B) corte similar con tinción de PAS (x400). (C) y (D) muestran la ramificación típica de las hifas de Aspergillus spp. (x630). Imagen tomada de (13).

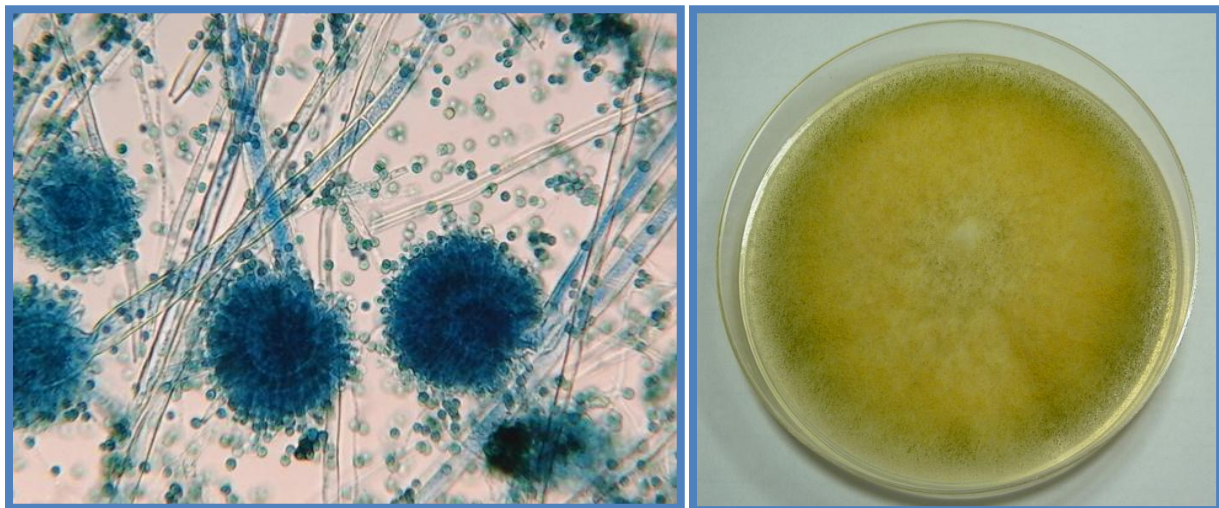
El cultivo es una de las herramientas más valiosas, pero siempre debe interpretarse cuidadosamente en el contexto clínico del paciente. Asimismo, el valor predictivo positivo, por ejemplo para aspergilosis invasora en una muestra respiratoria, será mayor cuanto mayor sea el grado de inmunosupresión del paciente.

Además el cultivo, que puede efectuarse en los medios convencionales para hongos (como Sabouraud) ya que no tiene requerimientos nutricionales específicos, permite hacer posteriormente la tipificación del agente causal. Esta se realiza tradicionalmente, por un exhaustivo análisis macroscópico de la colonia y micromorfológico en preparados por disociación, montados con azul de lactofenol. Para esto deben tenerse en cuenta, como se ha

mencionado, las variaciones particulares de cada especie dentro de las características estructurales típicas del género.

La tipificación de especie es de marcada importancia dado que no todas las especies afectarán al paciente de la misma forma, ni tienen el mismo perfil de sensibilidad a los antifúngicos. Por ello, realizar la tipificación del *Aspergillus* aislado en el cultivo, es un dato de valor especialmente en la actualidad, ya que se ha visto un aumento de la incidencia de otras especies diferentes de *A. fumigatus*.

La obtención del agente etiológico en el cultivo permite, además, realizar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.



*A la derecha cultivo en colonia gigante para un mejor análisis de las características macromorfológicas. A la izquierda, observación micromorfológica de un cultivo de *Aspergillus flavus* en un montaje con azul de lactofenol.*

Otro elemento útil para el diagnóstico son las pruebas serológicas. Se ha visto que tienen especial importancia en las aspergilosis pulmonar crónica, intracavitaria (aproximadamente 90% de los pacientes con esta forma clínica presentan resultados positivos) y en ABPA (70%

suelen ser positivos). Las técnicas más utilizadas son la inmunodifusión en gel de agar y la contrainmunolectroforesis en gel de agarosa (14).

En el caso de aspergilosis invasora, lo que se utiliza para contribuir al diagnóstico (incluso de forma anticipada) es la detección de antígenos. Los más utilizados actualmente son los galactomananos.

Los galactomananos son un componente de la pared celular del género *Aspergillus* (no exclusivamente), que constituye el principal exoantígeno liberado durante la angioinvasión. Si bien no se conoce con exactitud la cinética de su liberación, se cree que está influida por factores como la fase de crecimiento, el microambiente, el “status” inmunológico del paciente y la patología en curso. En los últimos años ha habido un avance importante en la comprensión de la utilidad del estudio de los galactomananos, hasta el punto tal en que hoy por hoy se consideran un elemento fundamental para el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento de pacientes inmunosuprimidos con riesgo o con diagnóstico de aspergilosis invasora.

En general se utiliza su detección en suero (la recomendación es realizarlo en dos muestras pareadas) y lavado broncoalveolar. La técnica para detectar los antígenos galactomananos es un ELISA doble sandwich que emplea un anticuerpo monoclonal de rata (EBA-2) dirigido contra el galactomanano de *Aspergillus*, que es utilizado como captor y detector del antígeno. Es una técnica sensible, reproducible y rápida, pero que no se encuentra disponible en todos los centros de salud (15).

Otros marcadores biológicos cuya detección puede utilizarse para el diagnóstico de aspergilosis invasora son los (1-3)- β -D-glucanos, pero estos no son específicos de *Aspergillus* sino que pueden presentarse en pacientes con diversas micosis (candidiasis, aspergilosis, neumocistosis, entre otras), por ello su resultado debe ser interpretado con especial cautela.

Por último, la biología molecular ha aportado mucho en el diagnóstico de la aspergilosis. La PCR es la prueba más usada, con la desventaja de que puede arrojar falsos positivos por la ubicuidad de *Aspergillus* (13).

El tratamiento de la aspergilosis gira en torno de la anfotericina B y los compuestos azólicos y en menor medida pueden considerarse a las equinocandinas, y depende estrechamente de la forma clínica de presentación.

Para el caso de la aspergilosis invasora es de crucial importancia el inicio precoz del tratamiento antifúngico en pacientes con diagnóstico confirmado o en aquellos con una presunción contundente y el diagnóstico en curso. En la mayoría de los casos, se recomienda el uso de voriconazol por vía oral o endovenosa (dependiendo del estado del paciente) para el tratamiento primario. En algunos casos, la anfotericina B liposomal puede considerarse una alternativa, aunque se ha visto que no resulta tan efectiva como el primero. Por otro lado, también debe considerarse la resección quirúrgica del tejido infectado con *Aspergillus* en pacientes con lesiones contiguas a los grandes vasos o el pericardio, lesiones que causan hemoptisis de un foco único y lesiones que causan erosión dentro del espacio pleural o en las costillas. La duración del tratamiento antimicótico de la aspergilosis pulmonar invasora no está bien definida. En general, se recomienda que se prolongue durante un mínimo de 6 a 12 semanas o durante todo el período de inmunosupresión y hasta que se resuelvan las lesiones (16, 17, 18).

La profilaxis antifúngica con posaconazol es recomendable en receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas con enfermedad injerto versus huésped y en pacientes con leucemia mieloide aguda o síndrome mielodisplásico, todos con un riesgo alto de contraer aspergilosis invasora. En nuestro país dado que el acceso al posaconazol es limitado, suele

utilizarse voriconazol. Es probable que el itraconazol también fuera eficaz pero la tolerancia limita su empleo.

En las formas pulmonar crónica e intracavitaria de la aspergilosis la terapia antimicótica se realiza con itraconazol, voriconazol o posaconazol. Aquí también es probable que una intervención quirúrgica o el tratamiento antimicótico localizado en la lesión, resulten apropiados en algunos pacientes. Para la aspergilosis pulmonar cavitaria crónica, es necesario un tratamiento prolongado e incluso permanente.

En las formas alérgicas es preciso que el tratamiento sea una combinación de itraconazol con corticosteroides (13, 19).

Cualquiera sea la forma de presentación, la instauración de un tratamiento temprano y adecuado es crucial para la correcta evolución del paciente (20, 21).

Dada la creciente información en los últimos 25 años acerca de la aparición de aislamientos con sensibilidad disminuida a los antifúngicos, el estudio de la sensibilidad *in vitro*, es una herramienta fundamental para la elección del tratamiento correcto.

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ha desarrollado métodos para evaluar la sensibilidad a antifúngicos de hongos filamentosos (22, 23), y, por otro lado, ha definido el concepto de punto de corte epidemiológico (ECV) para diferenciar cepas salvajes de aquellas que presentan sensibilidad disminuida. Diversos autores han publicado ECV para las especies de *Aspergillus* más frecuentes. Esto nos permite entonces, estudiar los aislamientos de pacientes con aspergilosis para conocer su pronóstico, predecir posibles fallas de tratamiento y promover la instauración de la terapia adecuada. Desde el punto de vista epidemiológico nos

permite conocer la distribución de cepas salvajes y mutantes (con resistencias adquiridas) dentro de las diferentes especies, en nuestro medio (24, 25, 26).

Sin embargo, el método de referencia propuesto por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a antifúngicos de hongos filamentosos, microdilución en medio líquido, resulta laborioso y requiere de insumos específicos, tiempo y personal entrenado. Por esta razón, existen múltiples investigaciones con el propósito de encontrar técnicas alternativas más sencillas que arrojen resultados confiables, para aumentar la accesibilidad a los estudios de sensibilidad (27, 28, 29, 30).

JUSTIFICACIÓN

Los hongos del género *Aspergillus* han emergido en los últimos años como una importante amenaza para los pacientes inmunocomprometidos; por su capacidad de causar una amplia variedad de enfermedades, desde simples cuadros alérgicos hasta aspergilosis invasora, con una tasa de mortalidad que puede alcanzar el 100% si no se toman las medidas terapéuticas necesarias.

Aunque la especie aislada con más frecuencia continúa siendo *Aspergillus fumigatus*, otras especies como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger* han cobrado importancia en el último tiempo (31, 32).

En la aspergilosis, la progresión del cuadro clínico suele ser diferente según la enfermedad de base del paciente, la especie fúngica involucrada y el tratamiento instaurado; de allí surge la importancia de conocer la tipificación a nivel de especie y la sensibilidad a los antifúngicos por la posible presencia de resistencia intrínseca o adquirida a los mismos (33).

En el manejo de la aspergilosis, cualquiera sea su forma clínica, los azoles juegan un papel crucial, especialmente en los casos graves (34). Desde 1990 existen comunicaciones acerca de la resistencia adquirida de *Aspergillus* frente a los azoles, pero con escasa frecuencia. Estos datos de resistencia se han incrementado de forma marcada en los últimos años, especialmente para *A. fumigatus*. Lo mismo sucede con la anfotericina B. Por ello, interpretar a todas las cepas como “salvajes” nos abre un margen de error que debemos evitar (35, 36).

La resistencia a los antifúngicos complica el manejo de los pacientes y por tanto se necesita avanzar en el conocimiento en este tema (37). La emergencia de la resistencia a itraconazol es actualmente una preocupación, así como la diseminación de la resistencia cruzada a múltiples azoles, que no parece tan lejana como se creía, y que tendría consecuencias devastadoras.

Por el momento, el mayor riesgo que nos acecha respecto a este tema es la incertidumbre y el desconocimiento. No se conoce cuál es la verdadera incidencia de la resistencia, sus alcances, y el impacto que tiene en la evolución clínica de los pacientes (38, 39).

La resistencia a uno o a múltiples azoles como problema emergente, aunque la información es escasa, está siendo crecientemente reconocida como causa de falla de tratamiento en pacientes con aspergilosis, tanto por experiencia en casos clínicos, como por experimentos con modelos animales.

El mecanismo de acción de los azoles, independientemente de su estructura química y sus propiedades, está basado en la interferencia con la actividad de la lanosterol 14 α -demetilasa, una enzima codificada por el gen *Cyp51* en *A. fumigatus*, que es responsable de la transformación del lanosterol en ergosterol, un componente esencial de la membrana citoplasmática fúngica. La inhibición de la formación del ergosterol resulta en la desorganización de la membrana, la formación de compuestos tóxicos y el consecuente detenimiento del crecimiento del hongo. Por lo tanto los azoles se consideran fungistáticos más que fungicidas, y es bien conocido que una presión antimicrobiana fuerte y persistente puede conducir a la selección de clones resistentes, particularmente si el poder de la droga es fungistático más que fungicida (40).

Entonces, podría inferirse que la resistencia adquirida a los azoles se desarrolla en respuesta a la exposición sostenida de los hongos a compuestos azólicos. En base a este supuesto, se han propuesto dos rutas para el desarrollo de resistencia: exposición a azoles en el paciente, o exposición de *Aspergillus* a componentes azólicos en el ambiente y la consecuente resistencia cruzada a los azólicos de uso clínico.

Los factores que influyen el desarrollo de la resistencia lógicamente incluyen: larga duración de la exposición a drogas y gran número de organismos en reproducción (y en consecuencia un

alto inóculo). En pacientes con aspergilosis estas características se presentan en individuos que reciben tratamientos prolongados y, principalmente, en individuos con cavidades preformadas. Esto se debe a que dentro de la cavidad el hongo se reproduce asexualmente por esporulación, lo que facilita la transmisión de genes mutados a las esporas. Por lo tanto, es en este grupo de pacientes en el que se han comunicado la mayor cantidad de casos de resistencia (41).

Experimentalmente, se han realizado estudios *in vitro* exponiendo a aislamientos de *Aspergillus* a dosis crecientes de antifúngicos azólicos de uso clínico, verificando la adquisición de resistencia (no siempre con presencia de mutaciones específicas), y también estudios retrospectivos con la evidencia de pacientes que han desarrollado resistencia intra-tratamiento en terapias prolongadas con azólicos.

La transmisión persona a persona en aspergilosis es muy poco frecuente, comunicada solo en casos particulares. Generalmente, un paciente que responde a la terapia se repone a la infección y no tendría capacidad de infectar otros individuos; y, por otro lado, la alternativa de la transmisión de un aislamiento después de la muerte parece improbable. Por lo tanto, podría decirse que la adquisición de resistencia a los azoles en pacientes, no podría diseminarse entre una población susceptible. Sin embargo, si pensamos en la presencia de especies de *Aspergillus* con resistencias adquiridas en el ambiente, se debería considerar un gran factor de riesgo para la aspergilosis grave en huéspedes inmunocomprometidos.

Se han recuperado del ambiente *Aspergillus* resistentes a los azoles, indicando que lo antes expuesto es factible. Además, se han observado *Aspergillus* resistentes a los azoles con mutaciones en pacientes que nunca habían recibido azoles, lo que apoya el origen ambiental de la resistencia (42, 43).

Existen trabajos experimentales *in vitro* en los que se expusieron progresivamente un número de aislamientos a Prochloraz, un azólico de uso en la agricultura, y se vio que a medida que aumentaba la resistencia a este químico, simultáneamente aumentaba la resistencia cruzada a los azólicos de uso clínico. Luego, la infección con una cepa resistente a los azoles, estaría más asociada con fracaso terapéutico que una cepa salvaje (44).

Los mecanismos de resistencia están mejor estudiados en *A. fumigatus* e implican mutaciones en el gen *Cyp51*, mecanismos de eflujo y de sobreexpresión de *Cyp51*. Las mutaciones específicas pueden resultar en resistencia a uno, dos o los tres triazoles (45).

De todas formas aun es poco claro el modo en que el *Aspergillus* adquiere la resistencia del ambiente o del paciente que infecta; esto se debe a que muy pocas cepas resistentes han sido estudiadas en detalle, en general, los estudios publicados simplemente describen casos puntuales.

La resistencia a los triazoles en *Aspergillus* podría ser aún mucho más común de lo que se espera y por ello los laboratorios de microbiología deberían probar la sensibilidad *in vitro* de los aislamientos clínicamente relevantes.

Los estudios de vigilancia indican que la prevalencia de resistencia varía ampliamente entre países. En Holanda, por ejemplo, el porcentaje de pacientes infectados por *Aspergillus* resistentes a los azoles es de 12%. La mayoría tienen una mutación “típica” de Holanda en el gen *Cyp51* que consiste en una sustitución aminoacídica en L98H y la inserción de una repetición en tándem de 34pb en el promotor del gen. El uso de los azoles en la agricultura se ha propuesto como la fuente de estos aislamientos resistentes.

También se ha observado la resistencia a los azoles, aunque esporádicamente, en Francia, India, Japón, China, Dinamarca, Suiza, Noruega y Alemania, pero con valores de prevalencia

entre 0 y 5% (46). En nuestro país no se conocen los valores de prevalencia de aislamientos con resistencia o sensibilidad disminuida a los antifúngicos, dado que no es común que se desarrollen estudios de sensibilidad a hongos filamentosos en los laboratorios de rutina, sumado a que la aspergilosis no tiene una frecuencia de aparición elevada como para alcanzar en un solo centro de salud, un número significativo de aislamientos para sacar conclusiones fidedignas y representativas (47, 48).

Otra cuestión interesante es que los países desarrollados presentan porcentajes de resistencia marcadamente mayores para voriconazol y para posaconazol que para itraconazol (para *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus*, no así para *A. versicolor*). Evidentemente existe una relación estrecha entre la distribución de la resistencia y las conductas terapéuticas y profilácticas de cada país. Esto favorecería la idea de que el desarrollo de resistencia estaría directamente influenciado por el uso indiscriminado de azólicos de aplicación clínica (40).

Para alcanzar la verdadera dimensión de la resistencia en *Aspergillus*, debería realizarse un estudio de sensibilidad en todos los aislamientos de pacientes con infección por *Aspergillus*. Especialmente en pacientes con infecciones graves para considerar una terapia alternativa en áreas geográficas donde exista una alta prevalencia de aislamientos ambientales resistentes.

Por tanto además de incorporar el estudio de la sensibilidad a la práctica clínica de rutina, sería bueno contar con información epidemiológica acerca de los aislamientos ambientales de la región para inferir en la posible emergencia de resistencias cruzadas, lo que se traduciría en riesgo mayor de adquirir una cepa resistente en el caso de los pacientes inmunocomprometidos.

Deberían desarrollarse estudios de vigilancia en ámbitos clínicos y ambientales, para conseguir información actualizada respecto de los perfiles de sensibilidad frente a los antifúngicos.

HIPÓTESIS

- Si bien *Aspergillus fumigatus* es la especie más frecuentemente aislada de los pacientes con diversas presentaciones de aspergilosis, existe una contribución considerable por parte de otras especies del género.
- El examen directo en fresco de las muestras de pacientes con afección por *Aspergillus* spp. tiene un alto grado de correlación con lo obtenido posteriormente en el cultivo y por ello constituye un elemento fundamental en el diagnóstico.
- Circulan en nuestro medio cepas con sensibilidad disminuida a los antifúngicos y esto se encuentra relacionado con la especie implicada y el cuadro clínico y se evidencia en la evolución del paciente.
- El estudio de la sensibilidad de *Aspergillus* spp. frente a antifúngicos puede abordarse en el laboratorio de rutina por técnicas más sencillas que las de referencia (microdilución en caldo descripta en el documento M38-A2 del CLSI) con una buena concordancia entre ambas.
- El estudio de la sensibilidad a antifúngicos de especies de *Aspergillus* es una herramienta importante para el manejo de los pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo general: Tipificar aislamientos clínicos de *Aspergillus* de pacientes con aspergilosis o colonización de vías aéreas por dicho hongo y estudiar su sensibilidad a los antifúngicos.

Objetivos específicos:

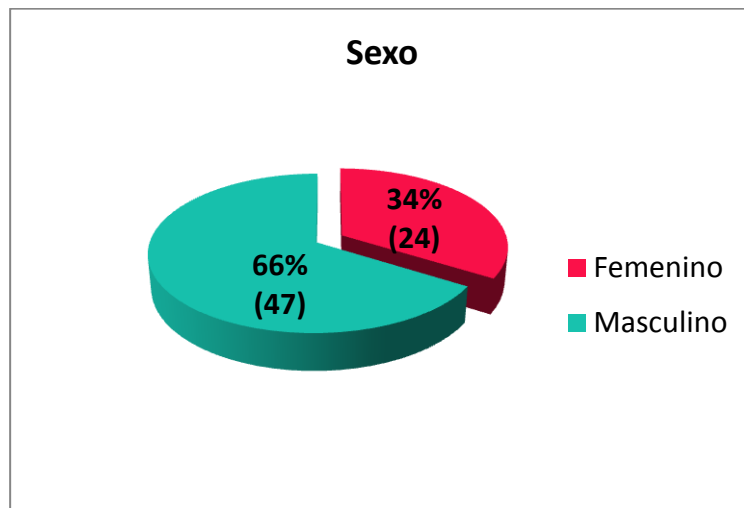
- Estudiar la distribución de especies de *Aspergillus* aislados de muestras clínicas en nuestro medio.
- Relacionar la especie fúngica con la enfermedad de base del paciente.
- Conocer la correlación entre el examen directo de las muestras clínicas y lo obtenido en el cultivo en pacientes con enfermedad o colonización por *Aspergillus* spp.
- Conocer el perfil de sensibilidad de los aislamientos de *Aspergillus* en forma general y particular de cada especie.
- Relacionar el perfil de sensibilidad con la enfermedad de base del paciente.
- Evaluar la concordancia entre el método de referencia para el estudio de la sensibilidad de *Aspergillus* frente a antifúngicos (microdilución en caldo, documento M38-A2 del CLSI) y el método de difusión en medio sólido con tiras Etest®, para considerar la aplicabilidad de este último.
- Estudiar la influencia de la sensibilidad a antifúngicos en la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.
- Comprobar la importancia del estudio de la sensibilidad como dato diagnóstico y pronóstico.

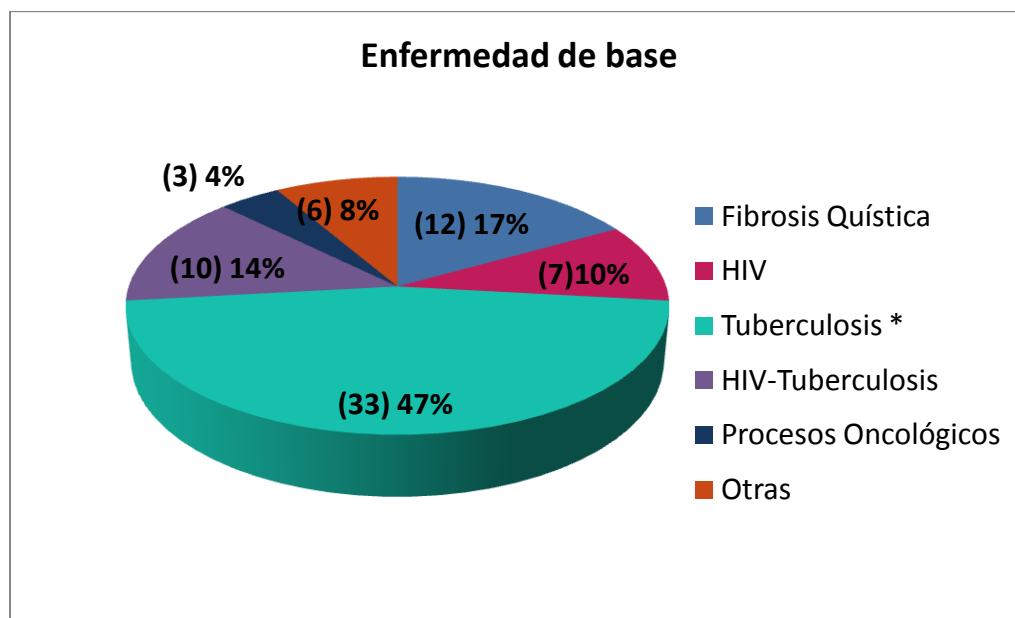
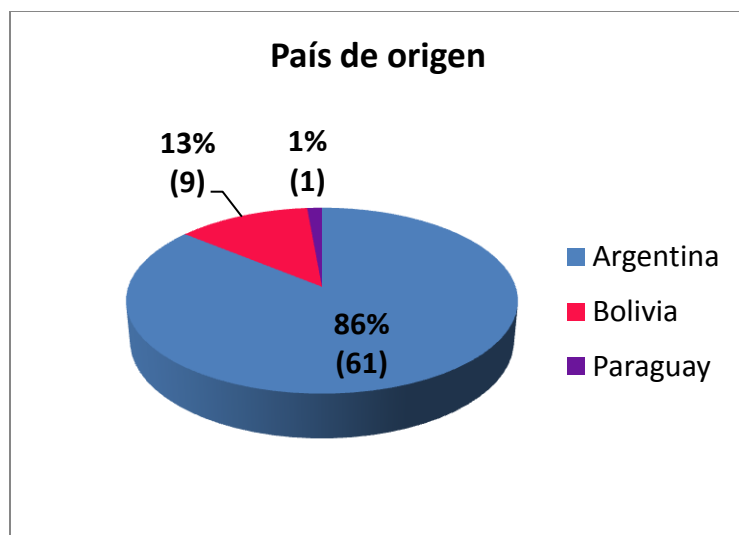
MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se utilizó una población de 76 aislamientos de *Aspergillus* spp. de cepario, provenientes de 71 pacientes con aspergilosis o colonización de vías aéreas por *Aspergillus* (5 pacientes tuvieron 2 muestras de episodios clínicos diferentes).

Cincuenta y seis pacientes fueron atendidos en el Hospital de Infecciosas F. J. Muñiz de la ciudad de Buenos Aires, 1 paciente en el Hospital Austral de Buenos Aires, 1 en el Hospital Carlos G. Durand de Buenos Aires, 12 en el Hospital Rossi de La Plata y 1 en el Hospital Municipal de Morón, provincia de Buenos Aires. Todos fueron atendidos entre el 01/01/2012 y el 31/12/2013.

Del análisis retrospectivo observacional de las historias clínicas de dichos pacientes se obtuvieron los siguientes datos respecto de la población analizada:

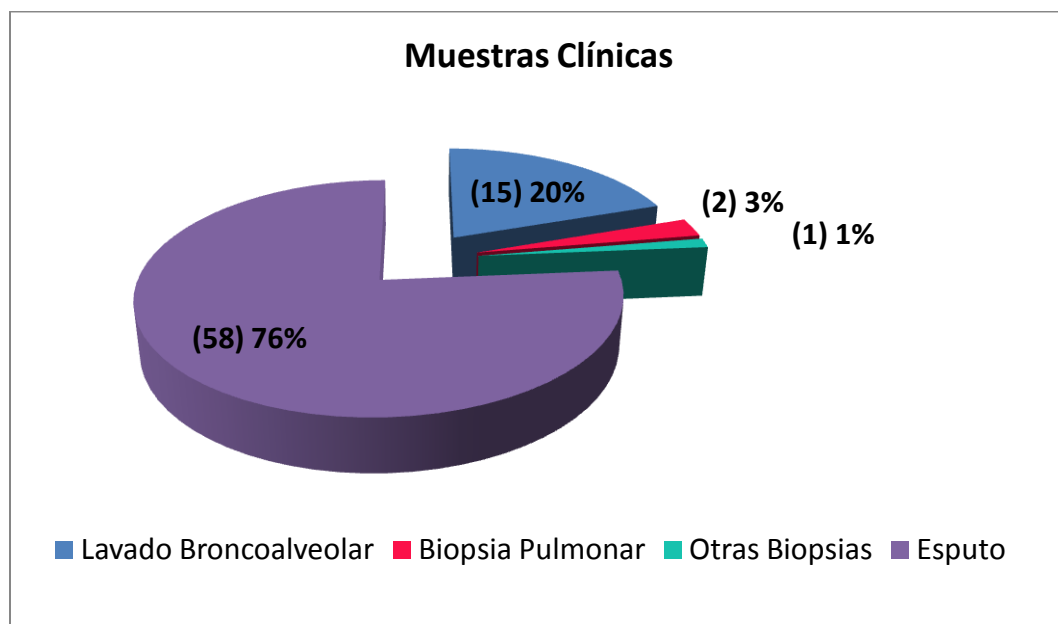




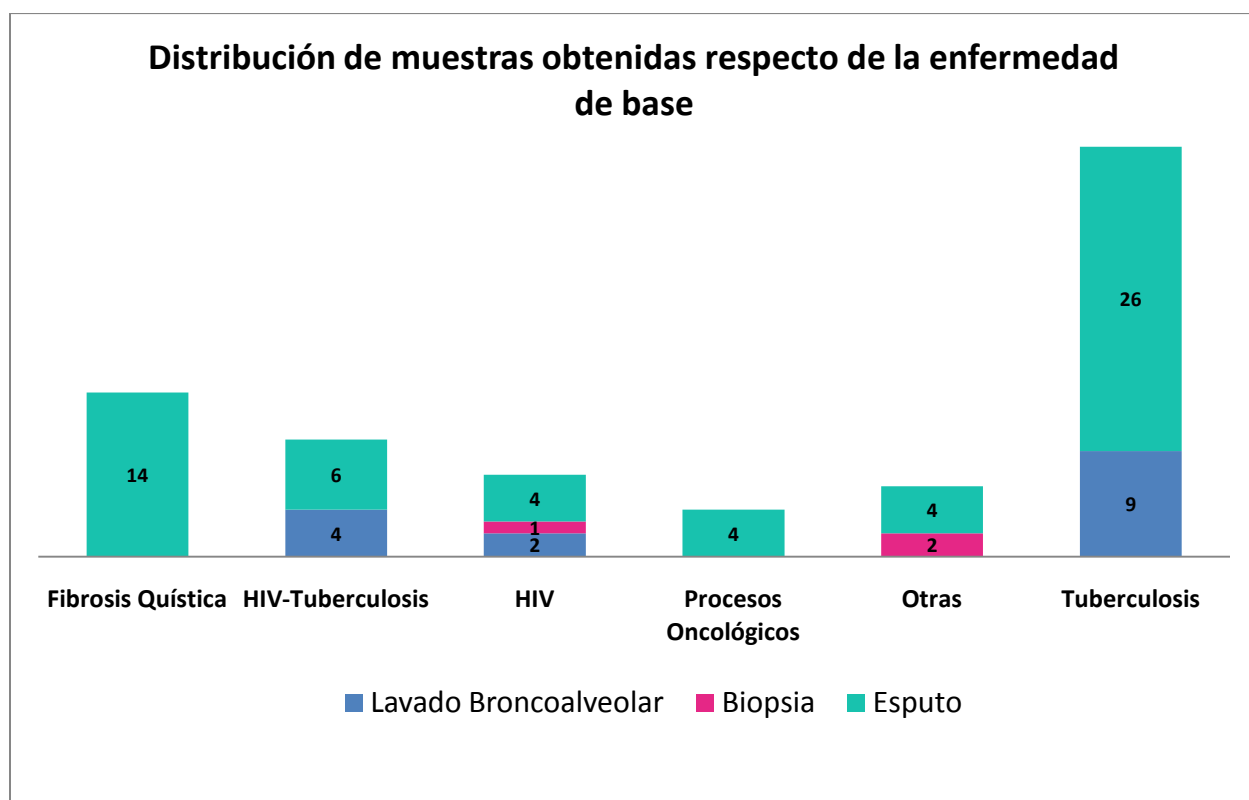
*Enfermedad actual o pasada

La edad media fue de 41 años, la mediana 47, con un rango entre 17 y 84 años (12 pacientes sin datos).

Las muestras clínicas (76) obtenidas fueron:



Y la distribución de dichas muestras entre los pacientes:



En todos los casos los materiales habían sido analizados de acuerdo a la rutina de estudio micológico de muestras clínicas, que incluye examen directo (observación microscópica en fresco) y cultivo en medios convencionales para hongos (49).

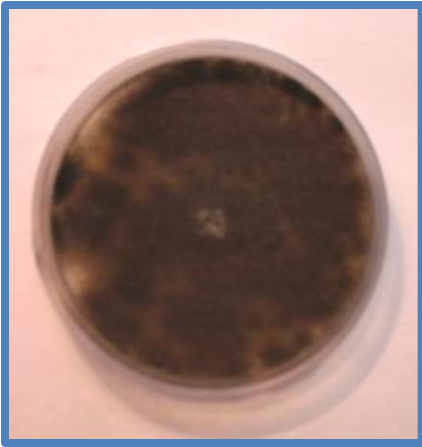
Se revisaron los resultados registrados de los exámenes directos de las muestras estudiadas y fueron clasificados como “positivos” en el caso de observarse filamentos fúngicos hialinos, ramificados y tabicados, (compatibles con *Aspergillus* spp.) y “negativos” frente a la ausencia de los mismos.

Los cultivos fueron jerarquizados cuando se observó desarrollo de *Aspergillus* sp. en todos los tubos de siembra (2, 3, o 4 según el caso) y teniendo en cuenta el cuadro clínico del paciente.

La tipificación de los aislamientos se realizó en base a las características macro y micromorfológicas. En cuanto al análisis macroscópico, se consideraron características de la colonia tras el crecimiento en agar Czapek durante 7 días a 28 °C, tales como: diámetro, coloración del anverso y del reverso, presencia de esclerocios, presencia de gotas de exudado, presencia de pigmento difusible y textura. En lo referido a micromorfología, se constataron características microscópicas como: morfología de los conidióforos, forma y diámetro de las vesículas, disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula, longitud y anchura de las métulas y fiálides, forma, diámetro, ornamentación y color de los conidios, presencia de células de Hülle, presencia, forma, tamaño y color de las ascosporas, presencia de esclerocios y cleistotecios (50, 51).

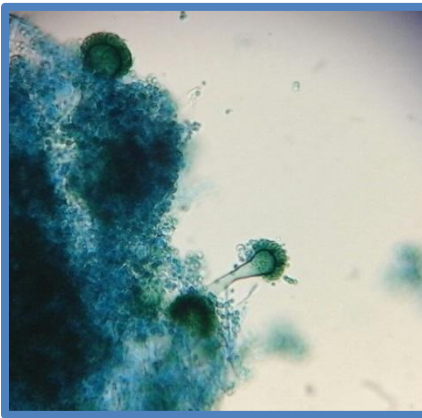
Teniendo en cuenta los criterios antes detallados y las especies más frecuentes en la clínica, las características particulares utilizadas para la tipificación de cada especie fueron:

- *Aspergillus fumigatus* (*Aspergillus* Sección *Fumigati*):



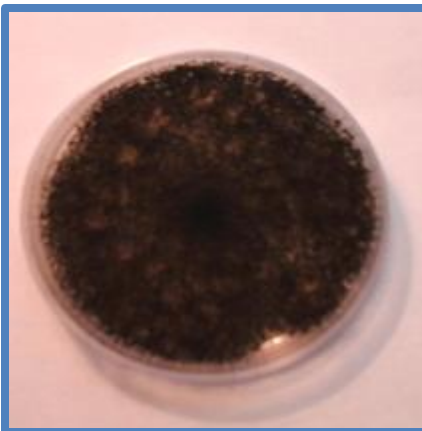
Las colonias son blancas al comienzo y luego se tornan verde azuladas, grises o marrones. Consiste en una densa felpa de conidióforos que adquiere aspecto aterciopelado.

El reverso de la colonia es incoloro.

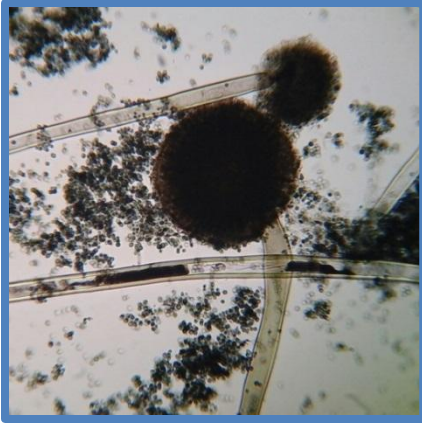


Presentan conidióforo corto, liso, a menudo verde en la parte superior, cabeza conidial columnar, uniseriada, ocupando 2/3 de la vesícula. Los conidios en cadenas compactas, son de color verde, finamente rugosos, globosos o subglobosos y de 2 a 3 mm de diámetro.

- *Aspergillus niger* (*Aspergillus* Sección *Nigri*):

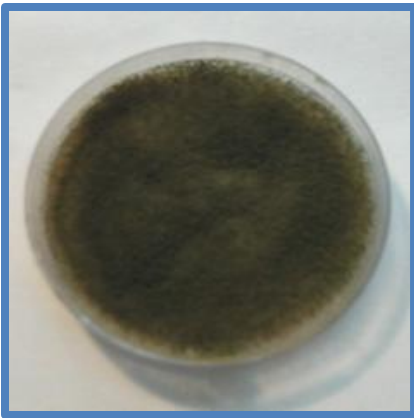


Colonias de rápido desarrollo de color al principio blanco a amarillo, y luego negro. La textura de las colonias es granular. El reverso de la colonia es incoloro o crema.

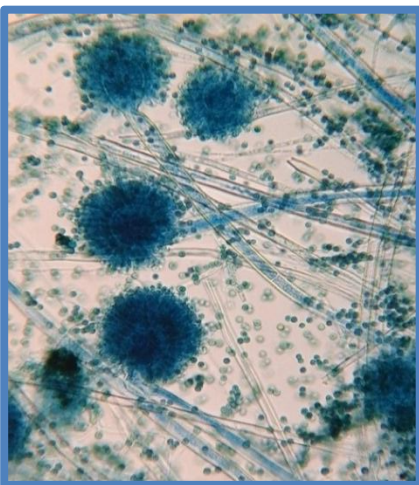


Los conidióforos son de pared lisa, hialina o pigmentada. La vesícula es globosa y produce fiálides alrededor de ella que la cubren completamente de forma radiada y biseriada. Las ramas primarias son largas mientras que las secundarias son cortas. Los conidios son globosos y rugosos, de color castaño o marrón a negro.

- *Aspergillus flavus* (*Aspergillus* Sección *Flavi*):



El color de las colonias es verde-amarillo. La textura es pulverulenta con surcos, rugosa o granulosa, ocasionalmente algodonosa en el centro o margen. El reverso de la colonia es incoloro.

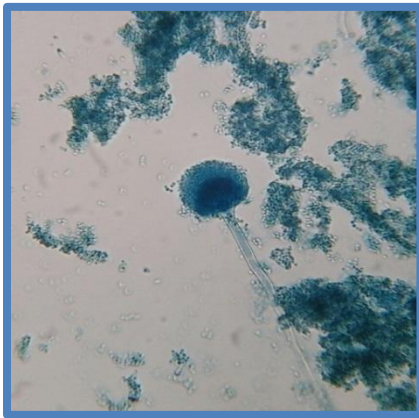


Los conidióforos no ramificados de pared gruesa, hialinos, rugosos, de longitud variable. Las vesículas son globosas o subglobosas produciendo fiálides uni o biseriadas alrededor de toda la superficie. Los conidios son de color verde amarillentos, finamente rugosos, esféricos o subesféricos. Puede haber esclerotes.

- *Aspergillus terreus* (*Aspergillus* Sección *Terrei*):

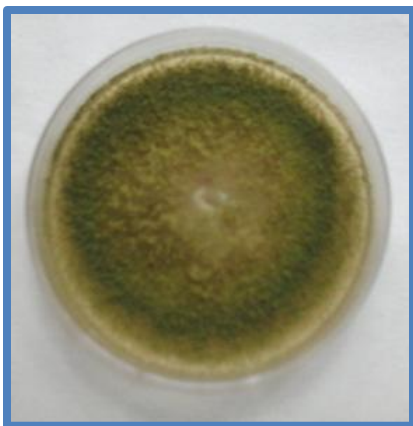


Las colonias son inicialmente blancas algodonosas que se tornan pulverulentas o granulares de color amarillas-café a canela. El reverso es blanco-amarillento. No produce pigmentos difusibles.

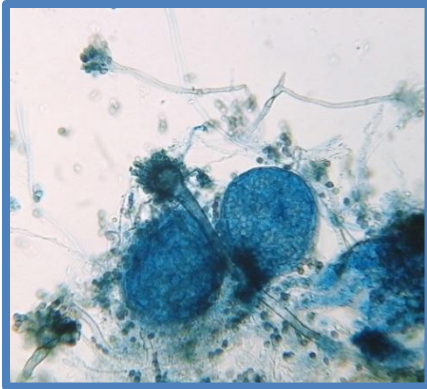


Los conidióforos son cortos, hialinos, lisos. La cabeza conidial es columnar y biseriada. Las métulas y fiálides son de longitud similar. Los conidios son de pared lisa, hialina, esféricos a elipsoidales.

- *Aspergillus glaucus* (*Aspergillus* Sección *Aspergillus Eurotium*):



Las colonias son ampliamente esparcidas, de color verde grisáceo, con aspecto lanoso, durante los primeros días de crecimiento tienen un aspecto similar a las de *Aspergillus flavus*.

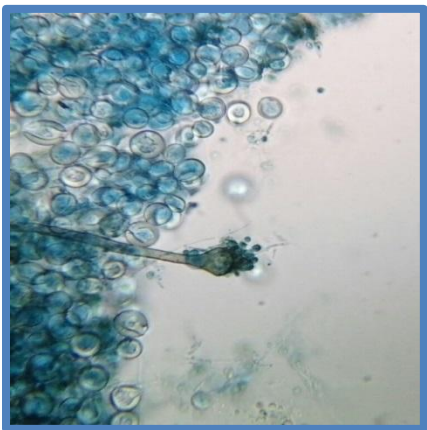


Los conidióforos son de longitud variable, hialinos, anchos, pueden estar ramificados. Las cabezas conidiales son radiadas a ligeramente columnares, uniseriadas. Los conidios son ovoides, equinulados y hialinos. Generalmente pueden verse cleistotecios.

- *Aspergillus nidulans* (*Aspergillus* Sección *Nidulantes*):



Las colonias son de crecimiento rápido, blanquecinas o amarillentas, algo algodonosas, con reverso color rojo oscuro.

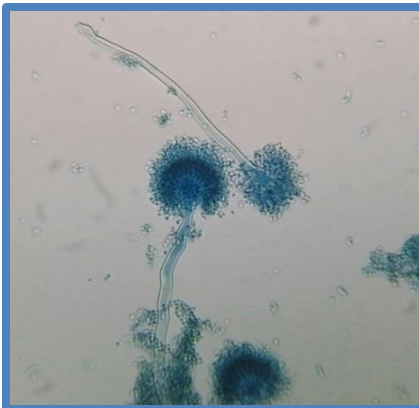


Presenta conidióforos cortos de pared lisa y color marrón, La cabeza conidial es corta, columnar y biseriada. Los conidios son esféricos, rugosos y verdes. Usualmente pueden verse células de Hülle esféricas de pared gruesa y en algunos casos cleistotecios con ascosporas color rojo.

- *Aspergillus versicolor*:

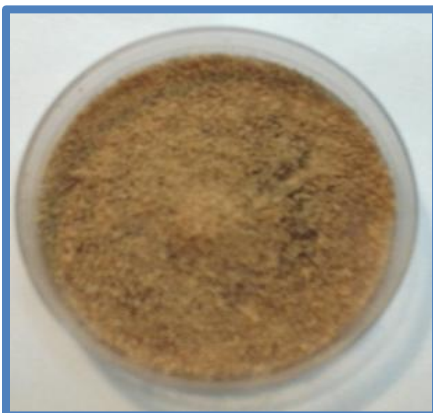


Las colonias son blancas inicialmente y luego pueden tornarse amarillas, anaranjadas, verdosas o rosadas. Tienen textura aterciopelada. Reverso blanco.

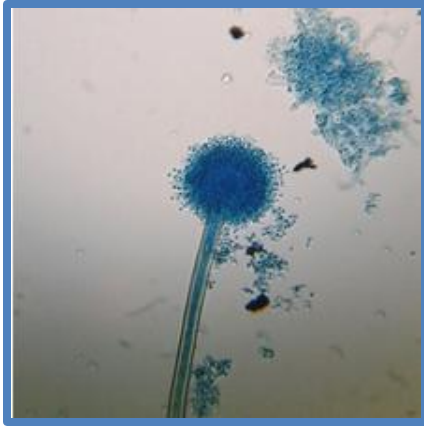


Los conidióforos son largos y delgados. Tiene fiálides biseriadas que cubren la mayor parte de la vesícula. Ocasionalmente pueden verse células de Hülle.

- *Aspergillus ochraceus* (*Aspergillus* Sección *Circumdati*):



Las colonias son ocre por el anverso y amarillas a ligeramente rosadas por el reverso, de aspecto granular con gran cantidad de esclerocios.



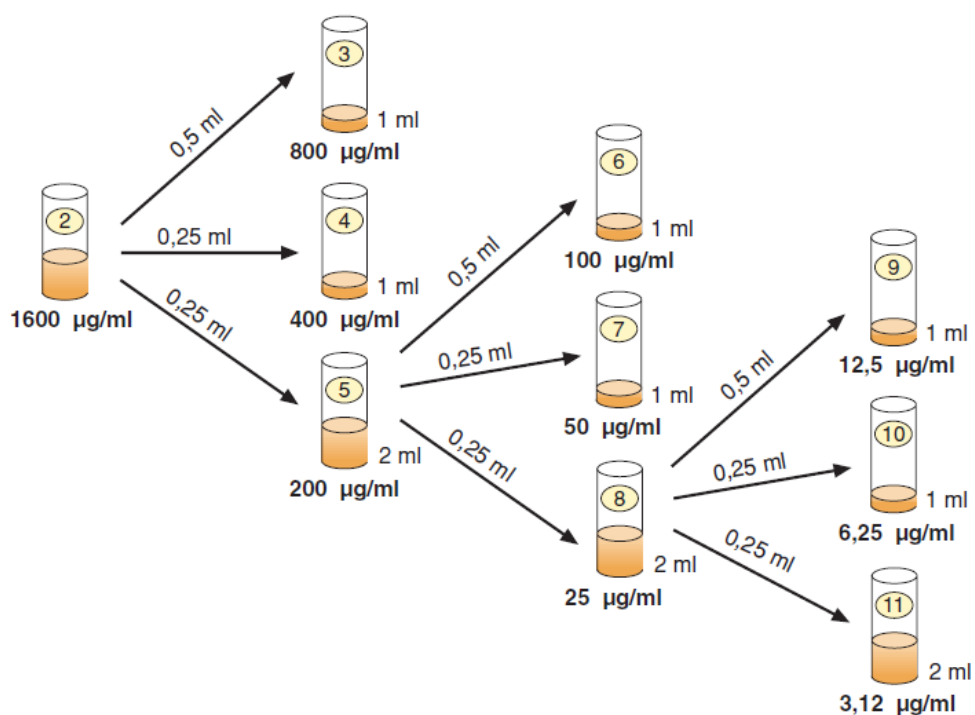
Los conidióforos pueden medir hasta 1 mm de longitud, variando desde lisos a levemente rugosos, son hialinos, levemente amarillentos. Posee vesículas hialinas, esféricas y dos series de fiálides que la cubren casi en su totalidad. Los conidios son lisos y globosos y los esclerotes globosos a subglobosos (52).

Actualmente se sabe que la tipificación tradicional macro y micromorfológica, no nos permite aseverar la identidad taxonómica del microorganismo tal como se ha caracterizado, sino que debemos referirnos en algunos casos a complejos de especies (ej: complejo *Aspergillus fumigatus* o Sección *Fumigati*) dado que existen numerosas especies crípticas en cada complejo, que no podemos diferenciar por simple observación fenotípica. El hecho de tipificarlos de la forma tradicional y nombrarlos como “especies” en el presente trabajo responde a la aplicabilidad en la rutina diaria de laboratorios de baja complejidad. No se han realizado en el presente estudio métodos específicos fenotípicos (como exclusión de especies termorresistentes correspondientes a especies crípticas particulares) ni de biología molecular para la tipificación de especies dentro de los complejos. A los efectos prácticos se llamará a cada aislamiento con el nombre de la especie principal de la sección o complejo de especies al que pertenece (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*).

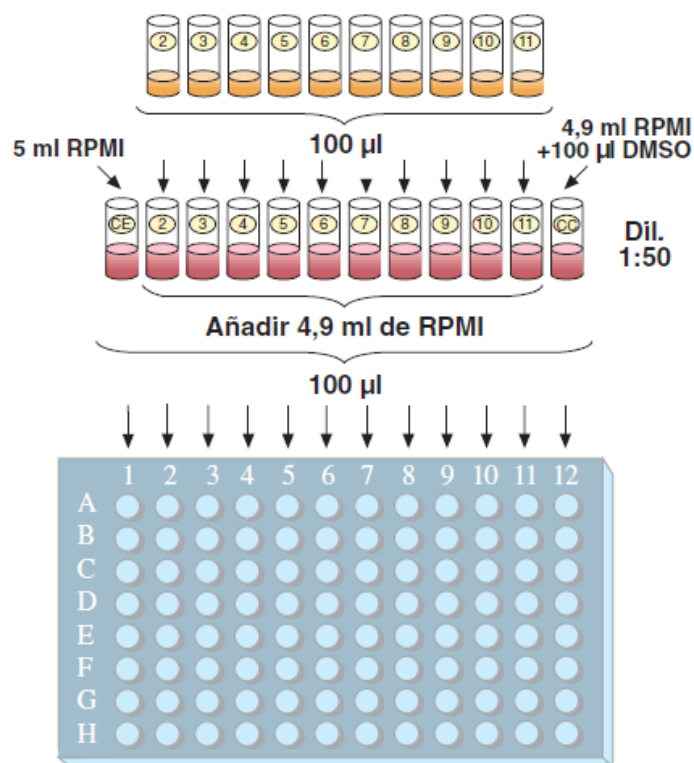
Para el estudio de la sensibilidad frente a antifúngicos se utilizaron las normas establecidas por el CLSI en el documento M38-A2 para el método de referencia, microdilución en caldo (22).

Se utilizaron antifúngicos comerciales de potencia conocida y controlada (itraconazol, voriconazol, posaconazol, albaconazol y anfotericina B).

Para la preparación de las microplacas con antifúngico para el ensayo, se prepararon inicialmente soluciones madre en dimetilsulfóxido (DMSO) de los antifúngicos a estudiar, de una concentración de 1600 µg/ml. Luego se realizaron diluciones utilizando caldo RPMI (comercial) y DMSO como diluyentes de la siguiente manera:



Más tarde se procedió al llenado de las placas:

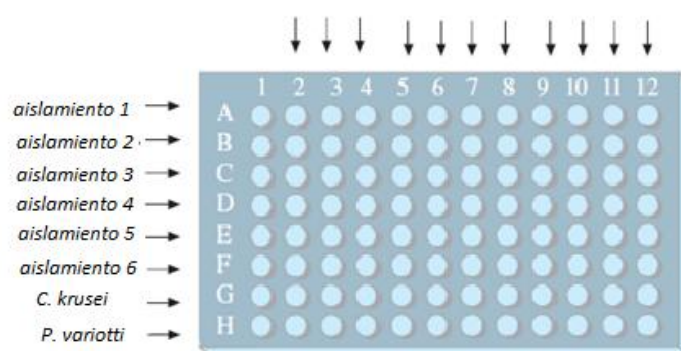


para tener finalmente concentraciones crecientes de antifúngicos entre 0,03 µg/ml y 16 µg/ml entre los pocillos 11 y 2 respectivamente, (de derecha a izquierda: 0,03, 0,06, 0,12, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, y 16 µg/ml). Los pocillos de la columna 1 se llenaron con 200 µl de RPMI como control de esterilidad del medio y los de la columna 12 con 100 µl de RPMI como control de crecimiento del microorganismo.

Para la preparación del inóculo del hongo a estudiar, tal como establece el documento M38-A2 se preparó una suspensión de esporas de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/ml. Para lograr dicha concentración se extrajeron las esporas de un cultivo en agar papa glucosado incubado durante 7 días a 35 °C, se ajustó una dilución de las mismas en solución fisiológica y Tween 20 a una densidad óptica (a 530 nm) entre 0,09 y 0,13; y posteriormente se realizó una dilución 1/50 en RPMI, obteniéndose así la suspensión adecuada para la inoculación de las placas.

El control de concentración se realizó por dilución, siembra y recuento de colonias en placas de agar Sabouraud.

Las microplacas de los distintos antifúngicos fueron inoculadas con 100 µl por pocillo de la suspensión de esporas. En las filas A a F se colocaron 6 diferentes aislamientos en estudio, y en las filas G y H los controles de calidad *Candida krusei* ATCC y *Paecilomyces variotii* ATCC respectivamente (desde la columna 2 a la 12).



Las microplacas se taparon con tapas plásticas estériles y se incubaron 48 horas a 35 °C.

La lectura se realizó a ojo desnudo con ayuda de un espejo invertido como se ve en la imagen, considerándose la concentración inhibitoria mínima como aquella en la que se observó el 100% de inhibición del crecimiento. Se consideró condición necesaria para la validación de la lectura la ausencia de crecimiento en los pocillos de control de esterilidad, la presencia de crecimiento puro y uniforme en los pocillos de control de crecimiento, y la inhibición de crecimiento sobre el valor esperado de CIM en los microorganismos control (53).



Para el análisis de los valores de concentración inhibitoria mínima, ante la falta de puntos de corte clínicos para hongos filamentosos, se utilizaron los puntos de corte epidemiológicos (ECV) (24, 25) .

El punto de corte epidemiológico para cada especie y cada antifúngico es un valor obtenido considerando la distribución de asilamientos salvajes, la moda del valor de CIM para cada distribución, el máximo valor de CIM observado entre la población salvaje y la variabilidad inherente al ensayo. En general, el ECV comprende al 95% de la población salvaje libre de mutaciones que pudieran conferir resistencia.

El ECV es entonces de gran ayuda para caracterizar la sensibilidad de *Aspergillus* frente a itraconazol, voriconazol, posaconazol y anfotericina B, y para monitorear la emergencia de cepas con mutaciones y/o sensibilidad disminuida frente a los antifúngicos.

No se han publicado aún puntos de corte clínicos ni epidemiológicos para albaconazol.

ECV utilizados:

	ECV en µg/ml (% de la población abarcada)			
	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>
Itraconazol	1 (98.8)	1 (99.6)	2 (100)	1 (100)
Posaconazol	0.5 (99.2)	0.25 (94.7)	0.5 (96.9)	0.5 (99.7)
Voriconazol	1 (97.7)	1 (99.1)	2 (99.4)	1 (99.1)
Anfotericina B	4 (>99)	4 (>99)	4 (>99)	8 (>99)

(24, 25)

Se calculó en relación al ECV, el porcentaje de la población estudiada que podría considerarse sensible, y se obtuvieron también los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ de la población general de *Aspergillus* spp. y particular de *A. fumigatus*.

Para el estudio de la sensibilidad por difusión con tiras Etest® y posterior comparación con el método de referencia antes descrito, se utilizaron las recomendaciones del CLSI para el estudio

de la sensibilidad de hongos filamentosos por difusión con discos, detalladas en el documento M51-A (23).

El inóculo necesario en este caso es de aproximadamente $0,4 \times 10^6$ a 5×10^6 UFC/ml.

Al igual que en el procedimiento para microdilución en caldo, se cultivaron los hongos en estudio durante 7 días en agar papa glucosado a 35 °C para inducir la esporulación. Luego se cubrieron las colonias con aproximadamente 1ml de solución fisiológica estéril y una gota de Tween 20 y se extrajo esa suspensión del tubo de cultivo. La misma se dejó sedimentar por 3 a 5 minutos y luego se transfirió la parte superior, homogénea, a un tubo estéril para la medición de la densidad óptica, que debió ajustarse entre 0,09 y 0,13 a 530 nm (se puede utilizar hasta este paso la misma suspensión para ambos métodos; para el caso de microdilución en caldo posteriormente debe efectuarse la dilución 1/50 en RPMI mencionada oportunamente).

Se utilizó como medio de cultivo agar Mueller Hinton tradicional sin suplementar, que se inóculó mediante hisopado en 3 direcciones con la suspensión de esporas.

La lectura se realizó a ojo desnudo luego de 24 horas de incubación a 35 °C.

Los antifúngicos estudiados por el método de difusión en medio sólido con tiras Etest® fueron anfotericina B, itraconazol y voriconazol. Para el caso de anfotericina B, se consideró como punto de lectura de CIM el 100% de inhibición de crecimiento, mientras que para los azoles, tal como indica el documento M51-A del CLSI para la difusión con discos, se consideró como sitio de lectura aquel donde se observó una disminución prominente del crecimiento (80%), ignorando pequeñas hifas que pudieran extenderse sobre la zona de inhibición.

Posteriormente, la comparación entre el método de microdilución en caldo y el método de difusión en medio sólido adaptado a la utilización de tiras comerciales Etest®, se realizó mediante tablas dinámicas en Excell y mediante estudio del acuerdo entre valores por *test* de

concordancia, estadificado por el coeficiente κ (*kappa*). Para esto último se utilizó el programa estadístico Stata/SE 12.0 para Windows.

Se consideró:

Valoración del índice κ	
Valor de κ	Fuerza de la concordancia
<0,2	Pobre
0,21-0,40	Débil
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,8	Buena
0,81-1,0	Muy buena

(54, 55)

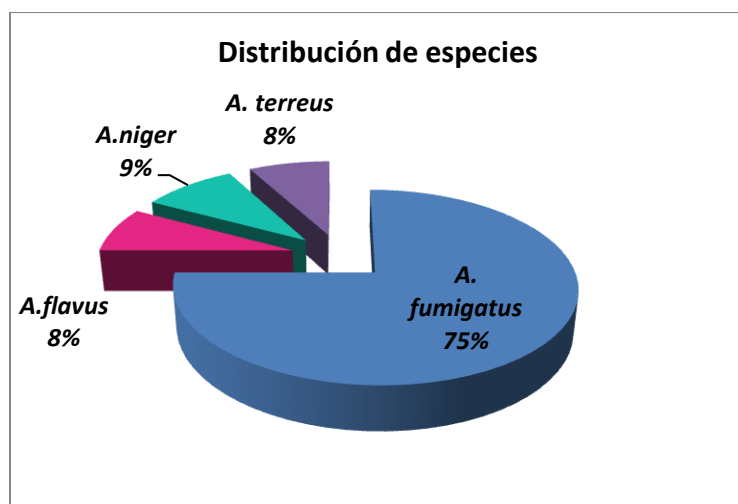
Los comparación entre valores de los diferentes métodos se realizó para la población de *Aspergillus* en general y para la población de *A. fumigatus*. No pudo realizarse un análisis específico para el resto de las especies estudiadas por el limitado número de datos.

La concordancia se evaluó según la correspondencia exacta entre métodos y también teniendo en cuenta una dilución (mayor o menor) de “tolerancia”, considerando la variabilidad inherente a las técnicas.

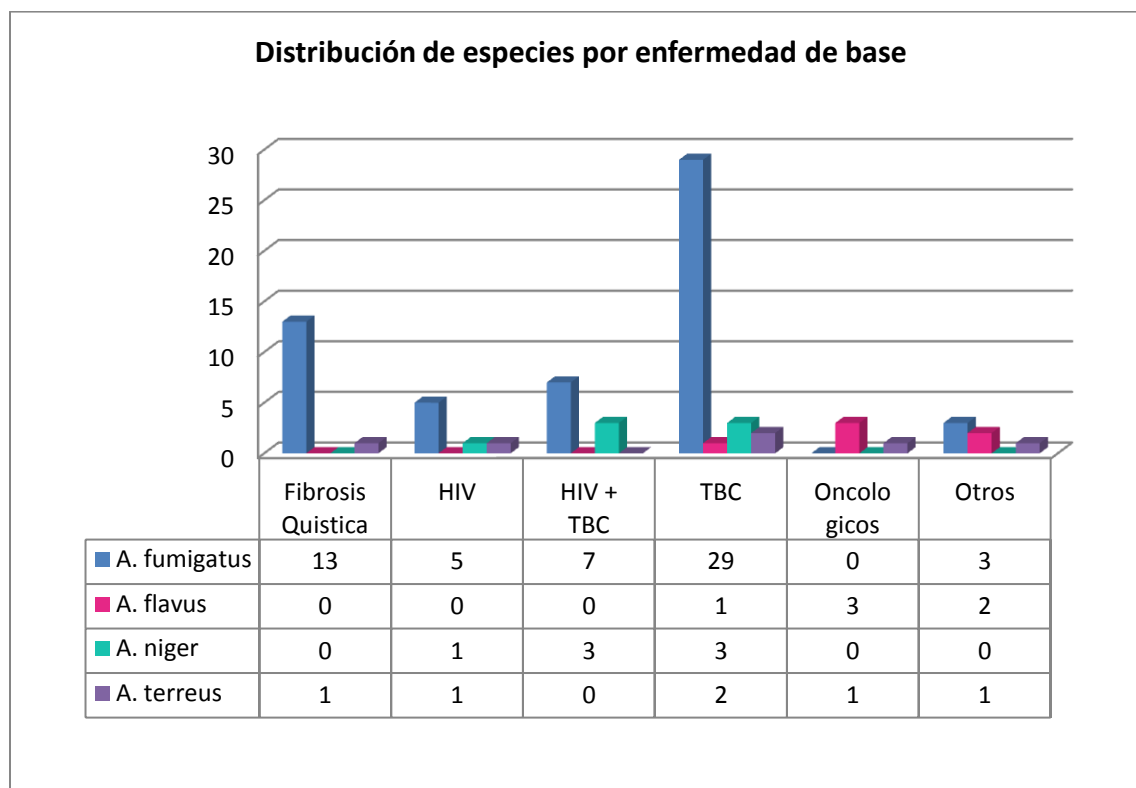
Como se mencionó anteriormente, los ECV no nos permiten hablar estrictamente de sensibilidad o resistencia sino inferir si las cepas son salvajes (“sensibles”) o presentan sensibilidad disminuida (“resistentes”). Las diferencias entre los resultados obtenidos por la técnica de difusión en placa con tiras Etest® y la técnica de referencia se evaluaron como errores *menores* cuando la diferencia no afectó la interpretación del resultado como “sensible” o “resistente”, errores *mayores* cuando la interpretación cambió de “sensible” a “resistente”, y errores *muy mayores* cuando la diferencia de valores provocó que aislamientos “resistentes” fueran interpretados como “sensibles”.

RESULTADOS

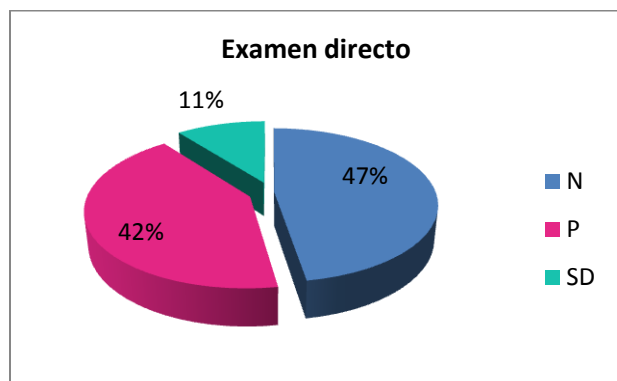
En las 76 muestras estudiadas se encontró que 57 aislamientos correspondieron a *A. fumigatus*, 6 a *A. terreus*, 6 a *A. flavus* y 7 a *A. niger*, que corresponden a:



La distribución de dichas especies según la enfermedad de base del paciente fue:

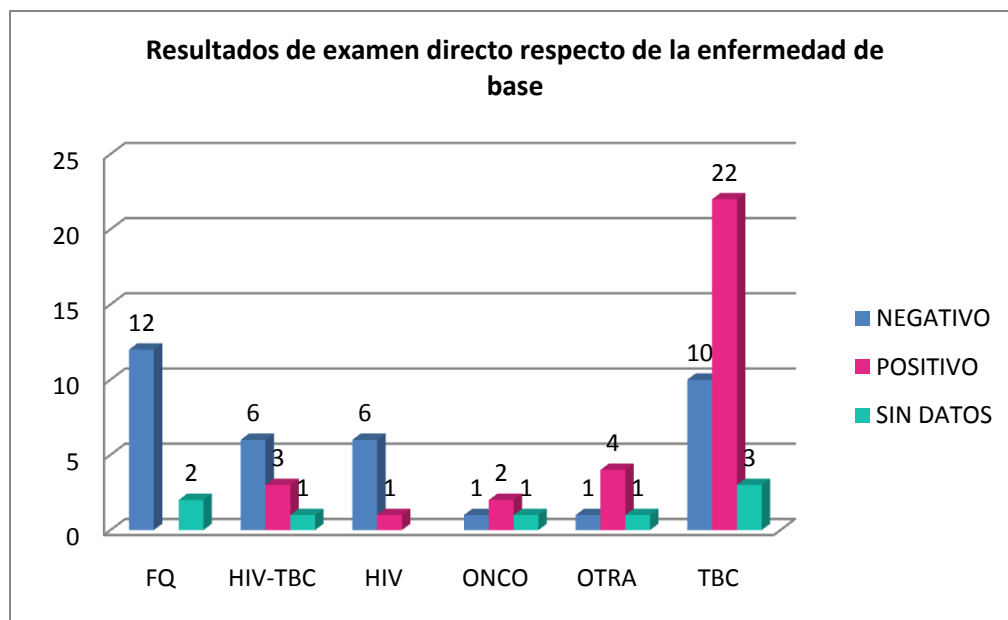


Con respecto a la revisión de los exámenes directos de las muestras en estudio, se observó que 32 fueron positivos, observándose hifas hialinas tabicadas, 36 fueron negativos y en 8 de las 76 muestras no se pudo obtener el dato del resultado del examen directo. Los porcentajes correspondientes son:



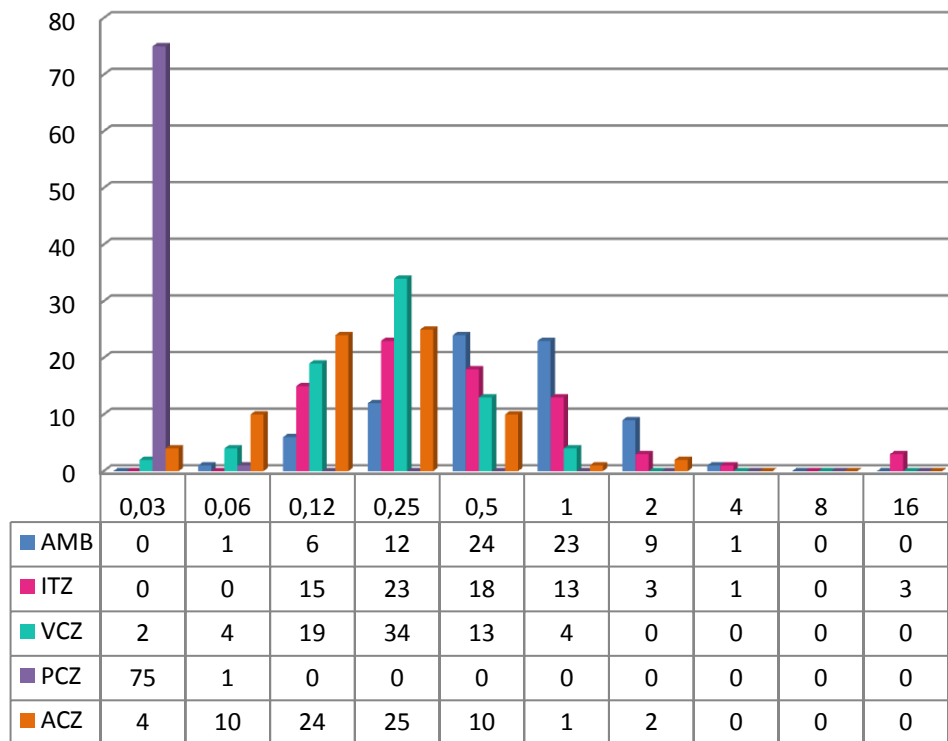
N: Negativo; P: Positivo; SD: Sin Datos

La distribución de exámenes directos positivos y negativos según la enfermedad de base del paciente fue la siguiente:



En lo referido al estudio de la sensibilidad a antifúngicos, se observaron los siguientes valores de CIM para los antifúngicos estudiados en la población de *Aspergillus* spp.:

Aspergillus spp. (n=76)



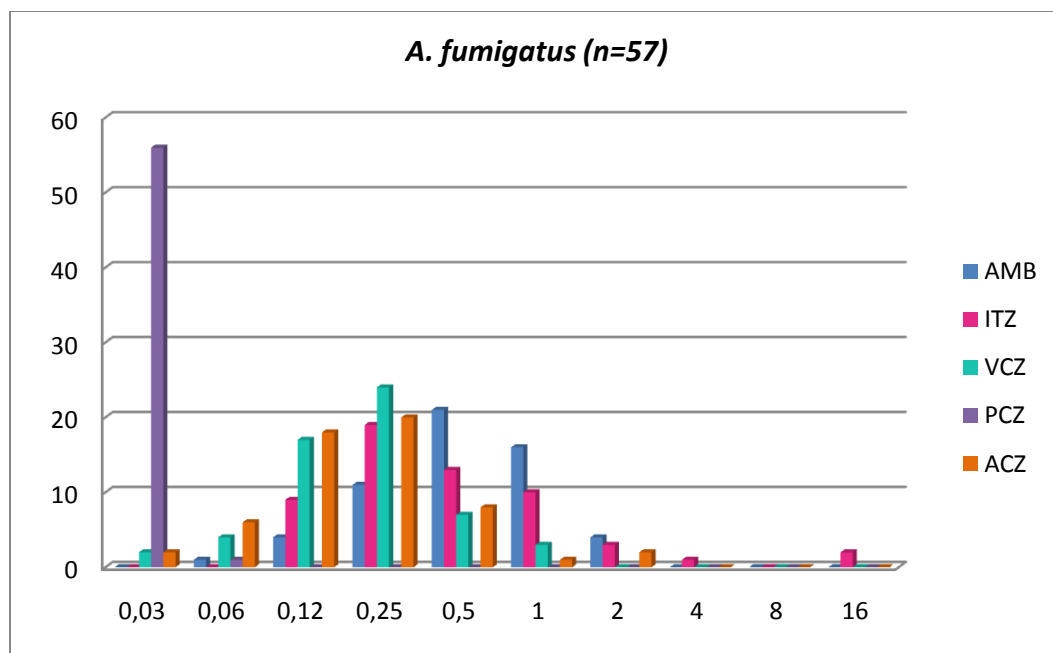
Valores de CIM en función de cantidad de aislamientos

AMB: Anfotericina B; ITZ: Itraconazol; VCZ: Voriconazol; PCZ: Posaconazol; ACZ: Albaconazol

Las CIM₅₀ y CIM₉₀ observadas considerando la población general de *Aspergillus* spp. fueron:

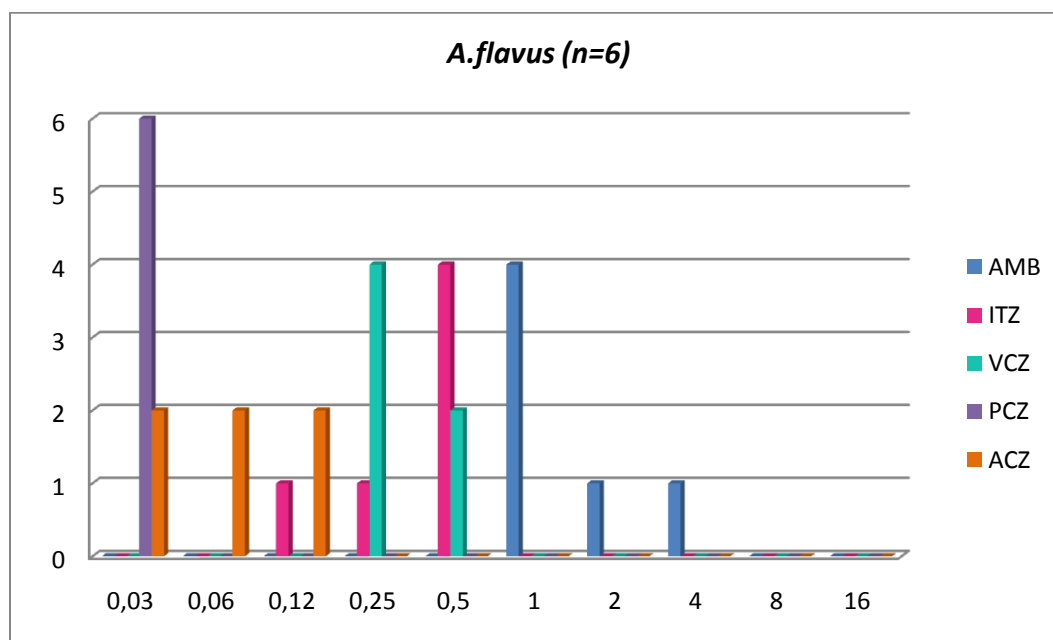
	Anfotericina	Itraconazol	Voriconazol	Posaconazol	Albaconazol
CIM90	2	1	0,5	0,03	0,5
CIM50	0,5	0,25	0,25	0,03	0,25

Al discriminar por especie se observó:



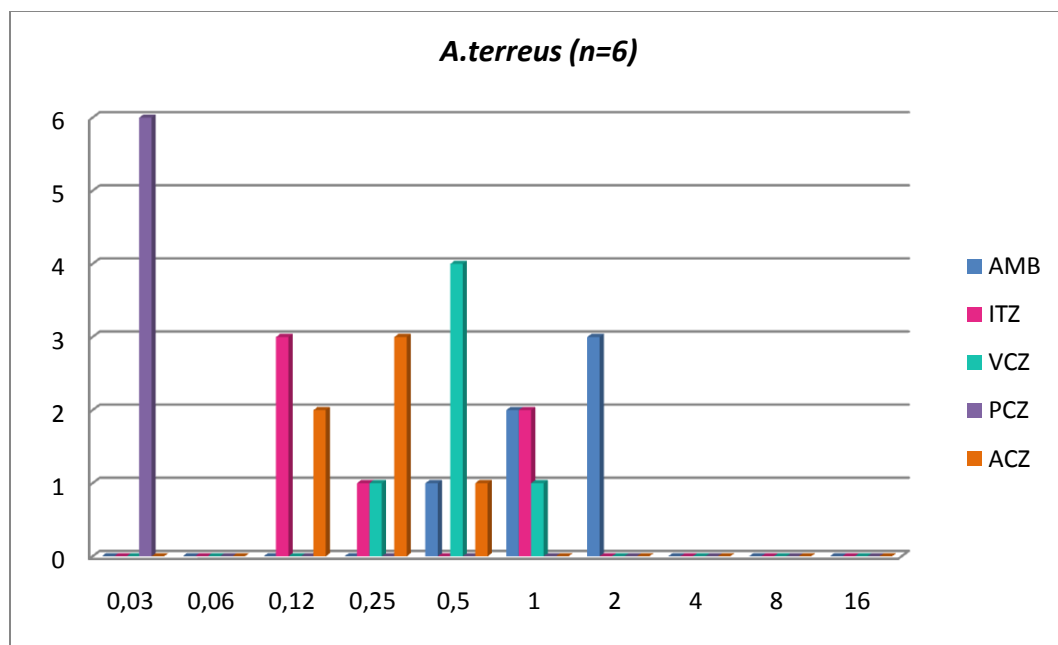
Valores de CIM en función de cantidad de aislamientos

AMB: Anfotericina B; ITZ: Itraconazol; VCZ: Voriconazol; PCZ: Posaconazol; ACZ: Albaconazol



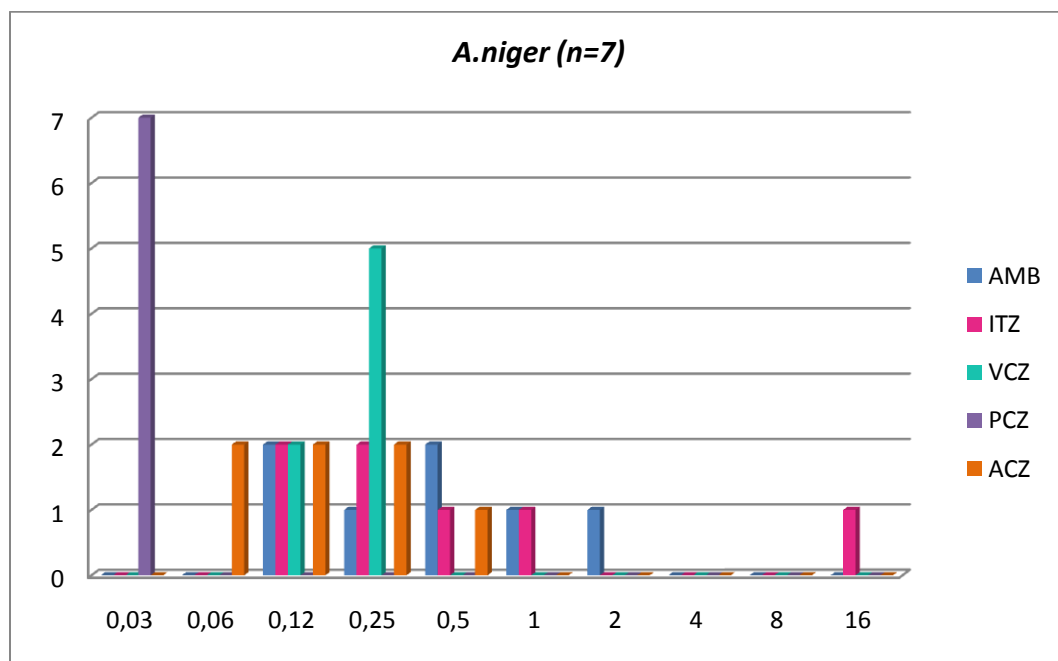
Valores de CIM en función de cantidad de aislamientos

AMB: Anfotericina B; ITZ: Itraconazol; VCZ: Voriconazol; PCZ: Posaconazol; ACZ: Albaconazol



Valores de CIM en función de cantidad de aislamientos

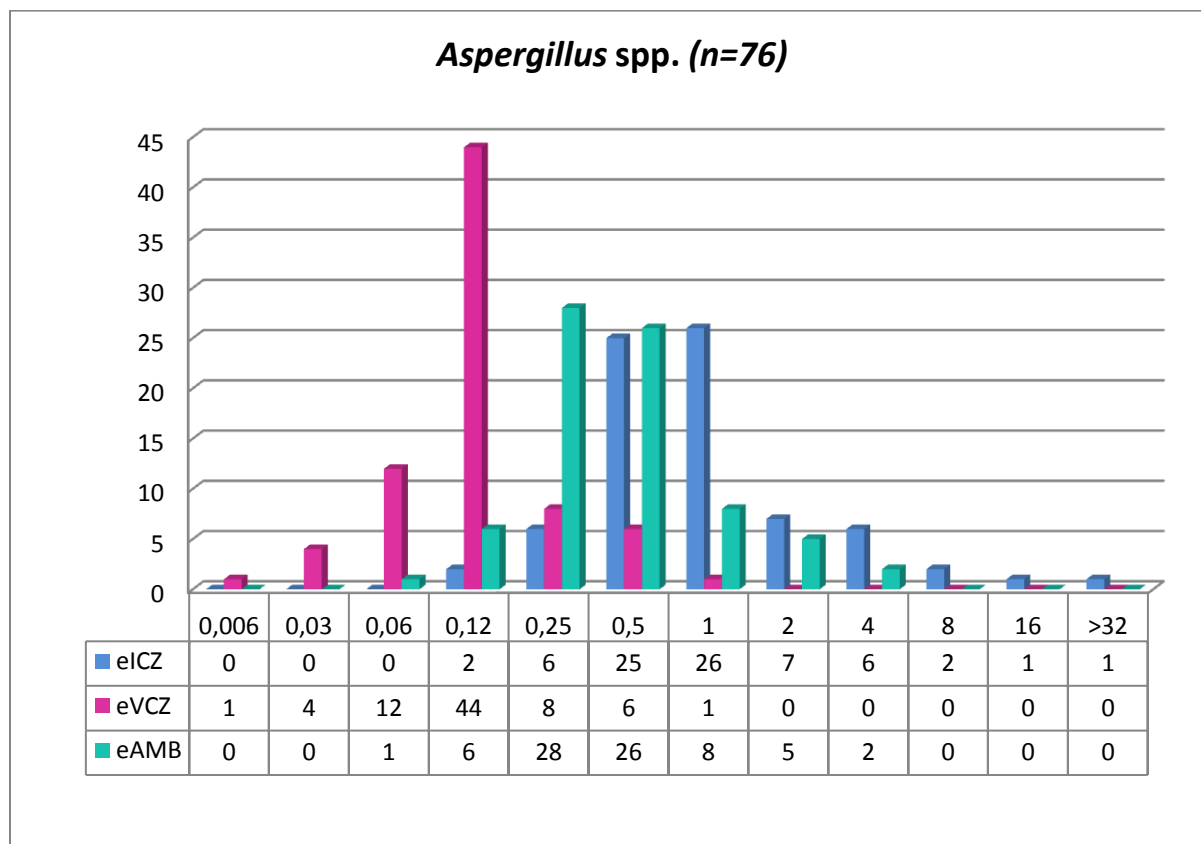
AMB: Anfotericina B; ITZ: Itraconazol; VCZ: Voriconazol; PCZ: Posaconazol; ACZ: Albaconazol



Valores de CIM en función de cantidad de aislamientos

AMB: Anfotericina B; ITZ: Itraconazol; VCZ: Voriconazol; PCZ: Posaconazol; ACZ: Albaconazol

Al estudiar los valores de CIM por la técnica de Etest® de anfotericina B, itraconazol y voriconazol se observó:



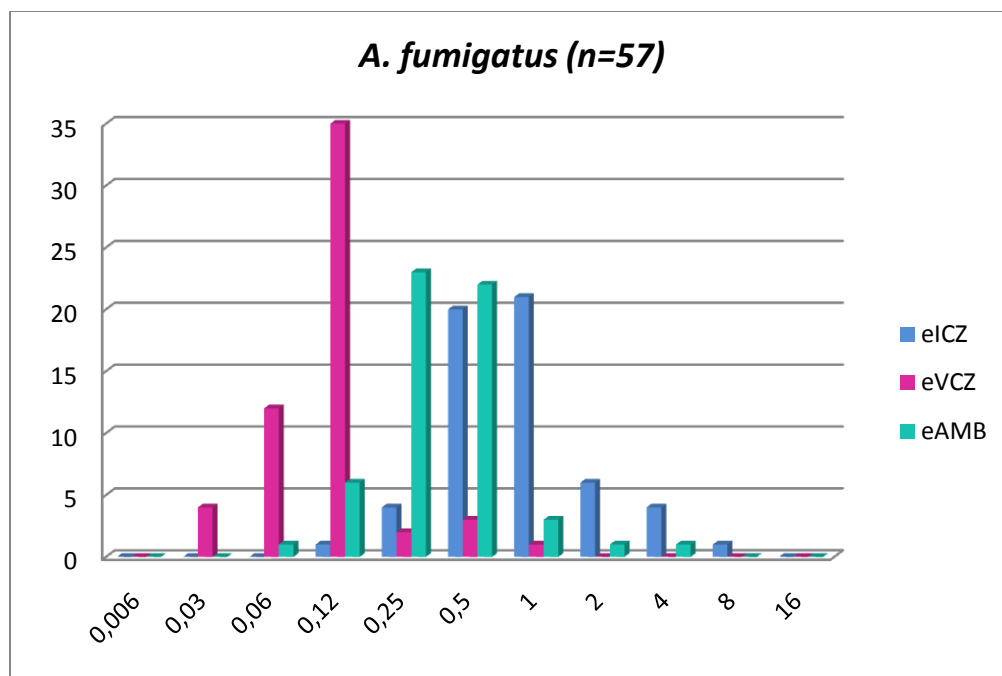
Valores de CIM en función de cantidad de aislamientos

eAMB: Anfotericina B por técnica de e-Test; e ICZ: Itraconazol por técnica de e-Test; eVCZ: Voriconazol por técnica de e-Test

La CIM90 y CIM50 obtenida por esta técnica fue:

	Anfotericina	Itraconazol	Voriconazol
CIM90	1	4	0,25
CIM50	0,5	1	0,12

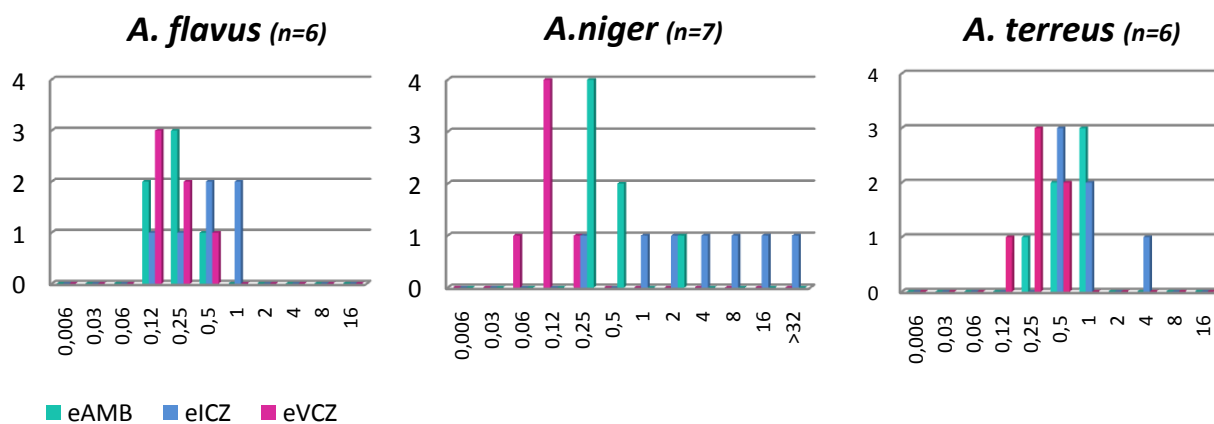
Discriminando por especie se observó para la subpoblación de *Aspergillus fumigatus*:



Valores de CIM en función de cantidad de aislamientos

eAMB: Anfotericina B por técnica de Etest®; e ICZ: Itraconazol por técnica de Etest®; eVCZ: Voriconazol por técnica de Etest®

Y para el resto de las especies:



Valores de CIM en función de cantidad de aislamientos

eAMB: Anfotericina B por técnica de Etest®; e ICZ: Itraconazol por técnica de Etest®; eVCZ: Voriconazol por técnica de Etest®

Al comparar los resultados obtenidos por las dos técnicas para la población general de *Aspergillus* mediante tablas dinámicas se observó para anfotericina B:

<i>Aspergillus</i> spp.	eAMB (CIM en µg/ml)							
AMB (CIM en µg/ml)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	Total general
0,06		1						1
0,12		4	2					6
0,25			11	1				12
0,5	1		11	12				24
1		1	3	12	5	2		23
2			1	1	3	3	1	9
4							1	1
Total general	1	6	28	26	8	5	2	76

AMB: Valores de CIM de anfotericina B por técnica de microdilución en placa; eAMB: Valores de CIM de anfotericina B por técnica de difusión en medio sólido con tiras Etest®.

La correspondencia entre ambas resultado ser de 36 valores correspondiendo a un 47,37%.

El coeficiente κ para esta situación resultó ser 0,3316, concordancia *débil*.

Contemplando el error de una dilución, el porcentaje de acuerdo asciende a 90,79% y el coeficiente κ resulta 0,88, lo que habla de una concordancia *muy buena*.

Se vio que en el 90% de los casos, los valores de CIM fueron menores por la técnica de Etest®.

Para itraconazol:

Aspergillus spp	eICZ (CIM en µg/ml)									
ICZ (CIM en µg/ml)	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>32	Total general
0,12	1	4	4	3		2	1			15
0,25		2	13	5	2	1				23
0,5	1		5	8	2		1		1	18
1			2	8	3					13
2				1		2				3
4						1				1
8										
16			1	1				1		2
>32										1
Total general	2	6	25	26	7	6	2	1	1	76

ICZ: Valores de CIM de itraconazol por técnica de microdilución en placa; eICZ: Valores de CIM de itraconazol por técnica de difusión en medio sólido con tiras Etest®.

La correspondencia entre ambas técnicas fue de 18 valores, es decir un 23,38%

El índice κ resultó 0,079, refiriendo una concordancia *pobre*.

Contemplando un error de +/- una dilución, el acuerdo corresponde a 67,53% y el coeficiente κ a 0,596, que se condice con una concordancia *moderada*.

También resultó que el 68,83% de los valores de CIM fueron mayores por la técnica de Etest®.

Para voriconazol se vio:

Aspergillus spp	eVCZ (CIM en µg/ml)							
VCZ (CIM en µg/ml)	0,006	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	Total general
0,03		1	1					2
0,06		2	2					4
0,12	1	1	7	9	1			19
0,25			2	30	1	1		34
0,5				5	6	2		13
1						3	1	4
Total general	1	4	12	44	8	6	1	76

VCZ: Valores de CIM de voriconazol por técnica de microdilución en placa; eVCZ: Valores de CIM de voriconazol por técnica de difusión en medio sólido con tiras Etest®.

La correspondencia fue de 16 valores, 21,05%. Para ello, $\kappa = -0,0066$, concordancia *pobre*.

Considerando una dilución como error aceptable, el porcentaje de acuerdo se traslada a 88,16% y el coeficiente κ a 0,8340, refiriendo una concordancia *muy buena*.

El 75% de los casos se obtuvieron valores de CIM más bajos por la técnica de Etest® que por la metodología de referencia.

Al evaluar los resultados por ambas técnicas, además se observó, que utilizando la técnica de difusión en placa con tiras Etest®, para anfotericina B y para voriconazol, todas las diferencias representaron errores *menores*. En el caso de itraconazol, se encontraron 10 errores *mayores*, de los cuales 5 quedaron abarcados cuando se consideró una dilución de tolerancia como margen de error aceptable, y 3 errores *muy mayores*, de los cuales 2 sucedieron al aceptar una dilución como error aceptable entre métodos. El resto fueron errores *menores*.

Al realizar la comparación de métodos en la subpoblación de aislamientos de *Aspergillus fumigatus* se observó para anfotericina B:

A. fumigatus	eAMB (CIM en µg/ml)							
AMB (CIM en µg/ml)	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	Total general
0,06		1						1
0,12		4						4
0,25			10	1				11
0,5	1		10	10				21
1		1	3	10	2			16
2				1	1	1	1	4
Total general	1	6	23	22	3	1	1	57

AMB: Valores de CIM de anfotericina B por técnica de microdilución en placa; eAMB: Valores de CIM de anfotericina B por técnica de difusión en medio sólido con tiras Etest®.

La correspondencia fue de 27 valores, es decir 47,37%. El coeficiente κ resultó 0,3040, refiriendo una *débil* concordancia. Al considerar una diferencia de una dilución como error “aceptable” se obtuvo un acuerdo de 89,47% y un coeficiente $\kappa = 0,8591$, compatible con una concordancia *muy buena*.

Se vio también que en el 47,3% de los casos los valores fueron menores por la técnica de Etest®.

En el caso de itraconazol:

<i>A.fumigatus</i>	eICZ (CIM en $\mu\text{g/ml}$)							
ICZ (CIM en $\mu\text{g/ml}$)	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	Total general
0,12	1	3	4	1				9
0,25		1	11	4	2	1		19
0,5			4	6	2		1	13
1				8	2			10
2				1		2		3
4						1		1
8								0
16			1	1				2
Total general	1	4	20	21	6	4	1	57

ICZ: Valores de CIM de itraconazol por técnica de microdilución en placa; eICZ: Valores de CIM de itraconazol por técnica de difusión en medio sólido con tiras Etest®.

La correspondencia en este caso fue de 15 de 57 valores, es decir 26,32%. El coeficiente $\kappa = 0,104$.

Considerando +/- una dilución el acierto fue de 70,18% y $\kappa = 0,6283$, concordancia *buena*.

Para el caso de itraconazol, en el 68,4% de los casos los valores fueron mayores cuando fueron obtenidos por el método de difusión en medio sólido.

En cuanto a voriconazol, para la población de *Aspergillus fumigatus* se observó:

A. fumigatus	eVCZ (CIM en µg/ml)						
VCZ (CIM en µg/ml)	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	Total general
0,03	1	1					2
0,06	2	2					4
0,12	1	7	9				17
0,25		2	22				24
0,5			4	2	1		7
1					2	1	3
Total general	4	12	35	2	3	1	57

VCZ: Valores de CIM de voriconazol por técnica de microdilución en placa; eVCZ: Valores de CIM de voriconazol por técnica de difusión en medio sólido con tiras Etest®

Aquí la correspondencia fue de 24,56%, el coeficiente $\kappa=0,0297$, refiriendo una concordancia *pobre*.

Luego, considerando una dilución de diferencia, el acuerdo aumenta a 87,72% y κ a 0,8281, contemplando así una concordancia *muy buena*.

En el 73,68% de los casos los valores de CIM obtenidos fueron mayores por la técnica de referencia (microdilución en placa).

DISCUSIÓN

Tal como se esperaba de acuerdo con lo publicado en la bibliografía, se ha visto que la mayoría de los aislamientos correspondieron a *Aspergillus fumigatus* (56). Si bien el resto de las especies ocupan porcentajes pequeños (menores al 10%) en la población, si pensamos en ellas como un conjunto “no *A. fumigatus*”, vemos que representan el 25% de los aislamientos.

A. fumigatus resultó ser la especie más prevalente independientemente de la enfermedad de base del paciente, excepto para los pacientes oncológicos, donde la especie más prevalente fue *A. flavus*. De todas formas, esta información no puede generalizarse o extrapolarse dado que el número de pacientes con dicha enfermedad de base es muy pequeño como para sacar conclusiones.

Con respecto al examen directo de las muestras, en general, la proporción de resultados positivos y negativos fue similar. Si observamos la información desglosada por enfermedad de base, vemos que para los pacientes con fibrosis quística el 86% de los exámenes directos resultó negativo. Esto podría deberse a que las secreciones respiratorias de estos pacientes suelen ser extremadamente purulentas, motivo por el cual la observación directa se hace muy dificultosa. Por esa razón podríamos estar en presencia de resultados falso negativos.

Por el contrario, en los pacientes con tuberculosis (actual o pasada), el 63% de los exámenes directos fue positivo. Si bien se podría haber esperado un porcentaje mayor, la mayor positividad respecto a las otras enfermedades podría deberse a que en general estos pacientes presentan formas intracavitarias, donde las muestras no suelen ser tan purulentas y el inóculo fúngico es mayor; por lo tanto es mayor la posibilidad de observar elementos fúngicos en el examen directo.

Para el resto de las patologías no se observan particularidades en cuanto al examen directo, no solo por la falta de diferencias relevantes, sino también por el reducido número de muestras para cada una.

Del análisis de la sensibilidad, surge que todos los aislamientos de *A. flavus*, y de *A. terreus* presentaron valores de CIM iguales o menores al ECV de itraconazol, voriconazol, posaconazol y anfotericina, por lo tanto, podría decirse que en todos los casos se trató de cepas “salvajes” sin mutaciones que pudieran conferirle sensibilidad disminuida a los antifúngicos. Lo que resulta llamativo, es que *A. terreus*, conocido por presentar resistencia intrínseca a la anfotericina, presento valores de CIM de dicha droga relativamente bajos: dos, tres e incluso cuatro diluciones por debajo del punto de corte epidemiológico (8 µg/ml).

Para *A. niger* se observaron valores de CIM iguales o menores al ECV de voriconazol, posaconazol y anfotericina en todos los casos, y para itraconazol en el 86% de los casos, dado que un aislamiento presentó una CIM de itraconazol de 16 µg/ml, lo que correspondería a sensibilidad disminuida a dicho antifúngico.

Con respecto a *A. fumigatus*, los valores de CIM resultaron iguales o menores que el ECV para todos los aislamientos frente a anfotericina, voriconazol y posaconazol. Sin embargo, en el caso de itraconazol, si bien la moda de valores de CIM de dicho antifúngico fue de 0,25 µg/ml, se observó que el 10,5% de los aislamientos presentaron valores de CIM mayores al ECV, refiriendo perfiles con posibles mutaciones y sensibilidad disminuida.

En el análisis global de la población de *Aspergillus* spp., se observó que la moda de valores de CIM para anfotericina se situó en 0,5 µg/ml, la de itraconazol en 0,25 µg/ml, la de voriconazol en 0,25 µg/ml, la de posaconazol en 0,03 µg/ml (con el 98,6% de los aislamientos con ese valor de CIM) y para albaconazol la moda fue 0,25 µg/ml.

El porcentaje de aislamientos con valores de CIM compatibles con perfiles de sensibilidad disminuida a los antifúngicos (puntualmente al itraconazol) resultó ser de 9,2%. De la revisión de historias clínicas surgió que los aislamientos con sensibilidad disminuida correspondían a pacientes en su mayoría complicados, 2 de ellos con tuberculosis multi-resistente, 1 con tuberculosis con múltiples abandonos de tratamiento, 2 a pacientes con coinfección de HIV y tuberculosis, y 1 paciente de 30 años con fibrosis quística.

Con respecto al albaconazol, como se dijo, no existen puntos de corte epidemiológicos y por dicha razón no pueden sacarse conclusiones certeras; pero de todas formas cabe remarcar que se observaron valores de CIM similares a los de itraconazol y voriconazol.

Al realizar el estudio de la sensibilidad por la técnica de difusión en placa en medio sólido con tiras comerciales Etest®, se observaron diferencias importantes respecto de la técnica de referencia.

En la población general de *Aspergillus* spp., se constató un 21% de aislamientos con sensibilidad disminuida (CIM por encima del ECV) para itraconazol. Todos los aislamientos presentaron valores de CIM iguales o menores al ECV de voriconazol y anfotericina B, por lo que podrían considerarse salvajes.

Si estudiamos la sensibilidad en función de cada especie en particular, se vio que *A. flavus* presentó valores de CIM dentro de lo esperado para las cepas salvajes para todos los aislamientos, al igual que se había visto con el método de referencia.

A. niger, en cambio presentó valores similares a la técnica de referencia para voriconazol y para anfotericina, pero no así para itraconazol, donde se vio que los valores sufrieron un desplazamiento hacia valores mayores de CIM. Asimismo se vio que un 57% de los aislamientos presentaron valores de CIM compatibles con sensibilidad disminuida para

itraconazol. Nuevamente debemos hacer la salvedad de que se trata de un escaso número de aislamientos estudiados para esta especie.

En el caso de *A. terreus*, nuevamente el itraconazol parece presentar las mayores complicaciones, observándose un aislamiento por fuera de los valores epidemiológicos de corte, en contraste con la técnica de referencia que no había mostrado este fenómeno.

Para *A. fumigatus*, también las diferencias son importantes respecto del método de referencia cuando hablamos de itraconazol, no así para los otros antifúngicos en estudio. Se observó en este caso que un 19,3% (11) de los 57 aislamientos estudiados presentaron valores de CIM por encima del ECV.

El análisis de las diferencias mencionadas se resuelve en las matrices dinámicas de comparación de técnicas. Para los tres antifúngicos evaluados en la comparación de técnicas, se vio para la población general de *Aspergillus* spp. que la correspondencia de valores entre ambas es muy pobre, siendo del orden del 40% en el mejor de los casos para anfotericina, y del orden del 20% para voriconazol e itraconazol. Consecuentemente la concordancia entre técnicas resulta muy mala. Al tomar en cuenta un error “aceptable” de una diferencia de una dilución entre técnicas, por la variabilidad inherente a cada método, se ve claramente que para anfotericina B y voriconazol, tanto la coincidencia entre valores como el coeficiente de concordancia mejoran notablemente, abriendo las puertas a pensar que la técnica de difusión en medio sólido con tiras Etest®, mucho más simple, podría usarse como una aproximación sencilla al método de referencia. En cambio para itraconazol, ni siquiera tolerando un error de una dilución se alcanzan valores de concordancia que pudiéramos considerar confiables para el estudio de la sensibilidad, dado que en el mejor de los casos se logra un coeficiente de concordancia de 0,596, relacionado a una concordancia *moderada*.

Por otro lado, llama la atención que en el caso de anfotericina B y voriconazol se observan en general valores menores por la técnica de Etest® que por la técnica de referencia. En cambio para itraconazol esta tendencia se invierte, presentando valores mayores que los obtenidos por el método de microdilución en placa, lo que es consistente con el aumento del porcentaje de resistencia que se observó al analizar los resultados obtenidos. Este corrimiento podría deberse a la dificultad de la droga a difundir por el medio sólido como consecuencia de sus características moleculares.

En la subpoblación de *A. fumigatus* se observa prácticamente lo mismo que para la población general de *Aspergillus* spp. La única diferencia es que en este caso la concordancia alcanzada para itraconazol al aceptar una diferencia de una dilución entre métodos es *buen*a.

CONCLUSIONES

Tal como se propuso en las hipótesis, se vio que la contribución de las especies diferentes de *A. fumigatus* es importante, y mayor de lo que se suele creer. Esto confirma la importancia de conocer la tipificación del agente causal en los cuadros de aspergilosis, para poder tomar, cuando fuera necesario, conductas especiales relacionadas a la especie fúngica involucrada.

A. fumigatus continúa siendo la especie más frecuente, y así resultó ser en relación a las enfermedades de base estudiadas con mayor número de casos (fibrosis quística, tuberculosis y HIV con o sin coinfección con tuberculosis). No se ha podido sacar conclusiones respecto de la asociación particular con los pacientes oncológicos o con otras patologías de base dado el escaso número de muestras en las mismas.

El diagnóstico de aspergilosis es un objetivo multifactorial y multidisciplinario, donde todas las herramientas clínicas, radiológicas y de laboratorio son de suma importancia. Asimismo, el examen directo es un elemento valioso, ya que no solo es de ayuda en el diagnóstico de la aspergilosis y constituye un dato fuerte de sospecha de aspergilosis cuando es positivo, sino que también permite detectar otras infecciones concomitantes si las hubiera. Sin embargo, se ha visto en este trabajo, que su resultado no es determinante para el diagnóstico, ya que pueden existir gran cantidad de exámenes directos negativos con cultivo positivo para *Aspergillus* spp., en pacientes con cuadros clínicos compatibles con aspergilosis. Esto podría deberse, como se dijo, a las características de la muestra en estudio, a la heterogeneidad de la misma y la elección de la porción a estudiar y también al entrenamiento del observador.

No se ha podido calcular el valor predictivo positivo y negativo del examen directo ya que el estudio se realizó excluyentemente con muestras con cultivo positivo y diagnóstico probable de aspergilosis o colonización de vías aéreas por hongos del género *Aspergillus*.

Respecto del análisis de la sensibilidad, tal como se propuso, efectivamente existen, en nuestro medio, cepas con sensibilidad disminuida a los antifúngicos. A diferencia de lo que comunican algunos trabajos (26), el agente que presentó mayor cantidad de aislamientos con posible resistencia fue *A. fumigatus*. Esto podría deberse también a la diferencia en la cantidad de aislamientos estudiados de cada especie. Para sacar conclusiones acerca de la relación de cada especie con la prevalencia de aislamientos resistentes, sería necesario efectuar un análisis similar al realizado pero con un número significativo de aislamientos de cada especie.

Por otro lado, cabe remarcar, que la prevalencia de aislamientos con sensibilidad disminuida a los antifúngicos y posibles mecanismos de resistencia adquiridos (9,2%) fue elevada, y por tanto podemos concluir que es un dato de suma relevancia que no debería ser subestimado. Esta cuestión reafirma la necesidad de evaluar la sensibilidad a los antifúngicos de todos los aislamientos de pacientes con aspergilosis, independientemente de la forma clínica, si pensamos que en uno de cada diez pacientes aproximadamente, podría fracasar el tratamiento y la enfermedad tener una evolución tórpida.

En este trabajo solo se hallaron aislamientos con sensibilidad disminuida a itraconazol. Esto podría ser consistente con el hecho de que dicha droga es la más utilizada en nuestro medio. Más allá de esto, se observó que las modas de los valores de CIM de los antifúngicos estudiados mostraron valores relativamente bajos, por lo tanto no podríamos hablar de un peligro inminente en cuanto a aspergilosis resistentes ni una tendencia diseminada a la resistencia.

La moda de valores de CIM más baja (0,03 µg/ml) se observó para posaconazol, a diferencia de lo que ocurre en los países desarrollados donde esta es la droga frente a la cual se observa la mayor tasa de resistencia. Nuevamente esto se asocia con el uso de esta droga como antifúngico de primera línea en los países con alto nivel de desarrollo socio-económico. En

nuestro caso, el posaconazol se utiliza solo eventualmente en casos particulares por su costo elevado, podríamos pensar que esa es la razón por la que presenta valores de CIM tan bajos. Esto es beneficioso dado que en el caso de que aumentara la resistencia a los antifúngicos de mayor uso como itraconazol, voriconazol o anfotericina B, aun tendríamos una alternativa terapéutica. Esto será posible siempre y cuando no aumente la prevalencia de mutaciones que confieren resistencia cruzada a los azoles.

El fenómeno observado respecto de la sensibilidad, por un lado para itraconazol, y por otro para posaconazol, sustentaría el hecho de que las resistencias se originaran por la exposición clínica a las drogas y no por exposición ambiental a azólicos de uso agropecuario. De todas formas, como se dijo, debería complementarse este estudio clínico con un estudio realizado con aislamientos ambientales para poder establecer el verdadero perfil epidemiológico de nuestro medio de forma global, integrando ambas contribuciones.

El impacto que tiene la disminución de la sensibilidad o la resistencia de los aislamientos de *Aspergillus* en la evolución clínica de los pacientes y la progresión de su enfermedad, es una conclusión que no ha podido alcanzarse en el presente trabajo, por causa de la falta de información presente en las historias clínicas. Como se ha mencionado, los aislamientos con sensibilidad disminuida a itraconazol que se han detectado, pertenecían a pacientes que podrían considerarse “complicados”, pero dicha información no es suficiente para sacar conclusiones, tanto por la subjetividad de la aseveración como por el número de pacientes.

Para conocer el verdadero valor diagnóstico y pronóstico del estudio de la sensibilidad a antifúngicos de los aislamientos obtenidos de pacientes con aspergilosis o colonización jerarquizada de las vías aéreas por *Aspergillus*, no es suficiente con la información presentada; debería realizarse como proyecto futuro, un estudio prospectivo, con un alto número de pacientes, donde se realizara un seguimiento exhaustivo de cada paciente desde el

diagnóstico, la elección del tratamiento, la instauración del mismo y la evolución en el tiempo, constatando la resolución o no del cuadro y la presencia o no de recaídas. Además, debería realizarse la búsqueda molecular de los mecanismos de resistencia y la genotipificación de las especies para tener la seguridad de que no se trata de especies crípticas con resistencias intrínsecas.

Como se ha concluido anteriormente, el estudio de la sensibilidad a antifúngicos, es de marcada importancia por la posibilidad de enfrentar un aislamiento con sensibilidad disminuida y para conocer la situación epidemiológica de nuestro medio, por tanto contar con una técnica sencilla que arroje resultados confiables, concordantes con los que se obtendrían por medio de la metodología de referencia, sería una herramienta valiosísima para que pueda realizarse en los laboratorios de baja complejidad, dentro de los estudios de rutina. Por los datos analizados en este trabajo, podemos concluir que lo expuesto anteriormente sería asequible por medio de la técnica de difusión en medio sólido con tiras comerciales Etest®, para anfotericina B y voriconazol, con una concordancia *muy buena* con la técnica de referencia, siempre y cuando se contemple que puede existir un error de una dilución por encima o por debajo del valor “real” de la concentración inhibitoria mínima. En el caso de itraconazol no solamente que no se alcanzó una buena concordancia, sino que también se cometieron errores *mayores y muy mayores* al utilizar la técnica alternativa al método de referencia.

Lo sucedido para anfotericina B, voriconazol e itraconazol respecto de la concordancia entre métodos es similar a lo comunicado en la bibliografía (24).

Frente a un largo camino por recorrer para conocer su impacto, y a pesar de las dificultades, el estudio de la sensibilidad a antifúngicos y la tipificación de las especies, es una responsabilidad del equipo de salud para tener información para el abordaje de la enfermedad del paciente y para conocer la situación epidemiológica de nuestro medio.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca Estrella M, Rodriguez Tudela J. *Aspergillus* Section Fumigati: Antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemoter* 2008; 52: 1244-51.
- 2) Méndez Tovar L. *Aspergilosis*. Universidad Nacional Autónoma de México 2012.
- 3) Alcalá L, Muñoz P, Peláez T, Bouza E. *Aspergillus* y aspergilosis. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2011
- 4) Mayr A, Lass-Flörl C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive aspergillosis according to primary disease—review of the literature. *Eur J Med Res* 2011; 16: 153-7.
- 5) Roviraa M, Ruiz Campos I. Infecciones en el trasplante de progenitores hematopoyéticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 477-86.
- 6) Wald A, Leisenring W, Burik J van. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997; 175:1459–66
- 7) Alcalá, L., Muños, P., Peláez, T., & Bouza, E. *Aspergillus* y aspergilosis. SEIMC [en línea] 1998 [fecha de acceso 1 de julio de 2014]. Madrid-España. URL disponible en <http://www.seimic.org/control/reviMico/asperguillus.htm>.
- 8) Thompson G, Patterson T. Pulmonary aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 28: 103-10.
- 9) Sanabria Fonseca S. Aspergilosis pulmonar (revisión bibliográfica). *Rev Med Costa Rica* 2009; 587: 67-71.
- 10) Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis and treatment. *Infect Dis Clin N Am* 2006 ;20: 545-61.
- 11) Fortun J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 201-8.

- 12) Bennett J. *Aspergillus* species. En: Mandell GJ, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases (4^a ed). Churchill Livingstone, Nueva York 1995, p. 2306-11
- 13) Hope W, Walsh T, Denning D. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infect Dis 2005; 5: 609-22.
- 14) Palacio A del, Cuétara MS, Pontón J. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 90-8.
- 15) Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, *et al.* Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol 2003; 41: 2184-6.
- 16) Steinbach W, Stevens D. Review of newer antifungal and inmunomodulatory strategies for invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 2003 ; 37(Suppl 3) :S157-87.
- 17) Fortún J, Carratalá J, Lizasoain M, Salavert M, Cámara R de la, *et al.* Recomendaciones sobre el tratamiento de la enfermedad fúngica invasiva por *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011 ;29: 435-54.
- 18) Patterson P, Seaton S, Prentice H, Kibbler C. Treatment failure in invasive aspergillosis: susceptibility of deep tissue isolates following treatment with amphotericin B. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 873-6.
- 19) Walsh T, Anaissie E, Denning D, Herbercht R, Kontoyiannis D, Marr K, *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2008 ; 46: 327-60.
- 20) Stevens DA, Kan VL, Judson MA, Morrison VA, Dummer S, Denning DW, *et al.* Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Clin Infect Dis 2000; 30: 696-709.

- 21) Limper A, Knox K, Sarosi G, Ampel N, Bennett J, Catanzaro A, et al. An Official American Thoracic Society Statement: Treatment of Fungal Infections in Adult Pulmonary and Critical Care Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:96-128.
- 22) CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved-Standard. 2nd Ed. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- 23) CLSI. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi; Approved guideline. CLSI document M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
- 24) Espinel-Ingroff A, Diekma DJ, Fothergrill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 Document). *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3251-7.
- 25) Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergrill A, Fuller J, Ghannoum M, Johnson E, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 Document). *Antimicrob Agents Chemoter* 2011; 55: 5150-4.
- 26) Badiie P, Alborzi A, Moeini M, Haddadi P, Farshad S, Japoni A, et al. Antifungal susceptibility of the *Aspergillus* species by Etest® and CLSI Reference Methods. *Arch Iran Med* 2012;15:429-32.
- 27) Manavathu E, Nune U, Kanuri K, Chandrasekar P, Abraham O. Effect of test medium on *in vitro* susceptibility testing results for *Aspergillus fumigatus*. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 107-10.

- 28) Kumar R, Shrivastava S, Chakarabarti A. Comparison of broth dilution and disk diffusion method for the antifungal susceptibility testing of *Aspergillus flavus*. Am J Biomed Sci 2010; 2: 202-8.
- 29) Badiie P, Alborzi A, Moeini M, Haddadi P, Farshad S, Japoni A, Ziyaeyan M. Antifungal susceptibility of the *Aspergillus* species by Etest and CLSI reference methods. Arch Iran Med. 2012; 15: 429-32.
- 30) Mirchevska G, Bosshard P. In Vitro Susceptibility Testing of *Aspergillus* and non *Aspergillus* filamentous moulds to antifungal agents: Evaluation of three different methods. Maced J Med Sci 2012; 5: 280-7.
- 31) Osornio JF, Corzo-Leon DE, Ponce-de-Leon LA. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. Curr Fungal Infect Rep 2012; 6: 23-34.
- 32) Mayr A, Lass-Flörl C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive aspergillosis according to primary disease - review of the literature. Eur J Med Res. 2011; 16:153-7.
- 33) Hutcheson PS, Knutsen AP, Rejent AJ, Slavin RG. A 12-Year longitudinal study of *Aspergillus* sensitivity in patients with cystic fibrosis. Chest 1996;110:363-6. Sacar mayúsculas.
- 34) Camps S, Linden J van der, Li Y, Kuijper E, Dissel J van, Verweij P. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of literature. Antimicrob Agents Chemoter 2012; 56: 10-6.
- 35) Dannaoui E, Borel E, Monier MF, Piens MA, Picot S, Persat F. Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemoter 2001; 47: 333-40.
- 36) Bueid A, Howard SJ, Moore CB, Richardson MD, Harrison E, Bowyer P, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. J Antimicrob Chemoter 2010; 65: 2116-8.

- 37) Escribano P, Recio S, Peáez T, Gonzalez Rivera M, Bouza E, Guinea J, *et al.* In vitro acquisition of secondary azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates after prolonged exposure to itraconazole: presence of heteroresistant populations. *Antimicrob Agents Chemoter* 2011; 56: 174-8.
- 38) Howard S, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, *et al.* Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* asociated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1068-76.
- 39) Vadlapudi V. Antifungal resistance of few *Aspergillus* species. *Pharmacophore* 2011; 2: 163-7.
- 40) Arendrup M, Maviridou E, Mortensen K, Snelders E, Frimodt-Moller N, Khan H, *et al.* Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS Med* 2010; 5: 1-8.
- 41) Burgel T, Baixench M, Amsellem M, Audureau E, Chapron J, Kanaan R, *et al.* High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemoter* 2012 ;56: 869-74.
- 42) Snelders E, Lee H van der, Kuijpers J, Rijs A, Varga J, Samson R, *et al.* Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* 2008; 5: 1629-37.
- 43) Moore C, Sayers N, Mosquera J, Slaven J, Denning D. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *J Infect* 2000; 41: 203-20.
- 44) Faria-Ramos I, Farinha S, Neves-Maia J, Riveiro Tavares P, Miranda I, Estevinho L, *et al.* Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. *BMC Microbiology* 2014; 14: 155.

- 45) Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, *et al.* Use of epidemiological cut off values to examine 9-Year trends in susceptibility in *Aspergillus* species to the triazoles. J Clin Microbiol 2011; 49: 586-90.
- 46) Escribano P, Peláez T, Muñoz P, Bouza E, Guinea J. Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? Antimicrob Agents Chemoter 2013; 57: 2815-20.
- 47) Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu A, Hirano K, Iwanaga N, Ide E, *et al.* Antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. Antimicrob Agents Chemoter 2012; 56: 584-7.
- 48) Baddley J, Marr K, Andes D, Walsh T, Kauffman C, Kaotoyiannis D, *et al.* Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. J Clin Microbiol 2009; 47: 3271-5.
- 49) Manual de Toma, transporte y conservación de muestras del laboratorio de micología. Red de Micología GCBA. Buenos Aires 2011.
- 50) Abarca L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol 2000; 17: S79-S84
- 51) Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Instituto Nacional de Salud ; 2010.
- 52) Hoog GS de, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi, Second Edition. Amer Society for Microbiology CBS, Holanda, 2000.
- 53) Cantón Lacasa E, Martín Mazuelos E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A) En: Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. 2da. ed. Bilbao : Rev Iberoam Micol 2007.

- 54) Cerda J, Villarroel L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. Rev Chil Pediatr 2008; 79: 54-8.
- 55) López de Ullibarri G, Fernández P. Medidas de concordancia: el índice de Kappa. Cad Aten Primaria 1999; 6:169-71.
- 56) Saurav K, Kannabiran K. In vitro susceptibility pattern and distribution of *Aspergillus* spp. in hospitalized patients with chronic pulmonary Infection. Br J Pharm Toxicol 2010; 1: 45-9.