

# Resistencia a los azoles en cepas de *Aspergillus fumigatus sensu stricto* aislados de muestras clínicas respiratorias

## Azole resistance in strains of *Aspergillus fumigatus sensu stricto* isolated from respiratory clinical samples

José Guevara <sup>1,2,a</sup>, Freddy Villanueva-Cotrina <sup>1,b</sup>, Betsy Cayampi Quispe <sup>1,c</sup>, César Cabezas Sánchez <sup>1,d</sup>, Jorge Sanchez-Perez <sup>1,e</sup>, Germán Vergaray Ulffe <sup>3,f</sup>, Guillermo García-Effrón <sup>4,g</sup>, Soledad Gamarra <sup>4,h</sup>, Vilma Béjar Castillo <sup>1,i</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical «Daniel Alcides Carrión», Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones Ciencias Biológicas «Antonio Raimondi», Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

<sup>4</sup> Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular, Cátedra de Parasitología y Micología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

<sup>a</sup> Médico patólogo clínico. ORCID: orcid.org/0000-0003-2018-0339

<sup>b</sup> Magister en investigación epidemiológica. ORCID: orcid.org/0000-0001-8578-274X

<sup>c</sup> Bióloga. ORCID: orcid.org/0000-0002-0651-5780

<sup>d</sup> Médico infectólogo. ORCID: orcid.org/0000-0001-5120-0713

<sup>e</sup> Tecnólogo médico. ORCID: orcid.org/0000-0003-1245-159X

<sup>f</sup> Doctor en ciencias biológicas. ORCID: orcid.org/000-0003-3927-4650

<sup>g</sup> Doctor en filosofía (PhD) con especialidad en resistencia antifúngica. ORCID: orcid.org/0000-0002-6511-1399

<sup>h</sup> Doctora en biología molecular. ORCID: orcid.org/0000-0003-2733-4492

<sup>i</sup> Magister en salud pública. ORCID: orcid.org/0000-0001-9834-0895

An Fac med. 2023;84(4):416-422./ DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v84i4.26323>.

### Correspondencia:

José María Guevara Granados  
jguevarag@unmsm.edu.pe

Recibido: 21 de octubre 2023

Aprobado: 29 de noviembre 2023

Publicación en línea: 18 de diciembre 2023

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Fuente de financiamiento: Resolución Rectoral 03556-R-19, Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación. Año 2019. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Contribuciones de autoría: GGJ, BV, CB, GEG y GS participaron en la recolección de resultados, diseño y redacción del artículo. BV, SJA y GGJ participaron en la concepción, diseño y redacción del artículo. CC, VG, VF, GEG y GA participaron en el análisis e interpretación de resultados y revisión crítica del artículo. Todos los autores aprobaron la versión final.

Citar como: Guevara J, Villanueva-Cotrina F, Cayampi B, Cabezas C, Sanchez-Perez J, Vergaray G, et al. Resistencia a los azoles en cepas de *Aspergillus fumigatus sensu stricto* aislados de muestras clínicas respiratorias. An Fac med. 2023;84(4):416-422. DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v84i4.26323>.

### Resumen

**Introducción.** La aspergilosis invasiva presenta alta mortalidad en pacientes con enfermedades crónicas e inmunocomprometidos. *Aspergillus fumigatus sensu stricto* (AFSS) es el principal agente etiológico y su tipificación requiere de métodos moleculares. La incidencia incrementada de AI resistentes a los antifúngicos demanda un diagnóstico certero y oportuno. **Métodos.** Se estudiaron 20 cepas de la micoteca del Instituto de Medicina Tropical – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aisladas de muestras respiratorias e identificadas como *Aspergillus fumigatus sensu lato* mediante el estudio macroscópico y microscópico. Las cepas fueron referidas a la Universidad Nacional del Litoral para su tipificación mediante una PCR screening para AFSS basada en secuencias del gen CYP51A y el estudio de sensibilidad antifúngica para voriconazol (VOR), itraconazol (ITC), posaconazol (POS), isavuconazol (ISA), anidulafungina (ANF), caspofungina (CSF) y anfotericina B (AMB) obteniendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el protocolo de CLSI M38M51S-Ed3. **Resultados.** Las 20 cepas fueron identificadas como AFSS. Ninguna de las cepas tuvo una CIM por encima del punto de corte clínico (VOR), ni epidemiológico (ITC, ISA, AMB y CSF). POS fue la droga más potente frente a la colección de cepas evaluadas (media geométrica (GM) de CIM de 0,042 µg/ml). **Conclusiones.** Todos los aislamientos fueron tipificados como AFSS sensibles a los azoles según los puntos de corte clínico, posaconazol tuvo la mayor actividad antifúngica. Nuestros hallazgos aportan a incrementar la escasa información sobre la etiología y sensibilidad a los antifúngicos de uso clínico de las aspergilosis invasiva en nuestro país.

**Palabras clave:** *Aspergillus fumigatus*; Aspergilosis; Antimicóticos; Farmacorresistencia Fúngica; Perú. (Fuente: DeCS Bireme)

### Abstract

**Introduction.** Invasive Aspergillosis (IA) poses a significant threat to patients with chronic diseases and compromised immune systems, with *Aspergillus fumigatus sensu stricto* (AFSS) being the primary etiological agent. Accurate and timely diagnosis is crucial, particularly given the rising incidence of IA strains resistant to antifungals, necessitating molecular methods for typing. **Methods.** Twenty strains from Instituto de Medicina Tropical - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mycological collection, previously identified as *Aspergillus fumigatus sensu lato* through macroscopic and microscopic analysis, were studied. These strains were forwarded to the Universidad Nacional del Litoral for AFSS typing using a PCR screening based on CYP51A gene sequences. Antifungal susceptibility testing was performed for Voriconazole (VOR), Itraconazole (ITC), Posaconazole (POS), Isavuconazole (ISA), Anidulafungin (ANF), Caspofungin (CSF), and Amphotericin B (AMB), obtaining Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) according to CLSI M38M51S-Ed3. **Results.** All 20 strains were identified as AFSS. None of the strains exhibited MICs above the clinical breakpoint (VOR) or the epidemiological cutoffs (ITC, ISA, AMB, and CSF). POS demonstrated the highest potency against the strain collection, with a geometric mean MIC of 0,042 µg/ml. **Conclusions.** All isolates were classified as azole-sensitive *Aspergillus fumigatus sensu stricto* (AFSS) based on clinical cutoff points, particularly posaconazole, which exhibited superior antifungal activity. Our findings contribute to augmenting the limited information on the etiology and clinical antifungal sensitivity of IA in our country.

**Keywords:** *Aspergillus fumigatus*; Aspergillosis; Drug Resistance, Fungal; Peru (source: MeSH NLM)

## INTRODUCCIÓN

Las micosis son consideradas como enfermedades desatendidas en la región latinoamericana, y entre ellas resalta la aspergilosis invasiva (AI). Esta infección es producida por *Aspergillus fumigatus sensu stricto* (AFSS), cuyo diagnóstico se realiza fenotípica y molecularmente. Tiene una elevada mortalidad (cerca a 50%) y morbilidad en pacientes con enfermedades crónicas. Estudios multicéntricos han detectado una mortalidad de 19 a 28% y se incrementa a 49% cuando hay resistencia a voriconazol (VOR) <sup>(1)</sup>. En los Estados Unidos un estudio de vigilancia nacional de *Aspergillus fumigatus* (AF) entre 2015 a 2017, encontró a partir de 179 cepas clínicas y 12 cepas ambientales (granjas de cultivo), una prevalencia de 26% de resistencia a triazoles, y 25% de detección de mutaciones del gen *cyp51A* <sup>(2)</sup>. En Latinoamérica existen estudios aislados de resistencia a triazoles en cepas clínicas y ambientales, que reportan una prevalencia aproximada de 3,2%, del cual AF ocupa el 78% de casos <sup>(3)</sup>.

Los estudios epidemiológicos diferencian la condición clínica de las personas como portador o colonizado, y la infección como la AI, aspergilosis pulmonar crónica (APC) y aspergilosis bronco pulmonar alérgica (ABPA) <sup>(4)</sup>. Las guías de práctica clínica utilizan a los azoles como terapia de primera línea contra infecciones por AF hasta que surja el evento de falla terapéutica por resistencia <sup>(5)</sup>. La alarma de salud pública por esta infección debe justificarse por la alta diseminación de conidias ambientales que generan resistencia por generación *de novo* (espontánea) o diseminación clonal de genes asociados <sup>(2,6)</sup>. El mecanismo de resistencia a azoles en AF puede ser simplificado en 2 vías según el origen de la cepa: 1. la presión selectiva ejercida por pesticidas tipo azoles en agricultura (en Europa y Asia el uso es de 20 a 40%, en EE.UU. es <5%, y en Latinoamérica solo hay registros de Colombia) <sup>(1,3,6,7)</sup> y 2. la generación de resistencia en conidias ambientales, o por el uso prolongado de azoles como terapia antifúngica sobre todo en pacientes con enfermedades crónicas pulmonares <sup>(3,6)</sup>.

Se han identificado filogenéticamente dos clados de AF resistente a azoles

a partir de la vigilancia estadounidense: clado A (12%) portador de la mutación TR34/L98H específicos de Europa y Asia; y el clado B (83%) donde se encuentran cepas sin el marcador TR34/L98H aunque diseminadas en cepas ambientales y clínicas <sup>(2)</sup>. Las cepas clínicas obtenidas de especímenes invasivos (AI, APC, aspergilo-ma) son de utilidad para la identificación y evaluación de factores de virulencia en ensayos *in vitro*, y el reconocimiento de genes asociados a resistencia a antifúngicos <sup>(8)</sup>. Un estudio demostró que 4 aislamientos peruanos procedentes de AI poseen una tasa de crecimiento vegetativo más rápido hasta en 48°C de incubación (factor de virulencia), significativamente más alto en comparación a cepas obtenidas en otros países <sup>(9)</sup>.

El mecanismo de infección es a través de las conidias que se encuentran en el medio ambiente y la existencia de una persona susceptible. Los pacientes colonizados por AF de la sección Fumigati en las vías respiratorias, junto a comorbilidad por fibrosis quística o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, son una de las principales fuentes de diseminación de conidias al ambiente a través de la tos <sup>(6,10)</sup>.

La última actualización documentada del *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) M38M51SED3E <sup>(11)</sup> ha estandarizado el punto de corte clínico de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM o MIC por sus siglas en inglés) de voriconazol para *Aspergillus fumigatus*. Esto permite dejar en desuso el reporte de puntos de corte epidemiológico para aquellos antifúngicos que no tenían un punto de corte clínico, lo cual brinda más información farmacológica para los médicos tratantes. Esto es de relevancia para un tamizaje oportuno y confiable para la detección de resistencia a azoles por mutaciones puntuales del gen *cyp51A* <sup>(12)</sup>.

El objetivo de este estudio es conocer la susceptibilidad de nuestros aislamientos clínicos a antifúngicos triazólicos. Los datos de frecuencia y prevalencia de resistencia a azoles en AFSS continúa siendo subnotificado y subestimado, por ello, es necesario el reporte de más estudios a partir de cepas clínicas y ambientales en Sudamérica <sup>(1,3,9)</sup>. Igualmente, es necesario implementar la vigilancia y reporte de datos de suscepti-

bilidad a los azoles, y la estandarización en laboratorio debido a la complejidad de las metodologías, preparación del inóculo de conidias para ensayos y la necesidad de personal experimentado <sup>(4)</sup>.

## MÉTODOS

### Diseño del estudio

Es un estudio descriptivo en el cual se evaluaron 20 cepas de la sección Micología del Instituto de Medicina Tropical Daniel A. Carrión (IMT/DAC), de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Se realizó la reactivación de cepas, la identificación fenotípica y sensibilidad entre julio y setiembre del 2021.

En el Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (LMDM), Cátedra de Parasitología y Micología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina se realizó la prueba de sensibilidad y la identificación molecular entre abril 2022 y abril 2023.

### Especímenes biológicos

Las cepas fueron aisladas de pacientes con diagnóstico de AI a partir de los siguientes especímenes biológicos: esputo seriado (n = 14), biopsia de tejido pulmonar (n = 3) y aspirado bronquial (n = 3); procedentes de 1 hospital de Lima (Hospital Nacional Dos de Mayo) y 1 del Callao (Hospital Nacional Daniel A. Carrión).

### Identificación fenotípica

La identificación fenotípica de *Aspergillus fumigatus sensu lato* se realizó según las técnicas descritas por Klich y Pitt (1988) <sup>(13)</sup>. Cada cepa se sembró por duplicado en Agar Czapeck, se incubaron a 25°C y 37°C durante siete días. Para la identificación macroscópica se utilizaron como parámetros: diámetro, color, aspecto y difusión de pigmento en el medio de cultivo. Para la identificación microscópica se ejecutaron microcultivos en agar harina de maíz con Tween 80 en los cuales se aplicó azul de lactofenol para la observación, y los parámetros que se evaluaron fueron disposición de las métulas o fiáldes sobre la vesícula, forma y diámetro de la vesícula, forma y color de conidias.

## Identificación molecular

En el Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (LMDM) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), se realizó la identificación molecular de AFST de las 20 cepas mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) screening para *Aspergillus fumigatus sensu stricto* basada en secuencias del gen CYP51A. Para la extracción de ADN fúngico, los conidios de cada cepa se inocularon en caldo GYEP (glucosa 2 %, extracto de levadura 0,3 % y peptona 1 %) por 24 horas y la extracción de ADN se realizó mediante un método basado en purificación fenólica de ADN según el método publicado de Mellado y cols.<sup>(14)</sup>

La PCR screening se basó en la detección de diferencias entre las secuencias de nucleótidos específicas del gen CYP51A de *A. fumigatus sensu stricto* (número de acceso en GenBank AF338659.1) y de los mismos genes de otras 12 especies crípticas de la sección Fumigati (ej. *A. felis*, *A. fischeri*, *A. lentulus*, *A. novofumigatus*, *A. udagawae* y *A. viridinutans*). Estas diferencias se evidenciaron *in silico* mediante alineamiento CLUSTAL. La amplificación del gen CYP51A de *A. fumigatus sensu stricto* fue realizada usando el set de primers A3, F (5'-TAGTCCATTGACGACCC-3') y A10, R (5'-GGACATCTCTGCGCAAT-3'). La amplificación de la PCR se realizó en un volumen de 25 µl siguiendo las instrucciones del fabricante de la ADN polimerasa Pegasus (PBL, Buenos Aires, Argentina) en un termociclador de Applied Biosystems (TecnoLab-AB, Buenos Aires, Argentina). El termociclador fue programado para un ciclo inicial a 95° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos: desnaturalización a 95° C, hibridación a 56° C y extensión a 72° C, y un ciclo final a 72° C por 10 minutos. Las bandas de PCR se observaron en gel de agarosa al 0,8%.

## Estudio de susceptibilidad antifúngica

La prueba de sensibilidad *in vitro* realizada en el IMT/DAC fue microdilución en caldo para hongos filamentosos según CLSI M57SED4E. Se utilizó el antimicótico Itraconazol (ITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). Se utilizó la cepa AF ATCC 204305 con el siguiente perfil de susceptibilidad en rangos para el antimicótico: ITR (0,12 – 1 mg/L).

En el LMDM, UNL se realizó el ensayo de sensibilidad por microdilución en caldo para 7 antifúngicos sobre estas 20 cepas de AF. Se siguió el protocolo del documento M38ED3 (2017) y los resultados fueron interpretados según CLSI M38M51SED3E (puntos de corte clínicos para voriconazol) y M57SED4E (puntos de corte epidemiológicos para anfotericina B, caspofungina, anidafungina, isavuconazol, itraconazol y posaconazol). Se evaluaron los siguientes antifúngicos anfotericina B (AMB), anidafungina (ANF), caspofungina (CSF), isavuconazol (ISA), itraconazol (ITC), posaconazol (POS) y voriconazol (VOR). Los antifúngicos fueron obtenidos como liofilizados estándar de Sigma-Aldrich-Merck Argentina o de su fabricante (ISA, Knight Argentina).

## Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos, mediante frecuencias absolutas, los resultados de la sensibilidad de ITC realizado en el IMT fueron comparados con el realizado en el LMDM.

## RESULTADOS

Las 20 cepas sembradas a 25°C desarrollaron colonias de entre 35 a 70 mm de diámetro, de color verde azulado, sin difusión de pigmento en el agar; a 37°C desarrollaron colonias de entre 50 y 80 mm de diámetro de color blanco y algunos casos con aspecto algodonoso. La forma microscópica presentó cabezas aspergilaes uniseriadas, vesículas piriformes con fiálides ocupando dos tercios de las vesículas, con conidios globosos y superficie lisa, tanto a 25°C como a 37°C.

A las 20 cepas se les realizó identificación molecular dando como resultado que todas fueron identificadas como AFSS. Se observó una banda de PCR de 213 pb correspondiente a la amplificación de la región específica del CYP51A de *A. fumigatus sensu stricto* en todas las cepas.

En la tabla 1 se resume la identificación fenotípica, espécimen biológico del cual fue aislado la cepa clínica de AF y el resultado de amplificación molecular para la confirmación de AFSS.

Se realizó la distribución de los valores de MIC para cada antifúngico considerando frecuencias absolutas y rangos para percentiles 50 y 90 (Tablas 2 y 3). En la sensibilidad del ITC en el IMT se obtuvieron 2 cepas con MIC de 0,06 µg/mL, 17 cepas con 0,12 µg/mL, 2 cepas con 0,06 µg/mL y en la sensibilidad realizada en UNL se encontró 12 cepas con 1,0 µg/mL, 7 cepas con 0,5 µg/mL y 1 cepa con 0,25 µg/mL (Tabla 1). Según la distribución de percentiles se obtuvo un MIC 50 de 0,12 µg/mL en el IMT y en UNL un MIC 50 de 0,50 µg/mL. Mientras que el MIC 90 fue 0,5 µg/mL en el IMT y 1,0 en UNL µg/mL (Tabla 2). El punto de corte evaluado fue el epidemiológico con valor menor igual a 1 µg/ml. Se presenta la distribución de las MIC para las 20 cepas tanto la sensibilidad realizada en el IMT y en UNL.

Así mismo, en la tabla 4 se exponen los datos de los MIC comparativos de ITC entre resultados obtenidos en IMT/DAC y UNL, donde observamos que los datos del IMT/DAC se encuentran 1 o 2 diluciones por debajo a los obtenidos por la UNL.

Ninguna de las cepas presentó MIC por encima de los puntos de corte clínicos (existen solo para voriconazol), ni por encima de los puntos de corte epidemiológicos (ITC, ISA, AMB y CSF). El POS fue la droga más potente frente a la colección de cepas evaluadas (media geométrica (GM) de MIC de 0,042 µg/mL), seguido por ANF y VRC (GM de 0,071 y 0,297 µg/mL, respectivamente). Los rangos de MIC fueron estrechos. Ningún antifúngico presentó rangos de más de 4 o 5 diluciones con la excepción de ISA que presentó todas las MIC entre 0,5 y 1 µg/mL (Tabla 5).

## DISCUSIÓN

De las 20 cepas clínicas de AF obtenidas de especímenes biológicos de fuente del tracto respiratorio de pacientes con AI, se realizó la identificación molecular como AFSS en todas. La técnica de PCR screening permite la discriminación de *A. fumigatus sensu stricto* de las principales especies crípticas de la sección Fumigati aisladas de aspergilosis invasivas. En la evaluación de los azoles, la realizamos con el VOR que es el único antimicótico que en estos

**Tabla 1.** Caracterización microbiológica, susceptibilidad y molecular de las cepas de *Aspergillus fumigatus sensu stricto* aisladas en Perú.

Identificador IMT	Muestra	MIC (ug/mL) Itraconazol Perú	MIC (ug/mL) Itraconazol Argentina	Amplificación por qPCR
8	Biopsia tejido pulmonar	0,12	0,5	Positivo
12	Espuito seriado	0,12	0,5	Positivo
19	Espuito seriado	0,12	1,0	Positivo
23	Aspirado Bronquial	0,12	1,0	Positivo
33	Espuito seriado	0,12	1,0	Positivo
39	Espuito seriado	0,06	1,0	Positivo
43	Espuito seriado	0,12	1,0	Positivo
67	Espuito seriado	0,12	1,0	Positivo
75	Espuito seriado	0,12	1,0	Positivo
83	Espuito seriado	0,12	1,0	Positivo
85	Aspirado Bronquial	0,5	1,0	Positivo
100	Espuito seriado	0,12	1,0	Positivo
126	Espuito seriado	0,12	0,5	Positivo
128	Espuito seriado	0,12	0,5	Positivo
135	Espuito seriado	0,12	1,0	Positivo
270	Espuito seriado	0,12	0,5	Positivo
303	Biopsia tejido pulmonar	0,12	1,0	Positivo
304	Biopsia tejido pulmonar	0,12	0,25	Positivo
642	Espuito seriado	0,12	0,5	Positivo
5229	Aspirado Bronquial	0,06	0,5	Positivo

En Perú, en el Instituto de Medicina Tropical (IMT) se realizaron los estudios de identificación fenotípica y susceptibilidad a itraconazol. En Argentina, en el Laboratorio de Micrología y Diagnóstico Molecular (LMDM) se realizaron las pruebas de identificación molecular y susceptibilidad a itraconazol. MIC: Mínima Concentración Inhibitoria

momentos tiene un punto de corte clínico para inferir si hay resistencia clínica o no. En las 20 cepas evaluadas no se encontraron niveles de resistencia, por lo que afirmamos no tienen fenotipo de resistencia y no ameritó realizar en un estudio posterior la detección del gen *cyp51A*. Para ITC, POS e ISA se evaluaron con los puntos de corte epidemiológicos y también confirmamos que los MIC obtenidos son menores a estos puntos y serían consideradas a tipo salvaje (*wild type*).

Actualmente un estudio en Perú evaluó el perfil de susceptibilidad a azoles en cepas clínicas y ambientales de AF. En el estudio

de Bustamante y colaboradores (2020) recolectaron 143 cepas de AFSS en dos hospitales de nivel III durante 1 año, de las cuales el 81% provenían de especímenes respiratorios, 50% de pacientes con antecedente clínico de tuberculosis y 22% expuestos a azoles previamente. En este estudio 3 cepas (2,1%) procedentes de muestras respiratorias no definidas fueron catalogadas como no susceptibles para itraconazol por mutaciones del *cyp51A*, muy por debajo de lo obtenido en España con 38,1% por este mecanismo<sup>(14,15)</sup>. En Argentina a partir de 50 cepas de AF (78% fueron AFSS) obtenidas de pacientes con fibrosis quística se detectó que el 90% eran portadores, 50% eran pa-

cientes pediátricos, y una relación entre AF y ABPA en 12 casos. Como desenlace se evidenció 1 muerte por falla respiratoria asociado a APC<sup>(10)</sup>. En Brasil, se detectó 1,8% de AF resistentes a VOR<sup>(16)</sup>. En Martinica (mar Caribe) se reportó 8,9% de AF clínicos resistentes a azoles con altos MIC<sup>(17)</sup>.

En cuanto a cepas obtenidas por muestreo de suelos, a nivel sudamericano la resistencia de AF a azoles se encuentra entre 7 a 10%, incluyendo 106 cepas de origen peruano (Lima) de las cuales AF cuenta con 57,7% de aislamiento y 6 de ellas por encima del punto de corte epidemiológico (PCE) a azoles (ITR >16 ug/mL, VOR >2 ug/mL, POS 1 ug/mL)

**Tabla 2.** Valores de mínima concentración inhibitoria para las 20 cepas invasivas de *Aspergillus fumigatus*

Droga Antimicótica	Rango MIC	Rango MIC 50	Rango MIC 90
	(ug/mL)	(ug/mL)	(ug/mL)
Itraconazol IMT	0,12 – 1,0	0,12	0,5
Itraconazol UNL	0,12 – 1,0	1,0	1,0

IMT: Instituto de Medicina Tropical (Perú), UNL: Universidad Nacional del Litoral

IMT: Instituto de Medicina Tropical (Perú), UNL: Universidad Nacional del Litoral

**Tabla 3.** Número de aislamientos por mínima concentración inhibitoria para las 20 cepas de *Aspergillus fumigatus*.

Azoles	Número de aislamiento por MIC (ug/mL)					
	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1
Itraconazol IMT	0	2	17	0	1	0
Itraconazol UNL	0	0	0	1	7	12

IMT: Instituto de Medicina Tropical (Perú), UNL: Universidad Nacional del Litoral

detectando mutación del gen *cyp51A*<sup>(18)</sup>. Filogenéticamente, las cepas peruanas de AF se asignaron al mismo clado de las cepas clínicas de Francia, suponiendo una diseminación muy rápida y entre fronteras; aunque otro estudio la incluye en el clado I, junto a cepas mexicanas<sup>(9,19)</sup>.

El estudio más extensivo en el uso de estas cepas se realizó en España quienes a partir de un estudio nacional se detectó —a partir de 828 cepas de AFSS en 98% de lavados bronquiales— resistencia a más de 1 azoles en 5,5% y 95% de resistencia en especies crípticas de la sección *Fumigati*<sup>(15)</sup>. En sentido contrario, el contexto clínico puede elegir análisis más oportunos como la detección de galactomanano en suero >1,04 como factor pronóstico de mortalidad (OR=37,9) utilizado en una UCI de India debido a su alta mortalidad de 29,7% en 14 días, y 17,6% de resistencia a azoles en AF<sup>(20)</sup>.

El estudio de cepas ambientales de AF es un segundo asunto gravitante a la aparición de cepas clínicas resistentes a azoles. En un estudio de muestreo de ambientes hospitalarios se encontró un caso de asociación entre el cultivo de AF detectado en el baño de un paciente con EPOC a partir de esputo. Tanto la cepa clínica como la ambiental coinciden en identificación molecular y perfil de resistencia a ITR >8 ug/mL, VOR de 4 ug/mL, y POS de 0,5 ug/mL<sup>(21)</sup>. Es así como las conidias podrían ser vehículos de genes de resistencia hacia los humanos coloni-

zados, especialmente cuando las cepas ambientales son sometidas a presión selectiva por fungicidas azólicos (inhibidores de demetilasa, imidazol).

También se detectan mutaciones del *cyp51A* (G228S específico para VOR) en cepas clínicas evaluadas prospectivamente<sup>(2,21,22)</sup>. Un estudio ha evaluado cepas ambientales de nuestro medio<sup>(20)</sup>, donde a partir de 61 cepas de AF (57,5% de hongos ambientales) se encontró resistencia a los azoles en 6 cepas y además se detectó la mutación del gen *cyp51A* en 9,8% de las cepas. Existe evidencia de la presencia de cepas ambientales con la mutación de resistencia a los azoles, por lo que debe implementarse la vigilancia de infecciones y resistencia por parte del Ministerio de Salud del Perú, ya que, haciendo monitoreo nos podrá garantizar si hay tendencia al aumento de MIC a itraconazol en cepas clínicas de AF y poder tomar las medidas de salud pública necesarias para su control.

Entre las principales limitaciones, respecto a otros estudios, mencionamos la heteroresistencia intra-colonias o interespecie de un cultivo de AF y el protocolo estándar que se utiliza que es un cultivo monospórico<sup>(6,9,15,16)</sup>. Por otro lado, es asunto pendiente realizar ensayos de identificación molecular y susceptibilidad a azoles en más de una colonia de la misma placa de cultivo, así como recolectar un número mayor de cepas clínicas. Nues-

tro estudio evaluó un escaso número de cepas en comparación a otros estudios; por ello, es importante que existan más reportes de este tema de investigación en nuestro país para que los tomadores de decisiones en salud pública visibilicen brotes latentes en áreas críticas de atención. Por ejemplo, en Martinica se legisló la disminución de azoles como fungicidas en campos de cultivo, y a ello atribuyen su baja prevalencia de resistencia a azoles 2% en cepas ambientales de AF<sup>(18)</sup>.

Específicamente se recomienda estudiar, dentro de los aislamientos con MIC superior al PCE, cepas con valores de MIC superiores al MIC 50 de los antifúngicos para generar evidencia en el establecimiento de puntos de corte clínicos según CLSI<sup>(11,19)</sup>. Finalmente, las mutaciones puntuales de *cyp51A* no es el único mecanismo de resistencia a azoles en AF y amerita que los laboratorios implementen y estandaricen procedimientos para su detección oportuna a futuro en la región sudamericana<sup>(16)</sup>.

La AI no es una enfermedad de notificación obligatoria ante entidades nacionales de salud pública, por lo que no se conoce la cantidad de pacientes afectados. Del mismo modo, existe carencia de laboratorios gubernamentales con la capacidad instalada para obtener un diagnóstico clínico y de laboratorio oportuno y confiable<sup>(12,20)</sup>. La estandarización de los procedimientos y técnicas de laboratorio

**Tabla 4.** Determinación del porcentaje de acuerdo esencial y acuerdo categórico, para la distribución de MIC de itraconazol en las cepas clínicas de AF (n=20) evaluadas en IMT Perú y en UNL Argentina.

	Porcentaje de acuerdo esencial		Porcentaje de acuerdo categórico	
	±2 diluciones	±1 dilución	Acuerdo	Discrepancia
Itraconazol	30 (6) <sup>a</sup>	5 (1)	100 (20)	0 (0)

**Tabla 5.** Actividad de los antifúngicos evaluados frente a los 20 aislamientos de *Aspergillus fumigatus sensu stricto*.

Antifúngico	Número de cepas con CIM (ug/mL)												Rango (ug/mL)		
	>8	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	<0,015	GM (ug/mL) *	Min	Max
AMB <sup>a</sup>	0	0	0	0	17	2	1	0	0	0	0	0	0,871	0,25	1
ANF <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	9	8	2	1	0	0,071	0,015	0,12
CSF <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	13	5	1	1	0	0	0	0,377	0,06	0,5
ISA <sup>a</sup>	0	0	0	0	13	7	0	0	0	0	0	0	0,785	0,5	1
ITC <sup>a</sup>	0	0	0	0	7	12	1	0	0	0	0	0	0,616	0,25	1
PSC <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	2	8	9	0	1	0,042	<0,015	0,12
VRC <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	6	13	1	0	0	0	0	0,297	0,12	0,5

CIM<sub>50</sub>: En negrita. CIM<sub>90</sub>: Subrayado.

\*GM: media geométrica. Las CIM fuera de escala fueron pasadas a la siguiente concentración por encima o por debajo para calcular la GM.

<sup>a</sup>Se consideraron los puntos de corte epidemiológicos publicados en el documento M57SED4E de CLSI.

<sup>b</sup>No hay puntos de corte clínicos ni epidemiológicos.

<sup>c</sup>Se consideró el punto de corte clínico para VRC ( $\leq 0,5$  ug/mL es sensible,  $=1$  ug/mL es intermedio,  $\geq 2$  ug/mL resistente) publicado en el documento M38M51SED3E de CLSI.

AMB: anfotericina B. ANF: anidulafungina. CSF: caspofungina. ISA: isavuconazol. ITC: itraconazol. PSC: posaconazol. VRC: voriconazol.

puede ser otro punto de inflexión debido a que se debe tener personal calificado y entrenado. El reto es implementar procesos de identificación molecular de rutina, y las pruebas de sensibilidad *in vitro*, que utilizan una técnica compleja que muy pocos laboratorios comerciales realizan <sup>(4,6)</sup>. Por último, los laboratorios de referencia del país optan por estudiar la presencia de los genes de resistencia en laboratorios fuera del Perú, por la dificultad intrínseca del método manual y la pendiente implementación de métodos automatizados; y la disponibilidad de recursos biotecnológicos.

Concluimos que las 20 cepas evaluadas de aspergilosis invasiva no presentaron resistencia a los antifúngicos itraconazol, voriconazol y posaconazol. No se indentificó al gen *cyp51A*. Nuestros hallazgos aportan a incrementar la escasa información sobre la etiología y sensibilidad a los antifúngicos de uso clínico de las aspergilosis invasiva en nuestro país.

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular, Cátedra de Parasitología y Micología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina, por el ensayo

de susceptibilidad a Itraconazol de las cepas clínicas de *Aspergillus fumigatus*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lestrade PPA, Meis JF, Melchers WJG, Verweij PE. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(7):799-806. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.11.027
- Etienne KA, Berkow EL, Gade L, Nunnally N, Lockhart SR, Beer K, et al. Genomic Diversity of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in the United States. *mBio.* 2021;12(4):e0180321. DOI: 10.1128/mBio.01803-21
- Gonçalves SS. Global Aspects of Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* with Focus on Latin American Countries. *J Fungi (Basel).* 2017;3(1):5. DOI: 10.3390/jof3010005
- Latgé JP, Chamilli G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.* 2019;33(1):e00140-18. DOI: 10.1128/CMR.00140-18
- Durieux MF, Melloul É, Jemel S, Roisin L, Dardé ML, Guillot J, et al. *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence.* 2021;12(1):818-34. DOI: 10.1080/21505594.2021.1893945
- Jeanvoine A, Rocchi S, Bellanger AP, Reboux G, Millon L. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: A global phenomenon originating in the environment? *Med Mal Infect.* 2020;50(5):389-95. DOI: 10.1016/j.medmal.2019.07.014
- Nywenig AV, Rybak JM, Rogers PD, Fortwendel JR. Mechanisms of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Environ Microbiol.* 2020;22(12):4934-52. DOI: 10.1111/1462-2920.15274
- Bertuzzi M, van Rhijn N, Krappmann S, Bowyer P, Bromley MJ, Bignell EM. On the lineage of *Aspergillus fumigatus* isolates in common laboratory use. *Med Mycol.* 2021;59(1):7-13. DOI: 10.1093/mmy/myaa075
- Frias-De León MG, Zavala-Ramírez M, Córdoba S, Zúñiga G, Duarte-Escalante E, Pérez-Torres A, et al. Phenotypic characteristics of isolates of *Aspergillus* section *Fumigati* from different geographic origins and their relationships with genotypic characteristics. *BMC Infect Dis.* 2011;11:116. DOI: 10.1186/1471-2334-11-116
- Devoto TB, Alava KSH, Pola SJ, Pereda R, Ruboglio E, Finquelievich JL, et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus* species and other moulds in respiratory samples from Argentinean patients with cystic fibrosis. *Medical Mycology.* 2020;58(7):867-73. DOI: 10.1093/mmy/myz133
- Clinical & Laboratory Standards Institute. M38M-51SEd3 | Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 3rd Edition [Internet]. 2022. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/new-products/documents/m38m51s/>
- Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3251-7. DOI: 10.1128/AAC.00686-11
- Klich M, Pitt J. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde. CSIRO Division of Food Processing; 1988. 116 p.
- Mellado E, Garcia-Effron G, Buitrago MJ, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Targeted gene disruption of the 14-alpha sterol demethylase (*cyp51A*) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2536-8. DOI: 10.1128/AAC.49.6.2536-2538.2005
- Bustamante B, Illescas LR, Posadas A, Campos PE. Azole resistance among clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* in Lima-Peru. *Med Mycol.* 2020;58(1):54-60. DOI: 10.1093/mmy/myz032
- Escribano P, Rodríguez-Sánchez B, Díaz-García J, Martín-Gómez MT, Ibáñez-Martínez E, Rodríguez-

- Mayo M, et al. Azole resistance survey on clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(8):1170.e1-1170.e7. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.09.042
17. Macedo D, Leonardelli F, Gamarra S, Garcia-Effron G. Emergence of Triazole Resistance in *Aspergillus* spp. in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep.* 2021;15(3):93-103. DOI: 10.1007/s12281-021-00418-6
18. Monpierre L, Desbois-Nogard N, Valsecchi I, Bajal M, Angebault C, Miossec C, et al. Azole Resistance in Clinical and Environmental *Aspergillus* Isolates from the French West Indies (Martinique). *J Fungi* (Basel). 2021;7(5):355. DOI: 10.3390/jof7050355
19. Resendiz Sharpe A, Lagrou K, Meis JF, Chowdhary A, Lockhart SR, Verweij PE, et al. Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2018;56(suppl\_1):83-92. DOI: 10.1093/mmy/myx144
20. Resendiz-Sharpe A, Dewaele K, Merckx R, Bustamante B, Vega-Gomez MC, Rolon M, et al. Triazole-Resistance in Environmental *Aspergillus fumigatus* in Latin American and African Countries. *J Fungi* (Basel). 2021;7(4):292. DOI: 10.3390/jof7040292
21. Dabas Y, Mohan A, Xess I. Prognostic Scores and Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis from an Indian Respiratory Medicine ICU (ICU Patients with IA Suspicion). *J Fungi* (Basel). 2021;7(11):991. DOI: 10.3390/jof7110991
22. Gonzalez-Jimenez I, Lucio J, Menéndez-Fraga MD, Mellado E, Peláez T. Hospital Environment as a Source of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains with TR34/L98H and G448S Cyp51A Mutations. *J Fungi* (Basel). 2021;7(1):22. DOI: 10.3390/jof7010022
23. Garcia-Rubio R, Gonzalez-Jimenez I, Lucio J, Mellado E. Characterization of *Aspergillus fumigatus* cross-resistance between clinical and DMI azole drugs. *Appl Environ Microbiol.* 2021;87(5):e02539-20, AEM.02539-20. DOI: 10.1128/AEM.02539-20