



**Caracterización morfológica y molecular de *Aspergillus* sección *Fumigati*,
obtenidos del cepario del grupo Biología Celular y Molecular CIB-UdeA en
Medellín**

Mariana Aristizábal Quintero

Microbióloga y Bioanalista

Asesor

Orville Hernández Ruíz, Doctor (PhD) en Biología

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología y Bioanálisis
Medellín, Antioquia, Colombia
2022

Cita	Aristizábal Quintero (1)
Referencia	(1) Aristizábal Quintero M. Caracterización morfológica y molecular de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> , obtenidos del cepario del grupo Biología Celular y Molecular CIB-UdeA en Medellín.[Trabajo de grado profesional]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2022.
Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	



Grupo Biología Celular y Molecular CIB UdeA

Joven Investigador Ministerio de Ciencias

Estudiante de maestría del grupo Biología Celular y Molecular: María Camila Zuleta González

Tutor: Orville Hernández Ruíz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: Jhon Jairo Arboleda Céspedes

Director: Ricardo Velasco Vélez

Jefe departamento: Natalia Valencia López

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Tabla de contenido

Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Materiales y métodos	11
Tipo de estudio y muestra	11
Caracterización macroscópica	12
Características microscópicas	12
Identificación genómica	13
Búsqueda de mutaciones en el gen CYP51	13
Prueba de susceptibilidad para diferentes antimicóticos	14
Resultados	15
Identificación morfológica	15
La identificación genómica revela a <i>Aspergillus fumigatus</i> como la especie más representada.	20
Pruebas de susceptibilidad y mutaciones en el gen CYP51.	21
Discusión	23
Conclusiones	26
Referencias	27

Lista de Tablas

Tabla 1. Fuente de origen de cada aislamiento	11
Tabla 2. Diámetro de crecimiento de los aislamientos en los medios Sabouraud, MEA, CYA y PDA	15
Tabla 3. Porcentaje de identidad de las secuencias	20
Tabla 4. MIC de aislamientos resistentes y mutaciones en gen CYP51	21

Lista de Figuras

Figura 1. Porcentaje de texturas en cada medio.	16
Figura 2. Porcentaje de topografías en cada medio	17
Figura 3. Crecimiento de la colonia por anverso y reverso	18
Figura 4. Exudado	18
Figura 5. Crecimiento y esporulación	19
Figura 6. Morfología microscópica	20

Resumen

Introducción: *Aspergillus* es un hongo de importancia clínica, del cuál se conocen aproximadamente 446 especies, las cuales no pueden diferenciarse empleando caracteres morfológicos. El 90% de las infecciones causadas por este género se atribuyen a la sección *Fumigati*. Se ha evidenciado, en este género, un incremento en la resistencia a azoles; y el mecanismo más descrito, asociado a resistencia, son mutaciones del gen *CYP51*.

Objetivo: Caracterizar aislamientos de *Aspergillus* sección *Fumigati* pertenecientes al cepario del grupo Biología celular y molecular de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), mediante herramientas morfológicas y genéticas e identificar, en estos aislamientos, mutaciones asociadas a resistencia a azoles y su perfil fenotípico de sensibilidad.

Metodología: La caracterización morfológica se realizó empleando herramientas macro y microscópicas para llegar a nivel de sección. Para la identificación a nivel de especie se secuenció el genoma completo, se ensambló y posteriormente se realizó un BLAST. Para la búsqueda de mutaciones se comparó el gen *CYP51* de los aislamientos con un genoma de referencia (AF338659.1). La concentración inhibitoria mínima (CIM) para Itraconazol, voriconazol y posaconazol se realizó siguiendo las recomendaciones del EUCAST para hongos filamentosos.

Resultados: Los 13 aislamientos secuenciados correspondieron a la especie *Aspergillus fumigatus*, 8 de ellos presentaron la mutación N298K en el gen *CYP51* reportada en China que se ha asociado a resistencia a azoles. Once de los aislamientos que se evaluaron mediante el método EUCAST fueron resistentes por lo menos a uno de los azoles evaluados.

Conclusiones: El 55% de los aislamientos presentó resistencia por lo menos a un azol, lo que genera una señal de alerta epidemiológica, únicamente 4 de los aislamientos con MIC elevada presentaron mutaciones en el gen *CYP51*, los aislamientos restantes no mostraron cambios respecto a la secuencia de referencia. Podría sospecharse que el origen de su resistencia no es a causa de mutaciones en este gen.

Palabras clave: *Aspergillus fumigatus*, Familia 51 del Citocromo P450, azoles, Secuenciación Completa del Genoma, microscopía, medios de cultivo.

Abstract

Introduction: *Aspergillus* is a clinically important fungus, of which approximately 446 species are known, which cannot be differentiated using morphological characteristics, 90% of infections caused by this genus are attributed to the *Fumigati* section. An increase in resistance to azoles has been evidenced in this genus; and the most described mechanism, associated with resistance, are mutations of the *CYP51* gene.

Objective: To characterize isolates of *Aspergillus Fumigati* section belonging to the strain collection of the Cellular and Molecular Biology group of the Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), using morphological and genetic tools and to identify, in these isolates, mutations associated with resistance to azoles and their phenotypic sensitivity profile.

Methodos: The morphological characterization was carried out at the macro and microscopic tools to reach the section level. For species-level identification, the complete genome was sequenced, assembled, and subsequently BLASTed. To search for mutations, the *CYP51* gene of the isolates was compared with a reference genome (AF338659.1). The minimum inhibitory concentration (MIC) for Itraconazole, voriconazole, and Posaconazole was performed using the EUCAST method for filamentous fungi.

Results: The 13 sequenced isolates correspond to the species *Aspergillus fumigatus* species, 8 of them presented the N298K mutation in the *CYP51* gene, reported in China, which has been associated with resistance to azoles. Eleven of the isolates that were evaluated by the EUCAST method were resistant to at least one of the azoles evaluated.

Conclusions: Fifty-five percent of the isolates presented resistance to at least one azole, which generates an epidemiological alert signal, only four of the isolates with high MIC presented mutations in the *CYP51* gene, the remaining isolates didn't show changes with respect to the sequence of the reference. It could be suspected that the origin of their resistance is not due to mutations in this gene.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, *Cytochrome P450 Family 51*, *Azoles*, Whole Genome Sequencing, microscopy, culture media.

Introducción

Aspergillus es un hongo filamentoso que se encuentra dentro del orden Eurotiales,

su taxonomía varía conforme se avanza en su análisis genético; hasta el momento se han aceptado 6 subgéneros, 27 secciones y alrededor de 446 especies (1); la sección *Fumigati* es una de las más ricas e importantes del género (2), la especie *Aspergillus fumigatus* es la más representativa y estudiada de la sección ya que se le atribuyen el 90% de las infecciones causadas por este género(3,4). Empleando herramientas morfológicas sólo es posible llegar a nivel de sección, esto debido a que las especies no pueden distinguirse fácilmente utilizando las herramientas convencionales de identificación, por ello se denominan como miembros de complejos(5,6).

Su presencia ha sido reportada en casi todos los ambientes , sus propágulos se transportan de un lugar a otro a través del viento y el polvo, ventilación o ingreso y salida de personas a determinados espacios y cuándo las condiciones son favorables (7) puede causar una alta gama de infecciones (5). Se considera como la segunda micosis oportunista en el mundo (8), más de 14 millones de personas padecen o han padecido aspergilosis (9), siendo el complejo *A. fumigatus* el que se encuentra más comúnmente asociado a infección invasiva en pacientes inmunosuprimidos (5,10), la mortalidad puede ir hasta el 90% dependiendo del tipo de huésped y la presentación clínica (5).

La gravedad a la que puedan progresar las diferentes patologías causadas por *Aspergillus* como fibrosis pulmonar, aspergilosis crónica necrosante, incluso diseminación a sistema nervioso central (SNC) con mortalidad hasta del 80%, hacen evidente la necesidad de implementar una terapia antimicótica dirigida a cada agente específico. Usualmente la terapia se realiza con anfotericina B y azoles; sin embargo, en los últimos años se ha evidenciado un incremento en la resistencia a este último grupo de antimicóticos y aunque no se conoce su origen, se atribuye al uso prolongado

de estos antimicrobianos y posiblemente a aspectos ambientales como el uso de ciertos fungicidas en la agricultura (5)

Según un análisis realizado en aislamientos de *A. fumigatus* enviados al Centro de Referencia de Micología de Manchester, el 23% de los aislamientos obtenidos en el año 2008 y el 31% de los obtenidos en el 2009 fueron resistentes por lo menos a un azol. Dentro de los aislamientos el 97% era resistente al itraconazol; solo el 3% a voriconazol, y el 78% a múltiples azoles (4).

Un estudio realizado en la ciudad de Bogotá en el año 2016, donde se recuperaron 45 aislamientos de muestras clínicas y ambientales, y utilizando el método E-Test, indicaron que el 32% de los aislados de *A. fumigatus* presentaron resistencia a voriconazol y sensibilidad intermedia a itraconazol (11).

Actualmente un mecanismo de resistencia comúnmente descrito en *A. fumigatus* es la mutación en el gen CYP51, este codifica para la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa que se encarga de la biosíntesis del ergosterol, y que actúa como blanco de los azoles; la resistencia asociada a estos antimicóticos se debe principalmente a un aumento en la expresión de esta enzima, a causa de duplicaciones en la región promotora o mutaciones puntuales dentro del mismo gen. La mutación T34 /L98H presenta una repetición en tándem de 34 pb en el promotor, a lo que se suman mutaciones puntuales dentro de este gen ocasionando un reemplazo de leucina por histidina en el codón 98 (12–15), otro mecanismo similar implica una repetición en tándem de 46 pb en la región promotora acompañada de sustituciones de fenilalanina por tirosina en el codón 121 y alanina por treosina en el 289 (TR 46 / Y121F / T289A) confiriendo resistencia a voriconazol (16)

Se han reportado frecuencias globales de resistencia a este grupo de antimicóticos

que van hasta el 28%, observándose variaciones en los diferentes estudios. En Países Bajos se encontró que 127 de 952 cepas clínicas presentaban los mecanismos de resistencia ambiental TR34 / L98H y TR46 / Y121F / T289A (17) En otro estudio realizado con la participación de 19 países se encontró que el 55,3% de los aislados de *A. fumigatus* que presentaron resistencia a azoles compartía el mecanismo anterior (18). En Colombia y específicamente en Medellín, la prevalencia de la resistencia de

Aspergillus sección *Fumigati* a los azoles se desconoce, lo que hace necesario indagar las características de susceptibilidad que tienen los aislamientos a estos antimicóticos.

Dada la dificultad que se presenta para identificar las especies por su similitud morfológica, es importante realizar una caracterización a nivel macro y microscópico que permita identificar los aislamientos hasta el nivel de sección, y posteriormente mediante marcadores moleculares determinar la especie, lo que es importante ya que los patrones de sensibilidad pueden ser diferentes entre estas. La distribución de este hongo es amplia a nivel ambiental, la alta mortalidad a la que puede llegar la aspergilosis en individuos inmunocomprometidos, los reportes sobre el incremento de la resistencia a la primera línea de tratamiento que son los azoles y el desconocimiento en Colombia y específicamente en Medellín de la prevalencia de la resistencia de *Aspergillus* sección *Fumigati* a los azoles refuerzan la importancia de realizar estudios que evalúen el perfil de susceptibilidad y las mutaciones más frecuentes en la enzima blanco de estos antimicóticos; esto con el fin de orientar nuevas investigaciones que deriven en la generación de nuevos conocimientos en cuanto a terapias alternativas y además conocer la epidemiología local puede servir como insumo para adoptar medidas que frenen la expansión de esta problemática.

Materiales y métodos

Tipo de estudio y muestra

Este trabajo es un estudio de tipo descriptivo transversal, cuya población de estudio fueron 24 aislamientos de *Aspergillus*. Se eligieron aquellos clasificados como sección *Fumigati* del cepario *Aspergillus* del grupo Biología Celular y Molecular CIB-UdeA, aislados de muestras clínicas, y ambientes intra y extrahospitalarios.

Tabla 1. Fuente de origen de cada aislamiento

Fuente		
Ambiental	Clínica	Hospitalaria
MAA-8	MCA-2	MHA-1
MAA-11	MCA-4	MHA-2
MAA-12	MCA-5	MHA-4
	MCA-6	MHA-13
	MCA-9	MHA-38
	MCA-13	MHA-43
	MCA-14	MHA-60
	MCA-15	MHA-71
	MCA-16	MHA-73
	MCA-17	MHA-77
		MHA-80

Caracterización macroscópica

Para confirmar la sección a la que pertenecían los aislamientos seleccionados, se realizó inicialmente una caracterización macroscópica. A partir del banco de conidias se cultivó un preinóculo en medio papa dextrosa agar (PDA). Después de 5 días de crecimiento, se preparó un inóculo de 1×10^5 conidias/mL, que fueron cultivadas por triplicado (2,5 μ L por cada siembra) en los medios Sabouraud, extracto de malta (MEA), agar autolizado de levadura Czapek (CYA) y papa dextrosa agar (PDA). Las cajas de petri se incubaron a 25°C y 37 °C en condiciones de oscuridad.

En el día 7 se registraron las características macroscópicas: color en anverso y reverso, diámetro, textura (algodonoso denso o laxo, aterciopelada, pulverulenta fino o grueso), topografía (Plana, elevada, con depresión central), presencia de pigmentos y exudados. Los aislamientos se cultivaron nuevamente hasta el día 40 para la búsqueda de estructuras especiales como esclerotes y cleistotecios.

Los medios incubados a una temperatura de 37°C se evaluaron a los 3 días de incubación, se determinó el crecimiento y esporulación.

De cada una de estas observaciones se realizó un registro fotográfico por el anverso y reverso con cámara Canon con el fin de determinar el código de color de la colonia con el programa Adobe Color en la escala de colores RGB. (<https://color.adobe.com/es/create/color-contrast-analyzer>)

Características microscópicas

Para evaluar las características microscópicas se empleó inicialmente la técnica de microcultivo: en una caja de petri estéril se pone un papel filtro, sobre este dos palillos de madera y un portaobjetos con 2 recortes de medio PDA de 1cm x 1cm, en cada vértice del agar se inocula un pequeño fragmento de colonia, se cubre cada uno con

una laminilla y se deposita agua estéril al papel filtro para proporcionar humedad, finalmente se incubó a 25°C. Las láminas portaobjetos se desmontaron el día 4; para su preservación se utilizó azul de lactofenol con y sin líquido de montaje.

Se evaluaron: características del conidióforo (longitud, grosor de la pared, textura, ramificación, pigmento, color del pigmento), célula pie (presencia, tipo de simetría), vesícula (forma, tamaño), métula (presencia), fiálides (fertilidad), conidias (forma, tamaño, textura, color, organización), penicilias, vesícula proliferante y estructuras especiales como cleistotecios (presencia, tamaño, color), ascosporas (presencia, tamaño, color, pared, forma, textura, tipo de ornamentación), células de Hülle (presencia, tamaño, color, forma) con las claves taxonómicas de Samson y Pitt, Klich y Visagie (19).

Se realizó un registro fotográfico en los objetivos de 10x, 40x y 100x con el software Leica LAS EZ versión 3.4.0 en el microscopio DM750 y cámara ICC50W. Las mediciones se realizaron a partir de las fotos con el programa ImageJ versión 1.8.0. Se evaluaron 200 conidias, entre 23-50 conidióforos, 25 y 50 vesículas.

Identificación genómica

Se seleccionaron 13 aislamientos identificados morfológicamente como *Aspergillus* sección *Fumigati*. Las secuencias de los genes Betatubulina, Calmodulina, RNA polimerasa II y espaciadores transcritos internos (ITS) de los 13 aislamientos (10 de ambientes intrahospitalarias y 3 clínicas), fueron proporcionados por las por el grupo Biología Celular y Molecular CIB-UdeA del área de biología computacional. Para la identificación a nivel de especies se realizó un BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) por cada secuencia y se tuvieron en cuenta parámetros como porcentaje de identidad y cobertura cercanas al 100%, cobertura y un E value de 0,0 con secuencias de centros de referencia.

Búsqueda de mutaciones en el gen *CYP51*

Para evaluar la presencia de mutaciones el gen *Cyp51* se hizo análisis del gen y su región promotora en los 13 aislamientos elegidos, esto mediante un alineamiento

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Aspergillus* SECCIÒN *Fumigati...*

múltiple en Geneious, con la secuencia de referencia de este gen en *A. fumigatus* tipo silvestre con código del GenBank AF338659.1. Después de tener el alineamiento se realizó una búsqueda de los cambios de bases respecto a la secuencia de tipo silvestre.

Prueba de susceptibilidad para diferentes antimicóticos

Se evaluó la sensibilidad a voriconazol, posaconazol, itraconazol en todos los aislamientos, la concentración mínima inhibitoria (MIC) se determinó utilizando el método de microdilución en caldo para hongos filamentosos propuesto por EUCAST. Se utilizó el caldo RPMI 1640 con 2% de glucosa, con un inóculo inicial de 2×10^5 UFC/mL, esto se hizo por duplicado y se incubó durante 48 horas a 37°C, la lectura se realizó con ayuda de un espejo.

Resultados

Identificación morfológica

Basados en las claves morfológicas, 24 aislamientos fueron clasificados como *Aspergillus* sección *Fumigati*, y se tuvieron en cuenta las características como color verde-grisáceo de la colonia, cabezuelas uniseriadas y columnares, y conidias globosas o subglobosas que pueden ser lisas o rugosas.

Tabla 2. Diámetro de crecimiento de los aislamientos en los medios Sabouraud, MEA, CYA y PDA

Aislamiento	Diámetro de la colonia			
	Sabouraud	MEA	CYA	PDA
MCA-2	6,8	5	6,7	6,3
MCA-4	6,1	6,5	6,1	6,1
MCA-5	6,9	6,3	6,7	6,4
MCA-6	6	5,5	5,2	5,4
MCA-9	2	5,3	3,9	4,7
MCA-13	7,5	6,4	7,7	7,8
MCA-14	7,6	6,3	7,5	7,6
MCA-15	7,8	6,4	7,8	7,8
MCA-16	7,5	6,3	7,1	7,4
MCA-17	7,8	6,6	7,9	8
MAA-8	2,2	3,4	2,3	4,9
MAA-11	6,4	6	6,1	6,6
MAA-12	2,4	3,1	1,7	3,8
MHA-1	6,1	6,7	6,8	6,7

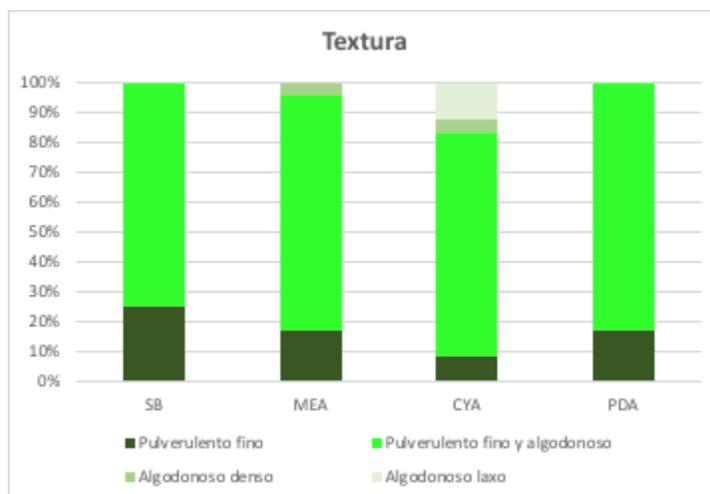
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Aspergillus* SECCIÓN *Fumigati...*

MHA-2	5,8	6,6	6,6	6,5
MHA-4	6,2	6,5	6,4	6,4
MHA-13	5,9	3,6	5,2	5,9
MHA-38	6,6	6,7	6,6	6,7
MHA-43	6,5	6,6	6,5	6,5
MHA-60	5,1	5,1	4,8	5
MHA-71	6,4	6,1	6,1	6,6
MHA-73	6,1	6,4	6,4	6,2
MHA-77	6,2	6,4	6,7	6,7
MHA-80	6,4	6,7	6,7	6,7
Promedio	6,0125	5,85416667	6,0625	6,3625
Desviación estándar	1,69593351	1,08225978	1,5650566	1,07912101

Nota. Se muestra el aislamiento y el diámetro de crecimiento en los medios SB, MEA, CYA y PDA en el día 7. Se obtuvieron colonias con un crecimiento promedio de 6 cm en el medio Sabouraud, 5,8 cm en MEA, 6 cm en CYA, 6,4 cm en PDA.

El 68,4%, 78,9%, 68,4%,78,9% de los aislamientos presentaron una textura pulverulenta fina y algodonosa en los medios Sabouraud, MEA, CYA y PDA respectivamente. El 31,6%, 21,1%,10,5% y 21,1% presentaron una textura pulverulenta fina en Sabouraud, MEA, CYA y PDA, respectivamente. En CYA se presentaron texturas adicionales como algodonosa laxa en el 15,8% de las colonias y 5,3% algodonosa densa.

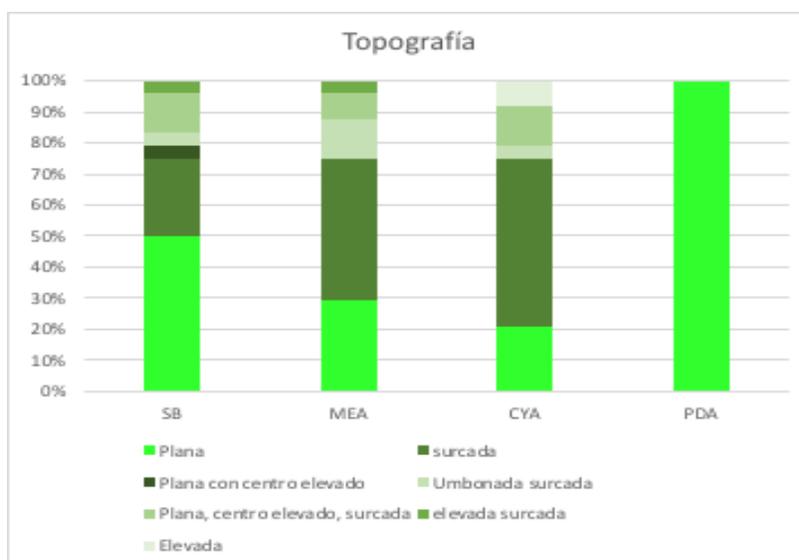
Figura 1. Porcentaje de texturas en cada medio.



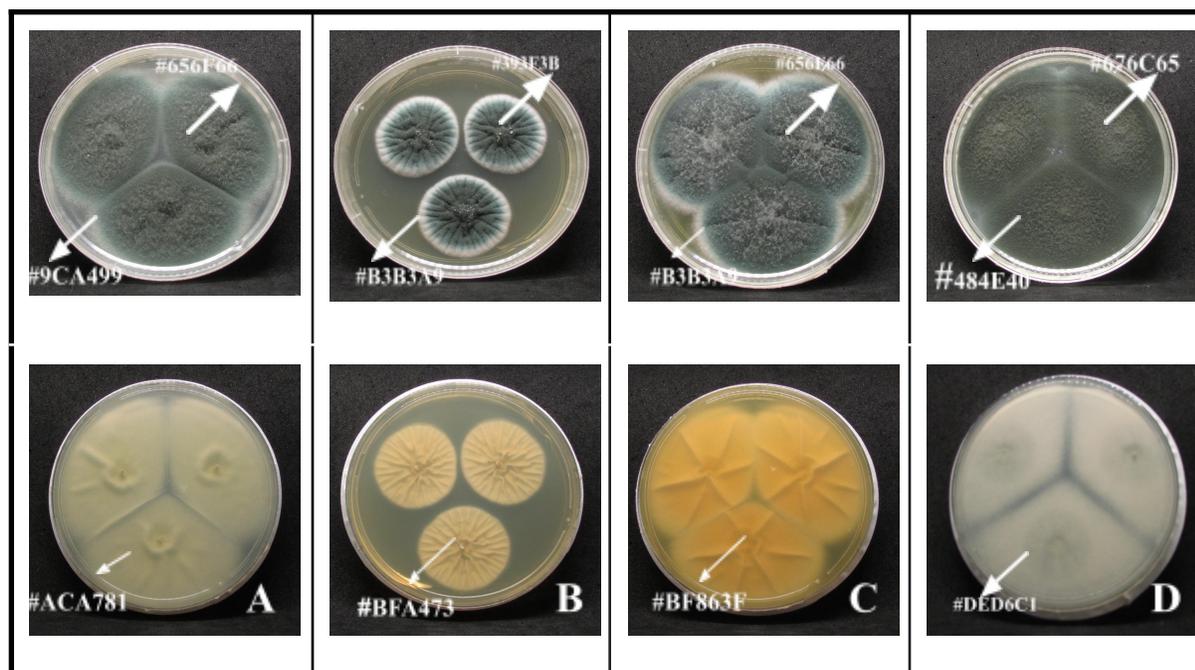
Nota. Se evidencia gráficamente el porcentaje de cada textura que se obtuvo en los diferentes medios de cultivo, con mayor representación de la textura pulverulenta fina y algodonosa.

El 26,3%, 42%, 57,9% de las colonias presentaron surcos en los medios Sabouraud, MEA y CYA, respectivamente. También fue común la topografía plana con un 52,6%, 36,8%, 26,3% y 100% en Sabouraud, MEA, CYA y PDA. El 5,3% fueron planas con centro elevado y surcadas tanto en Sabouraud como en MEA. El 5,3% en MEA y CYA fue umbonada surcada. El 10,5% en CYA tuvo una topografía elevada y el 5,3% plana con centro elevado en Sabouraud y 5,3% elevada surcada. (Figura 2,3)

Figura 2. Porcentaje de topografías en cada medio



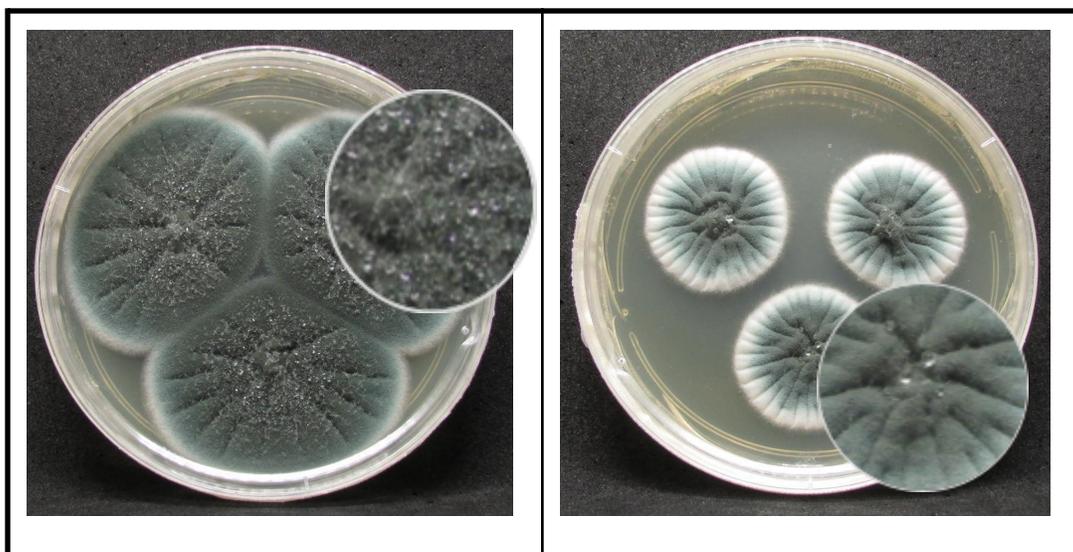
Nota. Se evidencia gráficamente el porcentaje de cada topografía que se obtuvo en los diferentes medios de cultivo.

Figura 3. Crecimiento de la colonia por anverso y reverso

Nota. Colonias de *Aspergillus Fumigati* en su anverso y reverso a los 7 días de crecimiento incubadas a 25°C. **A.** Colonia en medio Sabouraud, de textura pulverulenta fina y topografía plana, las flechas indican el código de color en ese punto de la colonia; **B.** Colonia en medio extracto de Malta, tiene una textura pulverulenta fina y una topografía plana surcada con centro elevado; **C.** Colonia en CYA, de textura pulverulenta fina y algodonosa y de topografía surcada. **D.** Colonia en PDA, de textura pulverulenta fina y algodonosa y topografía plana.

El 25% de las colonias presentó un exudado transparente en el día 7, únicamente en el medio extracto de malta.

Figura 4. Exudado

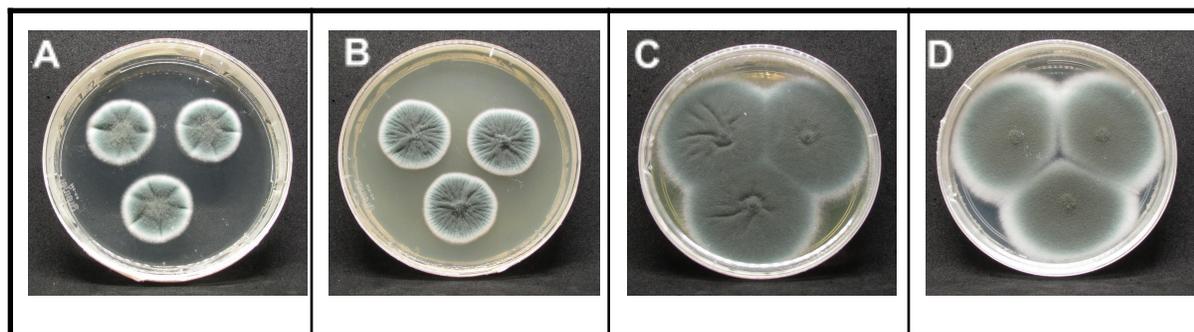


Nota. Exudado transparente de colonias de *Aspergillus* sección *Fumigati* en medio Extracto de Malta

Ningún aislamiento mostró presencia de esclerotes, cleistotecios o alguna estructura especial en las placas realizadas a los 40 días de incubación a 25°C.

Todos los aislamientos incubados a 37°C crecieron y esporularon en el día 3 de incubación.

Figura 5. Crecimiento y esporulación

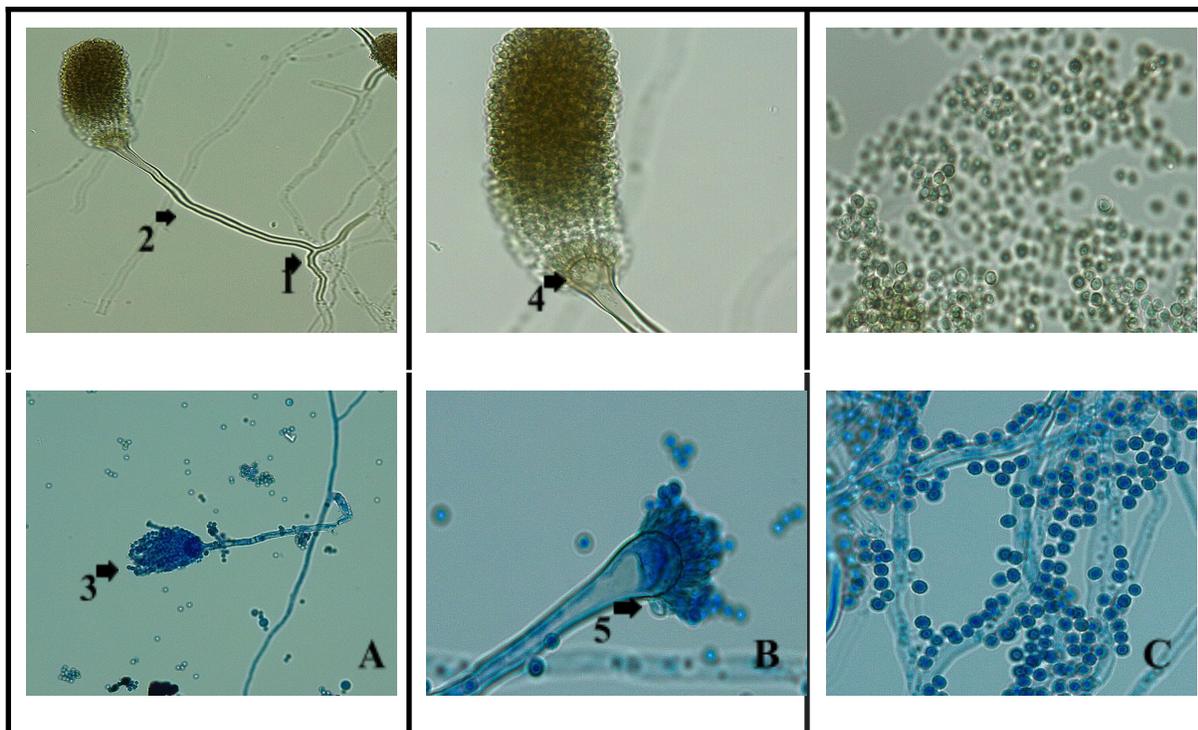


Nota. Crecimiento y esporulación a 37°C en los medios **A.** SB, **B.** MEA, **C.** CYA y **D.** PDA.

Microscópicamente los conidióforos presentaron una longitud muy diversa entre cada aislamiento, que va desde los 30 a los 350 μm , con una pared delgada, lisa, sin ramificaciones y con un pigmento ligeramente café. La mayoría de los aislamientos tenía presencia de célula pie asimétrica. Presentaron cabezuelas parcialmente fértiles cuya vesícula tenía forma subglobosa e iba desde los 2,4 μm hasta los 42,6 μm de

diámetro. Las conidias tenían una organización columnar, textura lisa, forma subglobosa, pigmentación café verdosa y un diámetro entre 1,3 y 3,9 μm .

Figura 6. Morfología microscópica



Nota. Morfología microscópica de los aislamientos de *Aspergillus* sección *Fumigati*. En la parte superior se encuentran las estructuras en líquido de montaje, en la parte inferior con azul de lactofenol.

A. Cabezuela de *Aspergillus* sección *Fumigati* en 10x. La flecha 1 señala la célula pie asimétrica, la 2 el conidióforo, la 3 señala la cabezuela uniseriada con organización columnar; **B** Vesícula de *Aspergillus* sección *Fumigati* en 40x, la flecha 4 señala una vesícula de forma subglobosa, la flecha número 5 señala las fiálides; **C** Se observan en 100x las conidias de forma subglobosa y globosa, de pared lisa y con un pigmento verdoso.

La identificación genómica revela a *Aspergillus fumigatus* como la especie más representada.

Los 13 aislamientos a los que se les realizó la identificación genómica, según los genes calmodulina, B-tubulina, RNA pol II e ITS correspondieron a la especie *Aspergillus fumigatus*. Los 11 aislamientos restantes del n total pertenecen a la sección *Fumigati* según las características morfológicas.

Tabla 3. Porcentaje de identidad de las secuencias

Aislamiento	%Identidad para cada marcador				Especie
	ITS	Calmodulina	RNA pol II	B-tubulina	
MHA-1	100%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MHA-2	100%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MHA-4	100%	100%	100%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MHA-13	100%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MHA-38	100%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MHA-43	100%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MHA-71	100%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MHA-73	100%	100%	100%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MHA-77	100%	100%	100%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MHA-80	100%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MCA-4	100%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MCA-5	100%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MCA-6	99,83%	100%	99,9%	100%	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Pruebas de susceptibilidad y mutaciones en el gen *CYP51*.

Diez aislamientos presentaron resistencia por lo menos a un azol, dos aislamientos fueron resistentes únicamente a la acción de itraconazol, uno a posaconazol y dos aislamientos a voriconazol. Tres aislamientos fueron resistentes a posaconazol e itraconazol, y dos aislamientos tuvieron resistencia panazólica.

No se encontraron mutaciones en la región promotora del gen *CYP51A* en ninguno de los aislamientos. Ocho aislamientos presentaron una sustitución en el codón 248 correspondiente a la mutación N248K

Tabla 4. MIC de aislamientos resistentes y mutaciones en gen *CYP51*

AISLAMIENTOS	MIC(mg/L)			Mutación
	VOR	ITR	POS	

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Aspergillus* SECCIÒN *Fumigati*...

RESISTENTES				
MCA-4	1	2	0,25	N/A
MCA-5	1	2	0,25	N/A
MCA-9	1	4	0,5	N/A
MCA-13	1	1	0,25	N/A
MCA-14	2	2	0,5	N/A
MCA-17	1	1	0,25	N/A
MAA-11	1	1	0,25	N248K
MHA-1	1	1	0,125	N248K
MHA-2	1	1	0,5	N/A
MHA-4	1	2	0,5	N/A
MHA-13	1	2	0,5	N248K
MHA-43	1	1	0,25	N248K
MHA-60	2	2	0,5	N248K
MHA-71	2	1	0,25	N248K
MHA-73	1	0,5	0,25	N248K
MHA-77	2	0,5	0,25	N248K
MHA-80	1	0,5	0,25	N248K

Nota. Se muestra la Mínima concentración inhibitoria de aislamientos que fueron resistentes para voriconazol, itraconazol y/o posaconazol, y mutaciones encontradas en el gen *CYP51*.

Discusión

Las especies *Aspergillus* de la sección *Fumigati* son muy similares entre sí a nivel morfológico, por lo cual es difícil diferenciarlas utilizando las claves taxonómicas descritas, y esto evidencia las limitaciones que presentan los métodos diagnósticos convencionales. Las especies de esta sección presentan una coloración característica verde-grisácea, su textura inicia algodonosa y se va tornando pulverulenta a medida que el cultivo envejece, su topografía es predominantemente plana y con surcos

dependiendo del medio de cultivo en el cuál está creciendo. En cuanto a las características microscópicas, esta sección presenta una cabezuela columnar, uniseriada, y parcialmente fértil, cuya vesícula puede medir hasta 30 μm , y tiene forma subglobosa, su conidióforo es generalmente liso y su longitud puede alcanzar los 400 μm , las conidias tienden a ser un poco rugosas o lisas y su diámetro es aproximadamente de 2-3 μm . Los hallazgos macro y micro morfológicos encontrados en nuestro estudio coinciden con la descripción que plantean Klich y Pitt para *Aspergillus* sección *Fumigati* en la mayoría de los aislamientos (20). Se encontraron diferencias morfológicas en 3 aislamientos de la sección, que pudieran ser sugestivas de pertenecer a especies diferentes de esta sección, su diámetro de crecimiento por los menos en 3 medios fue inferior a 40mm a diferencia de los demás aislamientos que en general era superior a los 60mm, adicionalmente su textura fue predominantemente pulverulenta, sin regiones algodonosas y estas características generalmente coexistieron en los demás aislamientos, también sus surcos y elevaciones fueron más pronunciados que los de los demás, esta agrupación de características macro morfológicas diferentes podrían ser sugestivas de especies diferentes a *A. fumigatus*; sin embargo las herramientas morfológicas no son suficientes para hacer tal diferenciación, y es necesario secuenciar su genoma para establecer con certeza la especie a la que pertenecen (20)

No se ha descrito hasta el momento reproducción sexual, ni presencia de estructuras especiales como células de Hulle, cleistotecios o ascosporas para esta sección de *Aspergillus*, hecho que se reiteró en este trabajo al realizar las placas de cultivos con 40 días de incubación en condiciones de oscuridad, y no hallar alguna de estas estructuras (21)

Morfológicamente dentro de cada sección del género *Aspergillus* se comparten características que hacen imposible la identificación a nivel de especie; sin embargo, mediante técnicas de secuenciación se puede llegar a discernir entre cada una de ellas. *Aspergillus fumigatus* es la especie más descrita de la sección *Fumigati* ya que es la más frecuentemente se aislada en pacientes con aspergilosis y se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente. En este estudio, los 13 aislamientos secuenciados, corresponden a *A. fumigatus*, y se aislaron tanto de muestras clínicas

como de muestras hospitalarias, sus características morfológicas cómo el diámetro, textura y topografía fueron similares entre sí. Este hallazgo muestra una variación respecto a un estudio realizado en Perú en el que se encontró únicamente el 50% de los aislamientos recuperados de pacientes con Aspergilosis invasiva correspondían a la especie *A. fumigatus* (22).

En este estudio se encontró que el 58% de los aislamientos son sensibles a la acción de los 3 azoles, sin importar la fuente de la que se aislaron, 1 aislamiento fue resistente únicamente a posaconazol, 9% fue resistente a todos los azoles, 21% a Itraconazol y voriconazol, 9% a voriconazol únicamente. Los azoles son los tratamientos primarios para combatir la aspergilosis, debe resaltarse que debido a los pocos estudios realizados, no existe un valor de corte para determinar la resistencia de *Aspergillus* a los antifúngicos y únicamente se brindan valores de corte epidemiológicos. El alto porcentaje de resistencia encontrado podría ser una alerta epidemiológica, para la realización de más estudios que puedan brindar datos sobre la resistencia real de las cepas de *Aspergillus* que circulan en la ciudad.

Un estudio realizado en Bogotá - Colombia en el año 2016 recuperó 45 aislamientos de muestras clínicas y ambientales concluyendo, mediante el método E-Test, que el 32% de aislados de *A. fumigatus* presentaba resistencia a voriconazol y sensibilidad intermedia a itraconazol (23). En nuestro estudio se encontró un porcentaje mayor de resistencia, el 55% de los aislamientos no fue susceptible a la acción de por lo menos un azol, esta variación puede deberse al tipo de ambiente evaluado, que en nuestro caso es hospitalario y podría representar un mayor número de aislamientos resistentes por el uso de desinfectantes que cotidianamente son necesarios en estos lugares.

Las mutaciones que más frecuentemente confieren resistencia a azoles son la T34 /L98H y TR 46 / Y121F / T289A, estas implican un aumento en la producción de la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa encargada de la biosíntesis del ergosterol, y que actúa como blanco de los azoles, también se disminuye la afinidad de los antimicóticos sobre esta enzima, causando resistencia principalmente a Voriconazol. En los aislamientos evaluados en este estudio no se encontraron estas mutaciones. Sin embargo, se halló una sustitución en la posición 248 del gen *CYP51A*, esta mutación se ha reportado como frecuente en China, pero en nuestro país es el primer reporte

conocido, a esta mutación en conjunto con la mutación V436A se le ha atribuido como causante de resistencia a azoles; sin embargo, la mutación N248K por si sola no ha sugerido resistencia en *Aspergillus fumigatus* (24,25).

La mutación N248K se encontró en 8 aislamientos cuya fuente de aislamiento fue únicamente hospitalaria, 4 de estos aislamientos no presentaron resistencia a ningún antifúngico, los 4 aislamientos restantes que presentaron la mutación (Tabla 4) fueron resistentes a itraconazol+posaconazol, panazol y voriconazol respectivamente; sin embargo no puede asegurarse que la presencia de esta mutación sea la causante de la resistencia. Los aislamientos restantes que presentaron resistencia a por lo menos un antifúngico no presentaron ninguna mutación en el gen *CYP51A*, y el origen de su resistencia puede deberse a mecanismos diferentes.

Conclusiones

El estudio macro y micromorfológico de *Aspergillus* sección *Fumigati* permite determinar certeramente la sección; sin embargo es completamente necesario realizar análisis con marcadores moleculares para identificar la especie a la que pertenecen.

El uso de los genes B-tubulina, Calmodulina, ITS y RNAPol II permitieron determinar que los 13 aislamientos secuenciados son *Aspergillus fumigatus*.

El 42% de los aislamientos presentó resistencia por lo menos a un azol, lo que genera una señal de alerta epidemiológica, únicamente 4 de los aislamientos con MIC elevada presentaron mutaciones en el gen *CYP51A*, los aislamientos restantes no mostraron cambios respecto a la secuencia de referencia.

La mutación N248K (*CYP51A*) no explica por sí sola la resistencia a Itraconazol, voriconazol y posaconazol. Podría sospecharse que el origen de su resistencia no es a causa de mutaciones en este gen.

Referencias

1. J H, S K, Cm V, N Y, Xc W, M M, et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol* [Internet]. 27 de junio de 2020 [citado 3 de noviembre de 2022];95. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32855739/>
2. Giusiano GE, Piontelli E, Fernández MS, Mangiaterra ML, Cattana ME, Kocsubé S, et al. Biodiversity of species of *Aspergillus* section *Fumigati* in semi-desert soils in Argentina. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 1 de julio de 2017 [citado 3 de noviembre de 2022];49(3):247-54. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117300160>
3. L EP. APORTES MORFOTAXONÓMICOS EN EL GENERO *Aspergillus* Link: CLAVES PARA LAS ESPECIES AMBIENTALES Y CLINICAS MAS COMUNES. *Bol Micológico* [Internet]. 1 de diciembre de 2008 [citado 3 de noviembre de 2022];23. Disponible en: <https://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/122>
4. A B, Sj H, Cb M, Md R, E H, P B, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. octubre de 2010 [citado 3 de noviembre de 2022];65(10). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20729241/>
5. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica* [Internet]. 1 de abril de 2012 [citado 3 de noviembre de 2022];30(4):201-8. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-aspergilosis-formas-clinicas-tratamiento-S0213005X12000316>
6. Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [citado 3 de noviembre de 2022];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00683>
7. Determinación y comparación aerobiológica en tres archivos de la Empresa de Energía de Boyacá, Tunja (Colombia) [Internet]. [citado 3 de noviembre de 2022]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522015000300010
8. Micología médica básica, 5e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical [Internet]. [citado 3 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1529>
9. *Aspergillus*, un asesino desconocido [Internet]. [citado 3 de noviembre de 2022]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-87482021000200112&script=sci_abstract&lng=es

10. Gavaldà J, Ruiz I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección por *Aspergillus* spp. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica* [Internet]. 1 de diciembre de 2003 [citado 3 de noviembre de 2022];21(10):571-8. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-recomendaciones-el-tratamiento-infeccion-por-13054551>
11. Guzmán LDM, Caicedo LMM. Comparación del perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp. a partir de aislamientos clínicos y ambientales de un centro hospitalario de cuarto nivel de complejidad. 2016;48.
12. Spiess B, Postina P, Reinwald M, Cornely OA, Hamprecht A, Hoenigl M, et al. Incidence of Cyp51 A Key Mutations in *Aspergillus fumigatus*—A Study on Primary Clinical Samples of Immunocompromised Patients in the Period of 1995–2013. *PLOS ONE* [Internet]. 29 de julio de 2014 [citado 3 de noviembre de 2022];9(7):e103113. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103113>
13. Breakthrough pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection with multiple triazole resistance in a Spanish patient with chronic myeloid leukemia [Internet]. [citado 3 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-pdf-S1130140612000873>
14. Hussein K. Molecular detection of CYP51 genes in *Aspergillus fumigatus*. 1 de marzo de 2019;
15. Pham CD, Reiss E, Hagen F, Meis JF, Lockhart SR. Passive Surveillance for Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011–2013. *Emerg Infect Dis* [Internet]. septiembre de 2014 [citado 3 de noviembre de 2022];20(9):1498-503. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4178384/>
16. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis*. 15 de agosto de 2017;216(suppl_3):S436-44.
17. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión [Internet]. [citado 3 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-84472016000300127
18. van der Linden JWM, Arendrup MC, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser PM, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis*. junio de 2015;21(6):1041-4.
19. Samson RA, Visagie CM, Houbbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* [Internet]. junio de 2014 [citado 3 de noviembre de 2022];78:141-73. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260807/>

20. Green MR, Sambrook J, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. 3 p.
21. Serrano R, Gusmão L, Amorim A, Araujo R. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. *BMC Microbiol* [Internet]. 21 de abril de 2011 [citado 3 de noviembre de 2022];11(1):82. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-82>
22. Giusiano GE, Piontelli E, Fernández MS, Mangiaterra ML, Cattana ME, Kocsubé S, et al. Biodiversity of species of *Aspergillus* section *Fumigati* in semi-desert soils in Argentina. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 1 de julio de 2017 [citado 3 de noviembre de 2022];49(3):247-54. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117300160>
23. Guzmán LDM, Caicedo LMM. Comparación del perfil de susceptibilidad de *Aspergillus* spp. a partir de aislamientos clínicos y ambientales de un centro hospitalario de cuarto nivel de complejidad. 2016;48.
24. Won EJ, Joo MY, Lee D, Kim MN, Park YJ, Kim SH, et al. Antifungal Susceptibility Tests and the *cyp51* Mutant Strains among Clinical *Aspergillus fumigatus* Isolates from Korean Multicenters. *Mycobiology*. 2020;48(2):148-52.
25. Béjar V, Villanueva F, León SR, Guevara-Granados JM, Uribe A, Vergaray G, et al. Identificación molecular de *Aspergillus fumigatus* aislados de pacientes con aspergilosis invasiva. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. enero de 2019 [citado 3 de noviembre de 2022];36(1):81-6. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342019000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es