REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL"
GERENCIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN MICOLOGÍA MÉDICA

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO POR DENSITOMETRÍA PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA EN *Aspergillus* spp.

AUTORA: VERÓNICA APONTE
TUTOR: GIUSEPPE FERRARA

CARACAS, JUNIO 2010.

República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO POR DENSITOMETRÍA PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA EN *Aspergillus* spp.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA

AUTORA: VERÓNICA APONTE
TUTOR: GIUSEPPE FERRARA

CARACAS, JUNIO 2010

CONSTANCIA

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: **"Estandarización del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad antifúngica en *Aspergillus* spp.",** presentado por la ciudadana Verónica Aponte para optar al Grado de Especialista en Micología Médica, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser evaluado por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Caracas, a los diecisiete días del mes de Mayo de 2010.

_____

Giuseppe Ferrara

C.I. 10.547.117

República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO POR DENSITOMETRÍA PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA EN *Aspergillus* spp.

Autora: Verónica Aponte

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA

Junio, 2010

APROBADO:

_____ _____

Maribel Dolande **Manuel Moya**

_____

Giuseppe Ferrara

ACEPTADO:

_____

Gladys González

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme y guiarme en todo momento.

A mi tutor, Giuseppe Ferrara quien con sus conocimientos y experiencia me orientó durante el desarrollo de ésta investigación. Gracias por tu paciencia.

Al Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” como institución, a la Dra. Vera Reviakina y al resto del personal profesional y técnico que hicieron posible el desarrollo de ésta investigación.

Al Dr. Rafael Borges, por sus sabias recomendaciones.

A mi madre, por su y amor incondicional, y estar pendiente de mí, a pesar de la distancia.

A Luis Felipe Bravini, por tu apoyo y tu amor día a día.

A mis compañeras de postgrado Liset, Elizabeth, Cuza, Carmela y Francis, por compartir su amistad.

A mis compañeros de trabajo, la Lic. Anny Rondón, el Lic. Manuel Gonzalez, y la Sra Aime Cordero por su apoyo y colaboración.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Título, Autor, Tutor	i
Constancia de aprobación del tutor	ii
Aprobación por jurado	iii
Agradecimientos	iv
Índice General	v
Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	ix
Resumen	xi
Summary	xii
Introducción	1
Marco Teórico	4
Objetivos: General y Específicos	14
Metodología	15
Microorganismos	15
Métodos	15
1. Condiciones de crecimiento de *Aspergillus* spp.	15
2. Preparación del inóculo según el documento M38-A2	17
3. Preparación del inóculo según el documento E.DEF 9.1 del EUCAST	18
4. Estandarización del inóculo mediante densitometría	19

5. Contaje de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) de los inóculos preparados según los documentos E.DEF 9.1 y M38-A2 19

6. Recolección y análisis estadístico de los datos 20

Resultados 23

1. Comparación de densidades ópticas, unidades MacFarland y contajes de UFC/mL, de los inóculos preparados según el documento M38-A2 del CLSI 23

1.1 Comparación entre valores de densidades ópticas y unidades MacFarland 25

1.2 Comparación entre unidades MacFarland v contajes de UFC/mL 28

1.3 Comparación entre valores de densidades ópticas y contajes de UFC/mL 30

2. Comparación de contajes de conidias en cámara de Neubauer, unidades MacFarland y contajes de UFC/mL de los inóculos preparados según el documento EDEF 9.1. del EUCAST 33

2.1 Comparación entre contajes de conidias en cámara de Neubauer y unidades MacFarland 33

2.2 Comparación entre unidades MacFarland y contajes de UFC/mL 37

2.3 Comparación entre contajes de conidias en cámara de Neubauer y contajes de UFC/mL 37

Discusión 41

Conclusiones 48

Recomendaciones 49

Bibliografía 50

INDICE DE TABLAS

Páginas

Tabla 1. Diferencias entre los documentos M38- A2 CLSI y E.DEF. 9.1 en las pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos 11

Tabla 2. Estudios asociados a la estandarización del inóculo para las pruebas de susceptibilidad antifúngica en *Aspergillus* spp. 13

Tabla 3. Procedencia de las cepas y aislados clínicos de la muestra 16

Tabla 4. Rangos, intervalos de confianza y coeficientes de correlación de Pearson de densidades ópticas, unidades MacFarland y contajes de unidades formadoras de colonias por mL del inóculo preparado según el documento M38-A2 del CLSI 24

Tabla 5. Porcentajes de concordancia e intervalos de confianza entre las variables: densidad óptica, unidades MacFarland y contaje de UFC/mL de los inóculos preparados según el documento M38-A2 del CLSI 26

Tabla 6. Coeficientes de variación (%) de densidades ópticas, unidades MacFarland y contajes de UFC/mL de los inóculos preparados según el documento M38-A2 del CLSI 32

Tabla 7. Rangos, intervalos de confianza y coeficientes de correlación de Pearson de contajes de conidias en cámara de Neubauer, unidades MacFarland y contajes de UFC/mL del inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1 del EUCAST 34

Tabla 8. Porcentajes de concordancia e intervalos de confianza entre las variables, contaje de conidias en cámara de Neubauer, unidades MacFarland y contaje UFC/mL del inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1 del EUCAST. 36

Tabla 9. Coeficientes de variación (%) de contaje de conidias entre las variables: contaje de conidias en cámara de Neubauer, unidades MacFarland y contaje de UFC/mL del inóculo preparado por EUCAST. 40

ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

Gráfico1. Correlación de valores de densidades ópticas versus unidades MacFarland. (A) *Aspergillus* spp. (n:121)*;* (B) *A. niger* (n:27); (C) *A. terreus* (n:23); (D) *A. fumigatus* (n:21); (E*) A. flavus* (n:26); (F) *A. nidulans* (n:24). Inóculo preparado según documento M38-A2 del CLSI. 27

Gráfico 2. Correlación de unidades MacFarland versus contajes de UFC/mL. (A) *Aspergillus* spp. (n:121)*;* (B) *A .niger* (n:27); (C) *A. terreus* (n:23); (D) *A. fumigatus* (n:21); (E*) A. flavus* (n:26); (F) *A. nidulans* (n:24). Inóculo preparado según documento M38-A2 del CLSI. 29

Gráfico 3. Correlación de valores de densidades ópticas versus contajes de UFC/mL. (A) *Aspergillus* spp. (n:121)*;* (B) *A. niger* (n:27); (C) *A. terreus* (n:23); (D) *A. fumigatus* (n:21); (E*) A. flavus* (n:26); (F) *A. nidulans* (n:24). Inóculo preparado según documento M38-A2 del CLSI. 31

Gráfico 4. Correlación entre contajes de conidias en cámara de Neubauer y unidades MacFarland. (A) *Aspergillus* spp. (n:121)*;* (B) *A. niger* (n:28); (C) *A. terreus* (n:21); (D) *A. fumigatus* (n:23); (E*) A. flavus* (n:27); (F) *A. nidulans* (n:22). Inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1. 35

Gráfico 5. Correlación de unidades MacFarland versus contajes de UFC/mL. (A) *Aspergillus* spp. (n:121)*;* (B) *A.niger* (n:28); (C) *A. terreus* (n:21); (D) *A. fumigatus* (n:23); (E*) A. flavus* (n:27); (F) *A. nidulans* (n:22).). Inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1. 38

Gráfico 6. Correlación entre contajes de conidias en cámara de Neubauer y contajes de UFC/mL. (A) *Aspergillus* spp. (n:121)*;* (B) *A. niger* (n:28); (C) *A. terreus* (n:21); (D) *A. fumigatus* (n:23); (E*) A. flavus* (n:27); (F) *A. nidulans* (n:22). Inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1. 39

República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO POR DENSITOMETRÍA PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA EN *Aspergillus* spp.

Autora: Verónica Aponte

RESUMEN

En los últimos años, la enfermedad invasora causada por *Aspergillus* spp. ha constituido un problema creciente en pacientes inmunosuprimidos, debido a su elevada incidencia y mortalidad. La aparición de nuevas alternativas terapéuticas como el voriconazol y la caspofungina, aunada a la resistencia documentada de especies de *Aspergillus* a la anfotericina B e itraconazol, conllevan a la realización de pruebas de susceptibilidad antifúngica de aislados clínicos de *Aspergillus* spp. Actualmente existen dos documentos de referencia aprobados para las pruebas de susceptibilidad de *Aspergillus* spp., el M38-A2 y el E.DEF 9.1. Una de las variables que influye significativamente en éstas pruebas, es la preparación del inoculo; en tal sentido, los documentos mencionados presentan diferentes metodologías, el M38-A2 refiere que la preparación del inóculo se realice mediante el uso de espectrofotometría, mientras que E.DEF 9.1 indica que dicha preparación se realice mediante el contaje de conidias en una cámara de Neubauer. Por otra parte, algunos investigadores han obtenido resultados controversiales al evaluar y/o comparar la reproducibilidad de las metodologías de preparación del inóculo de ambos métodos de referencia En ésta investigación se estandarizó una metodología alternativa para la preparación del inóculo, la densitometría, que resultó ser un método adecuado, sencillo y rápido. Para la preparación de los inóculos y se establecio los siguientes rangos de unidades: MacFarland: de 0.4 a 0.6 para *A.flavus, y A. nidulans.* De 0.3 a 0.4 para *A.fumigatus,* y *A.terreus* y de 0.2 a 0.8 para *A.niger.*

Palabras claves: inóculo, *Aspergillus* spp., pruebas de susceptibilidad, M38-A2, E.DEF 9.1 y antifúngicos.

República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica

STANDARDIZATION OF INOCULUM BY DENSITOMETRY FOR ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING IN *Aspergillus* spp.

Autora: Verónica Aponte

SUMMARY

In recent years, invasive disease caused by *Aspergillus* spp. has become an increasing problem in immunosuppressed patients because of its high incidence and mortality. The emergence of new therapies such as voriconazole and caspofungin, coupled with documented resistance of *Aspergillus* species to amphotericin B and itraconazole, leading to the realization of antifungal susceptibility testing of clinical isolates of *Aspergillus* spp .Currently there are two reference documents approved for susceptibility testing of *Aspergillus* spp., the M38-A2 and E. DEF 9.1. One of the variables that significantly influence these tests, is the preparation of inoculum; in this way, the documents before mentioned show different methodologies, the M38-A2 refers to the preparation of the inoculum was performed by using spectrophotometry, while E. DEF 9.1 indicates that this preparation is executing by counting conidia in a Neubauer chamber. On the other hand, some researchers have obtained controversial results when evaluating and or compare the reproducibility of the methods of preparing the inoculum of the two methods of reference. For this study, it was standardized an alternative methodology for the preparation of inoculum, "densitometry", and this resulting an appropriate method, simple and fast. For preparation of inocula by densitometry was established the following ranges of units MacFarland: 0.4 to 0.6 for A.flavus, and A. nidulans. from 0.3 to 0.4 for *A.fumigatus*, and *A. terreus* and from 0.2 to 0.8 for *A.niger.*

Key words: inoculum, *Aspergillus* spp, susceptibility testing, M38-A2, E. DEF 9.1 and antifungals agents.

INTRODUCCIÓN

Aspergillus spp*.,* es un hongo filamentoso ubicuo, saprófito, que está presente en la tierra, el agua, las plantas y la materia orgánica en descomposición, y es el segundo agente causal más frecuente de enfermedad fúngica invasora nosocomial [1-3]. La enfermedad invasora causada por *Aspergillus* spp. se denomina aspergilosis invasora y en los últimos años su frecuencia ha aumentado significativamente en pacientes inmunosuprimidos [4,5]. Éste incremento obedece a los avances en la práctica médica, los cuales han posibilitado la supervivencia de un número cada vez mayor de pacientes susceptibles a desarrollar una enfermedad por *Aspergillus* spp., tales como: pacientes con neutropenia prolongada, con enfermedades hematoncológicas, sometidos a trasplante de médula ósea u órganos sólidos, SIDA, entre otros [5,6].

Debido al incremento de la incidencia de la aspergilosis invasora y a su elevada tasa de mortalidad que oscila entre un 60% y 80%, es evidente que su diagnóstico y tratamiento es una de las necesidades no satisfechas de la medicina actual [7,8]. Afortunadamente la introducción reciente de voriconazol como tratamiento primario y de caspofungina como terapia de rescate, proporcionan nuevas opciones para el tratamiento de esta devastadora enfermedad [9-12].

De esta forma, el aumento de las opciones para tratamiento de la aspergilosis invasora, aunado a la resistencia documentada de algunas especies de *Aspergillus* a la anfotericina B y al itraconazol hacen que sea necesario realizar pruebas de susceptibilidad de aislados clínicos de *Aspergillus* spp. frente a los nuevos agentes antifúngicos y a los ya establecidos [11, 13-16].

Actualmente existen dos documentos de referencia para la realización de pruebas de susceptibilidad a antifúngicos en hongos filamentosos: el M38-A2 [17], elaborado por El Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI) y el documento E.DEF 9.1 [18] del Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Una de los aspectos más importantes en las pruebas de susceptibilidad es la preparación del inóculo [19-21], en tal sentido los documentos de referencia existentes presentan una diferencia metodológica. El documento M 38-A2 [17], refiere que la preparación del inóculo se realice mediante el uso de espectrofotometría, mientras que el documento E.DEF 9.1 [18] recomienda la preparación del inóculo mediante el contaje de conidias en cámara de Neubauer.

La diferencia en la metodología de la preparación del inóculo entre los métodos de referencia ha sido objeto de estudio para muchos investigadores,

quienes exponen resultados controversiales al evaluar y/o comparar la reproducibilidad de ambos métodos [19-24].

Por otra parte, una investigación previa refiere el uso de la densitometría como una posible metodología para la preparación del inóculo de las pruebas de susceptibilidad antifúngica, siendo descrita como una técnica reproducible, práctica y rápida [25].

Por todo lo antes expuesto, se realizó ésta investigación con el fin de estandarizar una metodología alternativa para la preparación del inóculo en las pruebas de susceptibilidad antifúngica de *Aspergillus* spp., mediante el uso de la densitometría, en la búsqueda de una técnica sencilla, reproducible y factible de implementar en un laboratorio clínico de micología.

MARCO TEÓRICO

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729, por Micheli, en su trabajo *Nova Geneva Plantarum*. Michelli denominó *Aspergillus* al hongo, debido a que la cabeza conidial de éste le recordaba a un "aspergillum", (instrumento en forma de bola perforado, utilizado para dispersar agua bendita). Dos siglos después, Thom and Church fueron los primeros en clasificar el género, aceptando 69 especies de *Aspergillus* en 11 grupos [1]. Actualmente, el género *Aspergillus* incluye más de 175 especies, pertenecientes a la clase de los *Euascomycetes*, orden *Eurotiales*, familia *Trichocomaceae* [26]. Las especies que causan con más frecuencia enfermedades en el hombre son: *Aspergillus fumigatus* (responsable de aproximadamente el 90% de los casos de enfermedad invasora), *Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus terreus y Aspergillus nidulans* [10,27,28]; aunque puntualmente se han descrito casos atribuidos a otras especies como: *A. versicolor A. amstelodami, A. avenaceus, A. caesiellus, A. candidus, A. carneus, A. chevalieri, A. clavatus, A. glaucus, A. granulosus, A. oryzae, A. quadrilineatus, A. restrictus, A. sydowi, A. ustus, A. wentii* [29].

Aspergillus spp., es un hongo filamentoso ubicuo, saprófito, que está presente en la tierra, el agua, las plantas y la materia orgánica en descomposición [1,29]. Éste hongo tiene una alta capacidad de esporulación y como consecuencia, genera grandes concentraciones de conidias en el aire, aproximadamente de 0.2 a 15 conidia/m^3 [30]. Aunque los humanos

inhalan las conidias de *Aspergillus* spp. continuamente, en la mayoría de los individuos sanos, éstas son removidas a través de mecanismos de la inmunidad innata y raramente producen enfermedad [30,31], pero en pacientes inmunocomprometidos, la enfermedad suele ser invasora, diseminada y con una alta mortalidad [7,32-34]. De manera que el tipo de reacción del huésped, los hallazgos patológicos asociados y la evolución de la enfermedad dependen más de los factores del huésped, que de la capacidad patógena de las especies de *Aspergillus* [31].

Las enfermedades causadas por el género *Aspergillus* comprenden una amplia variedad de entidades clínicas denominadas aspergilosis. La aspergilosis causa afecciones que se definen clásicamente como invasoras, crónicas y alérgicas. Entre las enfermedades invasoras causadas por el género *Aspergillus* se encuentran las infecciones de las vías respiratorias bajas, senos paranasales y piel como sitios de acceso. Por diseminación hematógena o extensión directa de los focos de infección contiguos pueden resultar comprometidos: el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y otros tejidos. El compromiso crónico incluye la otomicosis por *Aspergillus* y el aspergiloma pulmonar. Las afecciones alérgicas abarcan la sinusitis alérgica por *Aspergillus* spp. y la aspergilosis broncopulmonar alérgica [12].

Las aspergilosis crónicas y alérgicas son causas de morbilidad, pero rara vez son potencialmente mortales [12], en contraste, la aspergilosis

invasora constituye la segunda causa de enfermedad fúngica nosocomial, con una incidencia de aproximadamente 5 por 100.000 en la población hospitalaria de Estados Unidos [10]. Los pacientes con mayor riesgo de desarrollar aspergilosis invasora incluyen aquellos con neutropenia prolongada, receptores de trasplantes de medula ósea, pacientes bajo tratamiento de corticosteroides, en estadíos avanzados de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), con enfermedades hematológicas malignas o granulomatosas crónicas, los enfermos críticos cuando presentan enfermedad pulmonar obstructiva crónica [35-37].

En los últimos años ha habido un aumento sustancial de los casos de aspergilosis invasora, especialmente en centros especializados donde predominan los pacientes de riesgo [34,36]; en tal sentido, un estudio multicentrico prospectivo realizado en 19 centros de trasplante en EE.UU durante 2001-2002, refleja la alta incidencia de Aspergilosis en receptores de trasplante alogénicos de células hematopoyéticas, la cual osciló entre un 3,2% y un 3,9% de acuerdo al grado de compatibilidad entre receptor-donante. En los receptores trasplante autólogo la incidencia fue de 0,5%. En el caso de los trasplantes de órgano sólido, la incidencia varió de acuerdo al tipo de órgano trasplantado, siendo de 2,4% después de trasplante de pulmón, 0,8%, 0,3% y 0,1% posterior a trasplante de corazón, hígado y riñón respectivamente [34].

En cuanto a la incidencia de aspergilosis en Venezuela, los estudios son sumamente escasos y no están referidos a la enfermedad en su forma invasora. Únicamente se encuentra publicada una investigación del Departamento de Micología del Instituto de Higiene “Rafael Rangel”, donde utilizando la técnica de inmunodifusion doble, fueron evaluadas cinco micosis sistémicas, entre ellas aspergilosis, en 2791 pacientes durante el periodo 2002-2003, resultando 58 (5,7%) casos positivos para todas las micosis, de los cuales 1,9% correspondían a aspergilosis, [38].

En relación a la tasa de mortalidad atribuible a la aspergilosis invasora, ésta ha sido estimada entre 60 y 95%, reportándose los valores más altos en pacientes receptores de trasplantes de médula ósea alogénico, y anemia aplásica [32,34].

Debido al incremento de la incidencia mundial de la aspergilosis invasora y a su elevada mortalidad es evidente que su diagnóstico y tratamiento continua siendo un reto para medicina. La anfotericina B ha sido considerada, desde su aprobación en 1958 hasta prácticamente nuestros días, como el tratamiento de elección de la aspergilosis invasora, hasta que Herbrecht *et al.* reportó que el voriconazol era un fármaco más eficiente en los casos de aspergilosis invasora, convirtiéndose en la terapia de primera línea [39,40]. Otros antifúngicos con actividad contra *Aspergillus* spp*.,* incluyen formulaciones lipídicas de anfotericina B, el itraconazol, la

caspofungina y la micafungina los cuales se usan como terapia de rescate en la aspergilosis invasora [12].

Otro aspecto que ha despertado el interés de multiples investigadores es el aislamiento cada vez más frecuente de especies de *Aspergillus* diferentes a *A. fumigatus*. En un estudio que incluyó a un poco más de 5.500 pacientes receptores de medula ósea, reporto que desde 1996 hasta 1998, el 33,7% de los cultivos positivos procedentes de lavado broncoalveolar o de biopsia fueron debidos a especies de *Aspergillus* no *fumigatus* en contraste con el 18,3% recogido entre los años 1993 y 1995 [36]. Estos hallazgos han constituido una fuente de especial preocupación, ya que, en las especies aisladas de *Aspergillus* no *fumigatus* se encuentra *A. terreus*, un hongo que presenta altas tasas de resistencia a la anfotericina B [41]. Aunque las infecciones por este hongo continúan siendo infrecuentes, en algunos estudios realizados en Trasplante de médula ósea, *A. terreus* ha representado el 16% de las infecciones por hongos filamentosos [34].

Así mismo se han descrito aislamientos de *Aspergillus* spp. con concentraciones mínimas inhibitorias altas para Itraconazol [13,14].

De esta forma, el aumento de las opciones de tratamiento de la aspergilosis invasora, sumado a la resistencia documentada de algunas especies de *Aspergillus* a la anfotericina B y al itraconazol ha llevado a la necesidad de efectuar pruebas de susceptibilidad de aislados clínicos de

Aspergillus spp.*,* frente a los agentes antifúngicos nuevos y a los ya establecidos [16].

Existen diferentes métodos para la determinación de susceptibilidad antifúngica *in vitro* para *Aspergillus* spp.*,* tales como, macro y microdilución en caldo, y difusión en agar [42,43]. Actualmente se dispone de dos documentos de referencia para la realización de pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos: el M38-A2 [17], elaborado por El Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI) y el documento E.DEF 9.1 [18] del Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Tanto el documento M38-A2 [17] del CLSI como el E.DEF 9.1[18] del AFST-EUCAST utilizan el método de microdilución en caldo y miden Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), que se define como la concentración más baja de un antimicrobiano, capaz de reducir el crecimiento visible de un microorganismo, es este caso de los elementos hifales [17].

El documento M38-A2 adicionalmente incluye la determinación de la Concentración Efectiva Mínima (CEM) referida a la concentración más baja del agente antimicrobiano que produce cambios aberrantes en la morfología de las hifas (pequeñas, redondeadas y compactas), la CEM es empleada únicamente para probar las equinocandinas [17].

Aunque ambos estándares son similares, presentan diferencias en varios aspectos metodológico, como el tiempo de incubación, tamaño del inóculo, el fondo del pocillo de la placa, la adición glucosa y el método de preparación del inoculo [17,18], Ver Tabla 1, siendo éste último un paso de gran influencia en el resultado final [20].

En tal sentido, el documento M 38-A2 [17], refiere que la preparación del inóculo se realice mediante el uso de espectrofotometría, mientras que el documento E.DEF 9.1 [18] recomienda la preparación del inóculo mediante el contaje de conidias en cámara de Neubauer. Las dos metodologías que se incluyen hoy en los métodos de referencia vigentes, han sido cuestionadas en cuanto a reproducibilidad y confiabilidad desde hace más de 20 años, cuando se iniciaron los primeros intentos de estandarización del inóculo para pruebas de susceptibilidad en levaduras [19-24,44]. Ver tabla 2.

Muchos investigadores proponen la espectrofotometría como método ideal para la preparación del inoculo [19,22,]; sin embargo, existen variables como el color y el tamaño de las conidias que pueden afectar las lecturas de absorbancia, debiendo realizarse la estandarización con éste método según cada especie [19,21]. Esta metodología también requiere del uso de un equipo costoso y puede ser difícil de adquirir para algunos laboratorios de micología clínica.

Tabla 1. Diferencias entre los documentos M38- A2 CLSI y E. DEF. 9.1 en las pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos [17,18]

	Documentos	
Caracteristica	**CLSI M38-A2**	**EUCAST E.DEF 9.1**
Apropiado para	*Aspergillus* spp. *Fusarium* spp. *Rhizopus oryzae* *P. boydii* *S. schenckii* *Dermatofitos*	Hongos filamentosos formadores de conidias
Tamaño del inoculo	0.4-5x10^6 CFU/ml	2-5x10^6 CFU/ml
Método de preparación del inóculo	Epectrofotometria	Camara de Neubauer
Medio de cultivo	RPMI 1640	RPMI 1640 Glucosa 2%
Formato	Microdilución	Microdilución
Temperatura	35°C	35°C
Tiempo de incubación del hongo	4 días	2-5 días
Lectura del punto final	Inhibición de crecimiento	Inhibición de crecimiento
Tiempo de incubación de la prueba	48 h	48h

Otros estudios indican que el método óptimo para la preparación del inóculo, es mediante del contaje de conidias en cámara de Neubauer, ya que es, un método fácil de realizar y posee una medida universal, y que además es independiente del color y/o tamaño de las conidias [20,21,23,45].

Por otra parte, una investigación previa realizada por Araujo *et al.* [25] refiere el uso de la densitometría como posible metodología para la preparación del inóculo de las pruebas de susceptibilidad antifúngica, y ha sido descrita como un método reproducible, práctico y rápido que ajusta el número de conidias en un densitómetro denominado densimat, que expresa la densidad óptica en unidades MacFarland [25].

Debido a los hechos antes mencionado, se realizó una investigación cuyo objetivo fue estandarizar una metodología alternativa para la preparación del inóculo de pruebas de susceptibilidad antifúngica de *Aspergillus* spp., mediante el uso de densitometría, con el fin de desarrollar una técnica sencilla, reproducible y factible de implementar en un laboratorio clínico de micología.

Tabla 2. Estudios asociados a la estandarización del inóculo en las pruebas de susceptibilidad antifúngica en *Aspergillus* spp.

Autor	Año	Preparación del inóculo	Tipo de estudio	Resultados	Referencia
Espinel, I. et al.	1991	Espectrofotometría y UFC[a]	Comp[b] Uni[c]	Espectrofotometría es un método confiable.	[19]
Espinel, I. et al.	1995	Espectrofotometría y UFC[a]	Comp[b] Multi[d]	Espectrofotometría tiene altos porcentajes de concordancia intra e interlaboratorio.	[20]
Espinel, I. et al.	1997	Espectrofotometría y UFC[a]	Comp[b] Multi[d]	Espectrofotometría tiene altos porcentajes de concordancia intra e interlaboratorio	[21]
Petrikkou, E.al et.	2001	Espectrofotometría CN[e] y UFC[a]	Comp[b] Uni[c]	Ambos métodos pueden ser usados.	[22]
Aberkane, A.et al.	2002	Espectrofotometría, CN[e], y UFC[a]	Comp[b] Uni[c] .	Baja reproducibilidad por el método NCCLS el contaje en C.N[e] es más confiable.	[23]
Rodríguez J.et al.	2003	Espectrofotometría, CN[e] y UFC[a]	Comp[b] Multi[d]	Recomienda contaje en CN[e], ya que es independiente del tamaño y color de las conidias	[24]
M38-A2 CLSI	2008	CN[e] y UFC[a]		$1 – 2,5 \times 10^5$	[17]
E. DEF. 9.1 EUCAST	2008	CN[e] y UFC[a]		$0.4 – 5 \times 10^4$	[18]

[a]Unidades formadoras de colonia. [b]Comparativo. [c]Unicentrico. [d]Multicentrico. [e]Cámara de Neubauer.

OBJETIVOS

Objetivo general

1. Estandarizar el inoculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos en *Aspergillus* spp.

Objetivos específicos

1. Comparar y correlacionar los métodos: espectrofotométrico, contaje de conidias en cámara de Neubauer y densitometría para la determinación del inóculo para especies del género *Aspergillus.*

2. Evaluar sí existen diferencias en la preparación de los inóculos entre las especies de *A. flavus, A. fumigatus, A. niger, A.terreus y A. nidulans* por los métodos: espectrofotométrico, contaje de conidias en cámara de Neubauer y densitometría.

3. Comparar las unidades formadoras de colonias de los inóculos por los métodos: espectrofotométrico, contaje de conidias en cámara de Neubauer y densitometría para especies del género *Aspergillus.*

METODOLOGÍA

Se diseñó un estudio de tipo experimental, descriptivo y comparativo para evaluar el inóculo estandarizado por densitometría siguiendo la metodología de los documentos M38-A2 del CLSI y E.DEF9.1 de la EUCAST.

Microorganismos

- Para realizar éste estudio se seleccionó una muestra de 15 microorganismos de 5 especies de *Aspergillus:* 3 de *A. fumigatus, 3 de A. flavus,* 3 de *A. terreus, 3 de A. nidulans y 3 de A. niger.*
- De éstas 15 microorganismos, 13 son aislados clínicos y dos son cepas ATCC: *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 y *Aspergillus flavus* ATCC 204304. Ver procedencia en la tabla 3.

Métodos

Condiciones de crecimiento de *Aspergillus* spp.: el cultivo se realizó por duplicado en tubos de agar papa, los cuales se incubaron de 4 a 5 días a 35°C para permitir su esporulación, el tiempo de incubación empleado corresponde al periodo común especificado tanto en el documento M38-A2 del CLSI como en el documento E.DEF 9.1 del EUCAST.

Tabla 3. Procedencia de las cepas y aislados clínicos

N[a]	Especie	Procedencia	Centro o Instituto
1	*A. niger*	Exudado ótico	Centro Médico Loira
2	*A.terreus*	Exudado ótico	Centro Médico Loira
3	*A. flavus*	NE[b]	Instituto de Salud Carlos III de España
4	*A. nidulans*	Liquido Pleural	Instituto de Higiene Rafael Rangel
5	*A.niger*	Lavado Bronquial	Hospital Universitario de Caracas
6	*A.niger*	Lavado Bronquial	Hospital Universitario de Caracas
7	*A.fumigatus*	Esputo	Hospital Universitario de Caracas
8	*A.nidulans*	Biopsia de pleura	Instituto de Higiene Rafael Rangel
9	*A.terreus*	Exudado ótico	Instituto de Higiene Rafael Rangel
10	*A.fumigatus*	Ulcera corneal	Instituto de Higiene Rafael Rangel
11	*A.terreus*	NE[b]	Instituto de Higiene Rafael Rangel
12	*A.flavus*	Ulcera corneal	Instituto de Higiene Rafael Rangel
13	*A.flavus*	Lavado bronquial	Hospital Universitario de Caracas
14	*A.flavus*		ATCC 204304.
15	*A.fumigatus*		ATCC 204305

[a]Numero asignado
[b]No especifica

1. Preparación del inóculo según el documento M38-A2 del CLSI [17]:

2.1 Recolección de las conidias:

a. Para facilitar la obtención de conidias, se introdujo un asa de cultivo en Tween 20 puro y se realizó un raspado suave sobre la superficie de las colonias del hongo para desprender las conidias.
b. Ésta suspensión fue transferida a un tubo con 4 ml de solución salina 0,85% estéril y se agitó utilizando un vortex, luego fue dejada en reposo durante 5 minutos para permitir que sedimenten los fragmentos de hifas.
c. Transcurrido los 5 minutos se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril con una pipeta plástica y se agitó vigorosamente durante 15 segundos en un vortex.

2.2 Ajuste del inóculo:

a. Después de agitar, se procedió a preparar los inóculos ajustando las suspensiones de las conidias a lecturas de densidades ópticas entre 0,090 y 0,130 a 530 nm, como indica el documento M38-A2.
b. Las mediciones fueron realizadas en un espectrofotómetro (Spectronic® 20 Genesis™). El ajuste del inoculo se realizó por triplicado para cada aislado y cepa de *Aspergillus* spp.

3. Preparación del inóculo según el documento E.DEF 9.1 del EUCAST.[18]:

3.1 Recolección de las conidias:

a. Siguiendo el procedimiento especificado en el documento E.DEF 9.1 del EUCAST, se vertieron 5 ml de agua destilada suplementada con tween 20 al 0,1% sobre las colonias del hongo.
b. Luego el sobrenadante con las conidias fue transferido a un tubo estéril con una pipeta.
c. Se verificó la presencia de hifas en la suspensión por observación al microscopio, colocando una gota sobre una lámina portaobjeto. No se realizó filtrado de la suspensión ya que los fragmentos de hifas no alcanzaban el 5%.
d. Posteriormente se homogeneizó la suspensión durante 15 segundos utilizando un vortex a 2000 rpm.

3.2 Ajuste del inóculo:

a. El inóculo fue ajustado contando las conidias de las diferentes cepas de *Aspergillus* spp. en una cámara de Neubauer.
b. Para ajustar el inoculo a la concentración especificada en el documento E.DEF 9.1, que va de 2 a 5 $\times 10^6$ CFU/ml fue necesario realizar de dos a tres diluciones.

c. El ajuste del inoculo se realizó por triplicado para cada aislado y cepa de *Aspergillus* spp.

4. Estandarización del inóculo mediante densitometría

a. Una vez ajustadas las suspensiones de inóculos de *Aspergillus* spp. siguiendo las metodología de los documentos E.DEF 9.1 del EUCAST y M38-A2 del CLSI, se determinaron los valores de turbiedad en unidades MacFarland mediante el uso de un densitómetro (Densimat™ de bioMérieux) a 550nm.
b. Las lecturas en el Densimat se realizaron por triplicado, para cada inóculo preparado siguiendo las metodología de los documentos E.DEF 9.1 del EUCAST y M38-A2 del CLSI

5. Contaje de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) de los inóculos preparados según los documentos E.DEF 9.1 y M38-A2.

a. A cada suspensión de inóculo previamente homogeneizada durante 15 segundos en el vortex, se le realizaron dos diluciones seriadas.
b. La primera dilución fue de 1:20 y la segunda dilución de 1:200, obteniéndose una dilución final de 1:4000.
c. Posteriormente se sembraron por triplicado 10µl de los inóculos diluidos 1:4000 en placas de agar Sabouraud sin antibiótico

d. La siembra se realizó en 4 cuadrantes de la placa de Petri para garantizar el debido aislamiento de las colonias.
e. Se incubaron a 35º C por 48 horas y una vez crecidas, las colonias fueron contadas y su número fue multiplicado por el factor de dilución que es de 4000 y se llevo a unidades de mililitros realizando el cálculo correspondiente expresando el contaje en UFC/mL.
a. El contaje de UFC/mL se realizó por triplicado para cada inóculo preparado siguiendo las metodología de los documentos E.DEF 9.1 del EUCAST y M38-A2 del CLSI

6. Recolección y Análisis estadístico de los datos.

Una vez obtenidos los datos, éstos fueron ordenados en tablas y procesados en los programas SPSS 17.0. y Microsoft Excel 2010. Se realizaron cálculos de medidas de tendencia central como media y desviación estándar, rango e intervalo con un 95 % de confianza estadística (IC 95 %). También se calcularon los coeficientes de variación de cada variable [45,46].

Cuando los inóculos se preparon según la metodología del documento M38-A2 del CLSI, las variables estudiadas se comparon midiendo el grado de correlación a través del cálculo de coeficiente de Pearson y determinando el porcentaje de concordancia entre ellas [45,46].

Las variables comparadas fueron: lecturas de densidades ópticas versus el promedio de las lecturas en unidades MacFarland (DO vs McF), promedio de unidades MacFarland versus el promedio de unidades formadoras de colonia (McF vs UFC/mL) y lecturas de densidades ópticas versus el promedio de unidades formadoras de colonias (DO vs UFC/mL).

Cuando el inóculo se preparó siguiendo la metodología del documento E.DEF 9.1 del EUCAST, las variables correlacionadas fueron: contaje de conidias en cámara de Neubauer versus el promedio de unidades MacFarland (CN vs McF), promedio de unidades MacFarland versus el promedio de unidades formadoras de colonias (McF vs UFC/mL) y contaje de conidias en cámara de Neubauer versus promedio de unidades formadoras de colonias (CN vs UFC/mL). Igualmente estas variables se cotejaron midiendo el grado de correlación a través del cálculo de coeficiente de Pearson y determinando el porcentaje de concordancia entre ellas [45,46].

Para la interpretación de los resultados del coeficiente de Pearson se utilizo la siguiente escala númerica que indica la magnitud de la correlación:

Valor del coeficiente de Pearson (r)	Correlación
0,0 - 0,20	Mínima
0,21 – 0,40	Baja
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Buena
0,81 – 1,00	Muy Buena

El cálculo de los porcentajes de concordancia (%C) entre las variables, se calculó como la razón entre las frecuencias de los datos concordantes de cada variable por 100, usando tablas de contingencia de 2x2. Para el inóculo preparado según el documento M38-A2 del CLSI se estableció: % C entre DO vs McF, % C entre UFC vs McF y % C entre UFC vs DO, donde el estándar de UFC es de 0,4-5,0x10^6 UFC/mL y para el inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1 del EUCAST se estableció: % C entre CN vs McF, % C entre UFC vs McF y % C entre CN vs UFC, donde el estándar de UFC y CN es de 2,0-5,0x10^6 UFC/mL. Para las unidades McF se tomo el IC 95 % determinado para cada especie.

RESULTADOS

1. Comparación de densidades ópticas, unidades MacFarland y contajes de UFC/mL, de los inóculos preparados según el documento M38-A2 del CLSI:

Se prepararon 121 inóculos ajustados por espectrofotometría a lecturas de densidades ópticas entre 0.090 y 0.130 siguiendo la metodología del documento M38-A2. En la tabla 4 se muestra el número de inóculos preparados por especie, detallando el rango e intervalos de confianza de los valores de densidades ópticas (DO) y de los promedios tanto de las unidades MacFarland (McF) como de las unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL)

Podemos observar que las unidades McF de los inóculos previamente ajustados según el documento M38-A2 para todas las especies de *Aspergillus* oscilan entre 0.3 y 0.5 con un 95% de confianza estadística, mientras que por especie, los valores se ubican entre: 0.2 a 0.6, para *A. niger,* 0.3 a 0.4 para *A. fumigatus y A.terreus* y 0.4 a 0.6 para *A. flavus y A. nidulans.*

En cuanto al número de UFC/mL, se obtuvieron contajes que van desde 0.4 hasta 20.4 x10^6 para todas las especies de *Aspergillus. A. niger* mostró un rango de contajes de UFC/mL sustancialmente más amplio (0.6-20.4 x10^6) que el resto de las especies, mientras que *A. flavus* fue la

Tabla 4. Rangos, intervalos de confianza y coeficientes de correlación de Pearson de densidades ópticas, unidades MacFarland y contaje de unidades formadoras de colonias por mL del inoculo preparado según el documento M38-A2 del CLSI.

		D.O[b]. 530 nm		Unidades McF[c]		Contaje de UFC[d]				
Especies	N[a]	rango	IC 95 %	rango	IC 95 %	rango	IC 95 %	r [e]	r [f]	r [g]
A. niger	27	0,090-0,130	0,099-0,125	0,2-0,8	0,2-0,6	0,6-20,4	0,5-9,9	0.179	0.538	-0.138
A. terreus	23	0,090-0,128	0,100-0,122	0,3-0,4	0,3-0,4	2,5-10,8	2,8-6,8	0.541	0.464	0.317
A. fumigatus	21	0,100-0,130	0,105-0,123	0,3-0,4	0,3-0,4	2,4-9,3	2,8-7,0	0.521	-0.063	0.405
A. flavus	26	0,097-0,130	0,105-0,125	0,4-0,6	0,4-0,6	0,4-8,1	1,5-4,8	0.539	0.393	0.164
A. nidulans	24	0,094-0,129	0,103-0,123	0,3-0,6	0,4-0,6	0,8-10,6	1,4-7,2	0.136	-0.123	-0.515
Aspergillus spp.	121	0,090-0,130	0,102-0,124	0,2-0,8	0,3-0,5	0,4-20,4	1,1-7,5	0.242	0.141	-0.001

[a]Número de repeticiones
[b]Densidades ópticas
[c]MacFarland. 580 nm
[d]Unidades formadoras de colonia por mL. Valores $x10^6$.
[e]Coeficiente de correlación de Pearson entre DO vs McF.
[f]Coeficiente de correlación de Pearson entre McF vs UFC/mL.
[g] [e]Coeficiente de correlación de Pearson entre DO vs UFC/mL.

única especie cuyos valores de UFC/mL con un intervalo de confianza del 95% (1.5 – 4.8 $x10^6$) resultaron dentro del rango señalado por el documento M38-A2 del CLSI que va de 0.4 a 5 $x10^6$ UFC/mL.

La tabla 4 también resume los valores del coeficiente de correlación de Pearson obtenidos al comparar las variables: densidad óptica, unidades MacFarland y contaje de unidades formadoras de colonias por mL.

Los resultados obtenidos al relacionar las variables estudiadas serán mostrados de forma esquemática, a continuación:

1.1 Comparación entre valores de densidades ópticas y unidades MacFarland:

Al correlacionar los valores de densidades ópticas y unidades MacFarland para todas las especies de *Aspergillus* estudiadas, se observa que la correlación es baja, sin embargo, al detallar por especie, tres muestran una correlación moderada: *A. terreus, A. fumigatus y A. flavus,* (r: 0.541; 0.521 y 0.539 respectivamente). Para el caso de *A. niger y A. nidulans* la correlación fue mínima.

La dispersión de los datos, líneas de tendencias y ecuaciones de la recta correspondientes, se muestra en el Gráfico 1, para cada especie por separado y en conjunto.

En cuanto al grado de concordancia entre éstas variables resultó ser muy bueno, con un promedio de 82% para todas las especies de *Aspergillus* del estudio. *A. flavus* con un 100 % y *A. nidulans* con un 95.8 % fueron las especies con el mayor promedio de porcentajes de concordancia, seguidas por *A. niger, A. fumigatus* y *A. terreus,* con un 85.2, 81.0 y 78.3 % respectivamente.

Tabla 5. Porcentajes de concordancia e intervalos de confianza entre las variables: densidad óptica, unidades MacFarland y contaje de UFC/mL de los inóculos preparados según el documento M38-A2 del CLSI.

		DO - McF[b]		**McF - UFC[c]**		**UFC - DO[d]**	
Especies	N[a]	%C	IC 95 %	%C	IC 95 %	%C	IC 95 %
A. niger	27	85.2	67,5-94,1	63.0	44.2-78.5	66.7	47,8-81,4
A. terreus	23	78.3	58,1-90,3	56.5	36.8-74.4	69.6	49,1-84,4
A. fumigatus	21	81.0	60,0-92,3	57.1	36.6-75.5	66.7	45,4-82,8
A. flavus	26	100	87,1-100	92.3	75.9-97.9	92.3	75,7-97,9
A. nidulans	24	95.8	79,8-99,3	73.9	53.5-87.5	90.9	72,2-97,5
Aspergillus spp.	121	81.8	74,0-87,7	58.7	48.8-67.1	71.9	63,3-79,1

[a]Número de repeticiones
[b] Porcentajes de concordancia entre densidades ópticas (530 nm) y unidades MacFarland (550 nm).
[c]Porcentajes de concordancia entre unidades MacFarland (550 nm) y unidades formadoras de colonias por ml .Valores x 10^6.
[d]Porcentajes de concordancia entre densidades ópticas (530 nm) y unidades formadoras de colonias por mL.. Valores x10^6.

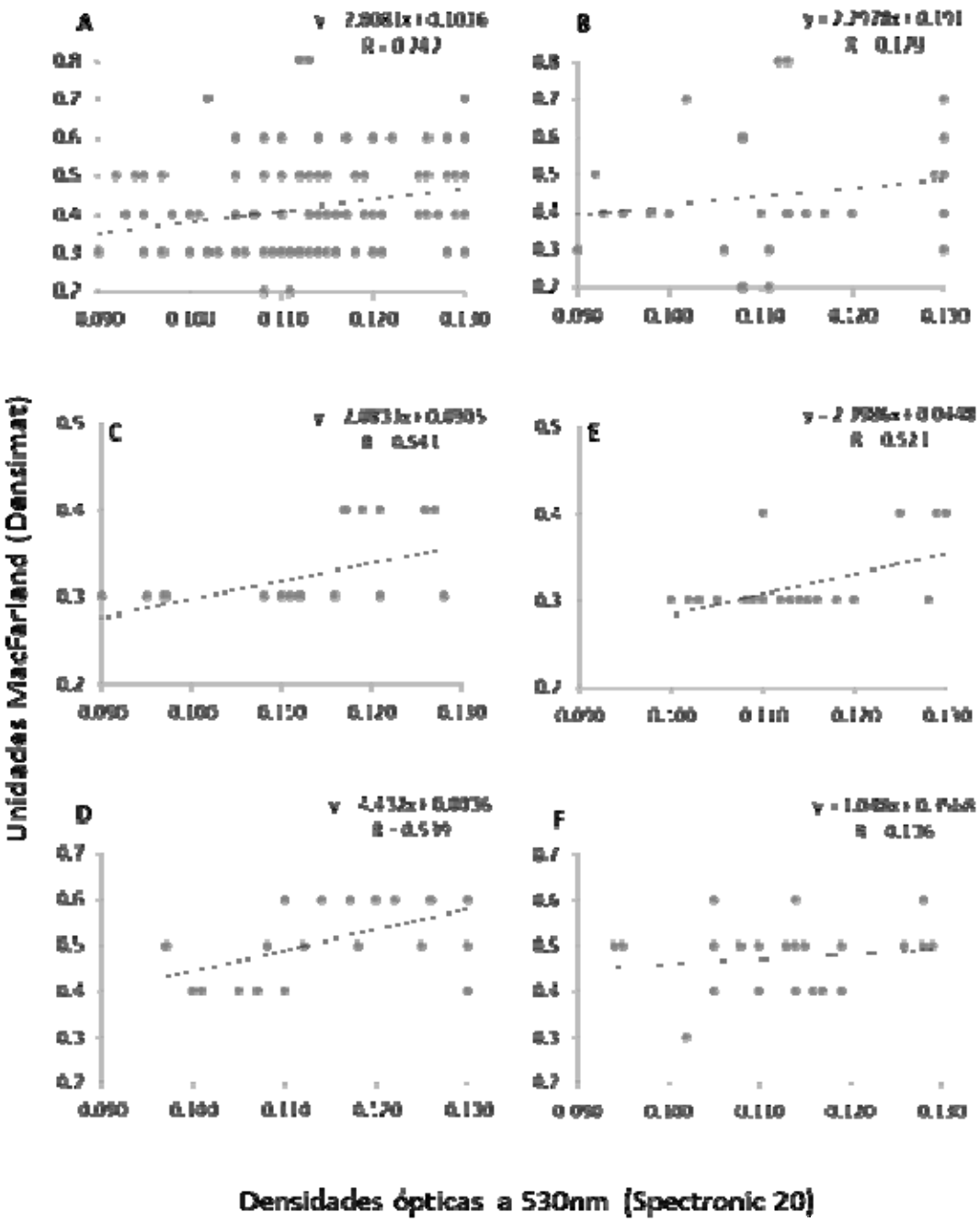

Gráfico 1. Correlación de valores de densidades ópticas versus unidades MacFarland. (A) *Aspergillus* spp. (n:121)*;* (B) *A. niger* (n:27); (C) *A. terreus* (n:23); (D) *A. fumigatus* (n:21); (E*) A. flavus* (n:26); (F) *A. nidulans* (n:24). Inóculo preparado según documento M38-A2 del CLSI.

1.2 Comparación entre unidades MacFarland y contajes de UFC/mL:

Al correlacionar las lecturas de unidades McF de los inóculos con los contajes de UFC/mL, se observó que la correlación para todas las especies ensayadas de *Aspergillus* es mínima (r = 0.141) y los valores entre especies difirieron notoriamente entre sí. *A. niger y A. terreus* mostraron una correlación moderada (r=0.538 y r=0.464 respectivamente), para *A. flavus* la correlación fue baja (r=0.393), mientras que para el resto de las especies analizadas no hubo correlación alguna. Ver tabla 4. Así mismo, en el gráfico 2 se puede apreciar la dispersión de los datos al correlacionar éstas variables, para las especies de *Aspergillus* analizadas tanto en conjunto como por separado.

El grado de concordancia entre las unidades MacFarland y contajes de unidades formadoras de colonias fue más bajo que el observado entre las densidades ópticas y unidades MacFarland para todas las especies ensayadas (58.87% versus 81.8 respectivamente). Sin embargo, hubo dos especies que mostraron buena correlación entre las variables unidades McF y contaje de UFC/mL: *A. flavus* con un 92.3% y *A. nidulans* con un 73.9%. De nuevo, éstas dos especies muestran los mayores porcentajes de concordancia entre las variables en estudio. Los porcentajes de concordancias para *A. terreus, A. fumigatus* y *A. niger* son bajos, con un 56.5, 57.1 y 63.0 % respectivamente. Ver tabla 5.

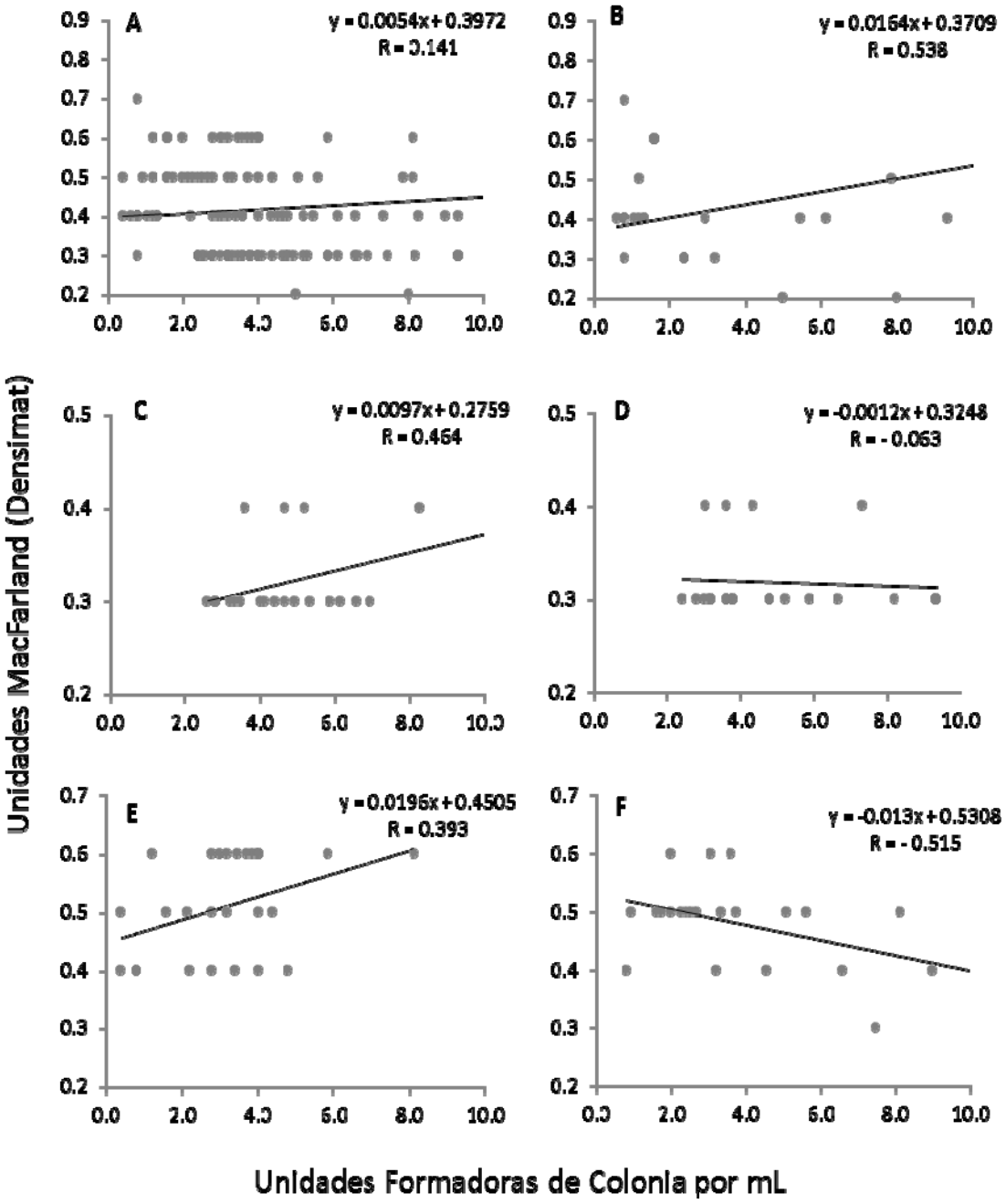

Gráfico 2. Correlación de unidades MacFarland versus contajes de UFC/mL. (A) *Aspergillus* spp. (n:121); (B) *A .niger* (n:27); (C) *A. terreus* (n:23); (D) *A. fumigatus* (n:21); (E) *A. flavus* (n:26); (F) *A. nidulans* (n:24). Inóculo preparado según documento M38-A2 del CLSI.

1.3 Comparación entre valores de densidades ópticas y contajes de UFC/mL:

En la tabla 4 se puede observar que la correlación entre las lecturas de densidades ópticas y contajes de UFC/mL es moderada para *A. fumigatus* (0.405) y baja para *A. terreus* (0.317), siendo mínima para *A. flavus* (0.164) y nula para el resto de las especies. La dispersión de éstos datos y líneas de tendencia resultantes se muestran en el gráfico 3. En relación al porcentaje de concordancia entre las densidades ópticas y contajes de UFC/mL, una vez más las especies con mayor concordancia son *A. flavus* con un 92.3% y *A. nidulans* con un 90.9%. La concordancia en general para todas las especies es de 71.9 %, considerándose como una concordancia aceptable. Ver tabla 5.

Además, se calcularon los coeficientes de variación para cada una de de las variables estudiadas cuando los inóculos fueron ajustados inicialmente según el documento M38-A2: valores de densidades ópticas, unidades MacFarland y contajes de UFC/mL, éstos datos se resumen en la tabla 6 para *Aspergillus* spp y para cada especie.

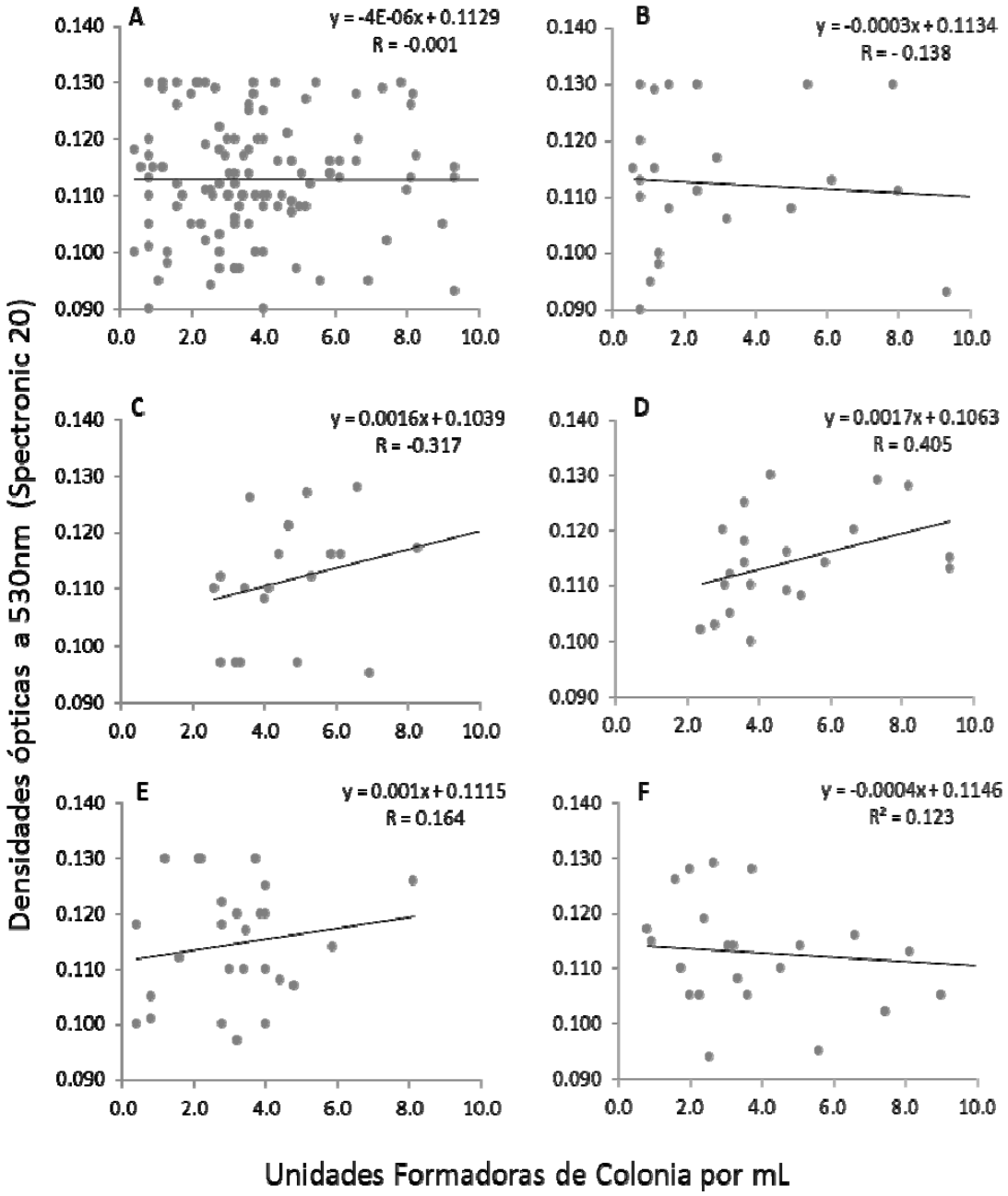

Gráfico 3. Correlación entre valores de densidades ópticas versus contajes de UFC/mlL. (A) *Aspergillus* spp. (n:121)*;* (B) *A. niger* (n:27); (C) *A. terreus* (n:23); (D) *A. fumigatus* (n:21); (E*) A. flavus* (n:26); (F) *A. nidulans* (n:24). Inóculo preparado según documento M38-A2 del CLSI.

Tabla 6. Coeficientes de variación (%) de densidades ópticas, unidades MacFarland y contajes de UFC/mL de los inóculos preparados según el documento M38-A2 del CLSI

Especie	N[a]	DO[b]	McF[c]	UFC[d]
Aspergillus niger	*27*	11,6	50,0	110,6
Aspergillus terreus	23	9,9	14,0	41,7
Aspergillus flavus	26	8,9	20,2	54,8
Aspergillus fumigatus	21	7,9	14,0	42,9
Aspergillus nidulans	24	8,8	25,0	103,5
Aspergillus spp.	121	9,7	25,0	74,4

[a]Número de repeticiones
[b]Densidades ópticas (530 nm)
[c]Unidades MacFarland (580 nm)
[d]Unidades formadoras de colonias por mL. Valores $x10^6$

2. Comparación de contajes de conidias en cámara de Neubauer, unidades MacFarland y contajes de UFC/mL de los inóculos preparados según el documento EDEF 9.1. del EUCAST:

Tal como se resume en la tabla número 7, se obtuvieron 121 inóculos de *Aspergillus* spp. ajustados entre 2 y 5 $x10^6$ mediante el contaje de conidias en cámara de Neubauer (CN), según lo estipulado en el documento EDEF 9.1, también se detallan los rangos y los intervalos con un 95% de confianza del contaje de conidias, del promedio de las unidades McF y del promedio de UFC/mL para cada especie.

Se puede observar que las lecturas en unidades McF de los inóculos ajustados entre 2 y 5 $x10^6$ mediante el contaje de conidias en cámara de Neubauer (CN), se encuentran entre 0.3 y 0.9 con un intervalo de confianza del 95% y el rango de UFC/mL obtenido va desde 0.7 a 10.4 $x10^6$ para todas las especies de *Aspergillus*.

2.1 Comparación entre contajes de conidias en cámara de Neubauer y unidades MacFarland:

La tabla 7 muestra los valores de los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos al comparar éstas variables, el valor obtenido para todas las especies de 0.154, indicando que la correlación es mínima. La dispersión de èstos datos se aprecia en el gráfico 4.

Tabla 7. Rangos, intervalos de confianza y coeficiente de correlación de Pearson del contaje en cámara de Neubauer, unidades MacFarland y contaje de unidades formadoras de colonias del inoculo preparado según el documento E.DEF 9.1 del EUCAST.

		Contaje en CN[b]		Unidades McF[c]		Contaje de UFC[d]				
Especies	N[a]	rango	IC 95 %	rango	IC 95 %	rango	IC 95 %	r [e]	r [f]	r [g]
A. niger	28	2,0-4,7	2,5-4,3	0,4-1,3	0,6-1,2	1,0-10,3	1,1-5,1	0.338	0.103	0.180
A. terreus	21	2,3-5,0	3,3-4,9	0,2-0,4	0,2-0,3	1,2-8,1	1,9-5,7	-0.174	0.096	-0.285
A. fumigatus	23	2,7-5,0	3,1-4,7	0,2-0,4	0,1-0,3	1,4-9,6	2,1-6,1	-0.345	-0.048	0.137
A. flavus	27	2,3-4,8	2,5-4,1	0,4-1,0	0,5-0,9	0,6-6,4	1,3-4,3	0.291	0.049	0.395
A. nidulans	22	2,0-4,4	2,3-3,7	0,4-0,7	0,5-0,7	0,8-10,4	1,1-6,3	0.174	-0.041	0.126
Aspergillus spp.	121	2,0-5,0	2,6-4,4	0,2-1,3	0,3-0,9	0,7-10,4	1,4-5,6	0.154	-0.131	0.158

[a]Número de repeticiones
[b]Contaje de conidias en camara de Neubauer. Valores x 10^6
[c]MacFarland. 580 nm
[d]Unidades formadoras de colonia por mL. Valores x10^6.
[e]Coeficiente de correlación de Pearson entre CN vs McF.
[f]Coeficiente de correlación de Pearson entre McF vs UFC/mL.
[g]Coeficiente de correlación de Pearson entre CN vs UFC/mL.

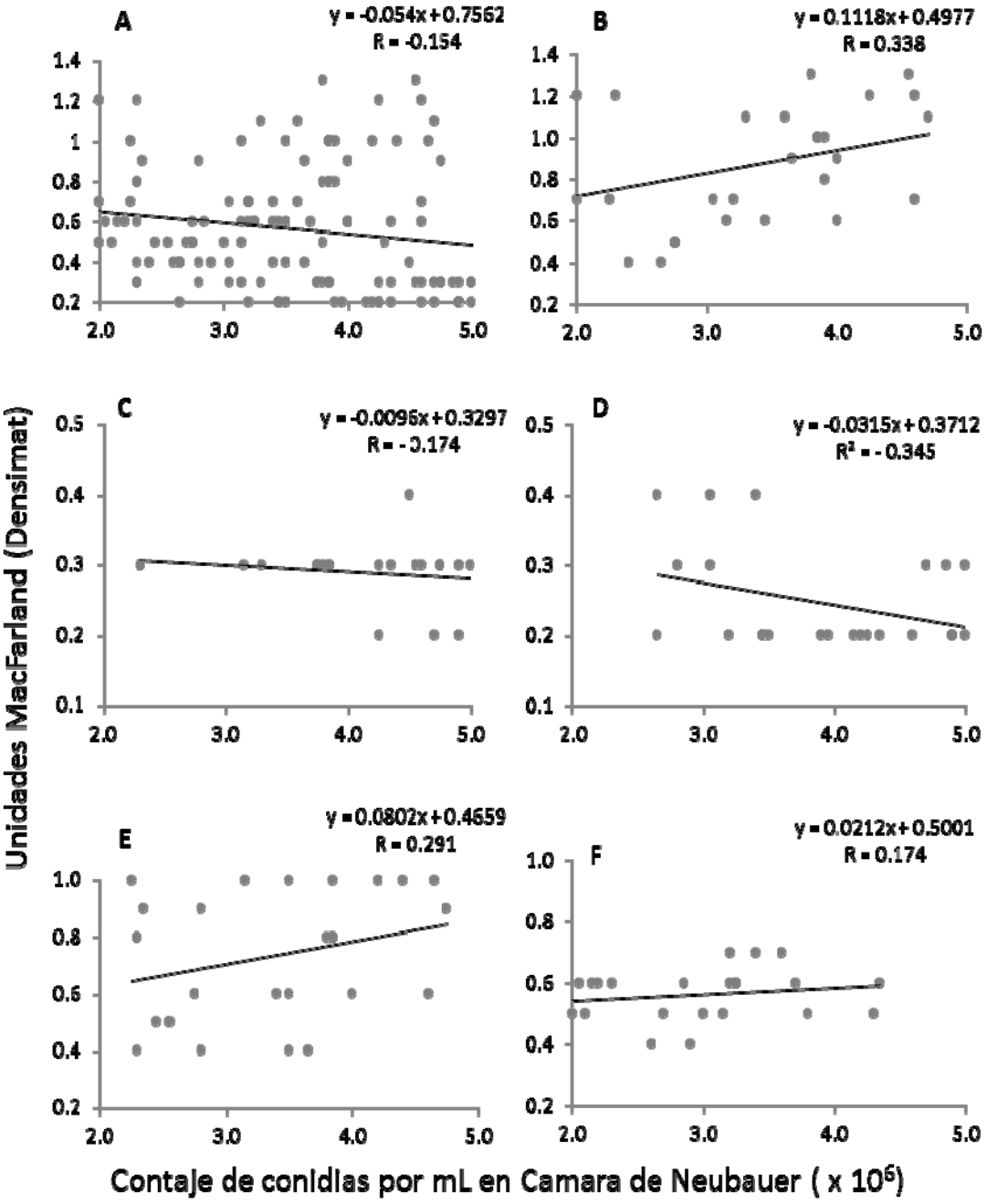

Gráfico 4. Correlación entre contajes de conidias en cámara de Neubauer y unidades MacFarland. (A) *Aspergillus* spp. (n:121); (B) *A. niger* (n:28); (C) *A. terreus* (n:21); (D) *A. fumigatus* (n:23); (E) *A. flavus* (n:27); (F) *A. nidulans* (n:22). Inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1.

Por otra parte, se calcularon los porcentajes de concordancia entre los contajes de conidias en cámara de Neubauer y unidades MacFarland por especies y en conjunto. Para todas las especies ensayadas la concordancia fue moderada (68.6%), presentándose los valores más altos de concordancia en *A. fumigatus y A. terreus*, con un 87.0 y 81.1 %. Ver tabla 8.

Tabla 8. Porcentajes de concordancia e intervalos de confianza entre las variables, contaje de conidias en cámara de Neubauer, unidades MacFarland y contaje UFC/mL del inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1 del EUCAST.

		CN vs McF[b]		McF vs UFC[d]		CN vs UFC[d]	
Especies	N[a]	%C	IC 95 %	%C	IC 95 %	%C	IC 95 %
A. niger	28	78.6	60,5-89,8	71.4	52.9-84.8	64.3	45,8-79,3
A. terreus	21	81.1	60,0-92,3	61.9	40.9-79.3	76.2	44,2-78,5
A. fumigatus	23	87.0	67,9-95,5	73.9	53.9-87.5	65.2	44,9-81,2
A. flavus	27	59.3	40,7-75,5	51.9	34.0-69.3	63.0	50,0-86,2
A. nidulans	22	70.8	50,8-85,1	68.2	47.3-83.6	63.6	43,0-80,3
Aspergillus spp.	121	68.6	59,9-76,2	69.4	60.7-76.9	65.3	56,5-73,2

[a]Número de repeticiones [b] Porcentajes de concordancia entre contajes de conidias en cámara de Neubauer (Valores x 10^6) y unidades MacFarland (580 nm) [c]Porcentaje de concordancia entre unidades MacFarland (580 nm) y unidades formadoras de colonias por ml (Valores x 10^6) [d]Porcentaje de concordancia entre contaje de conidias en cámara de Neubauer. (Valores x $10^{6)}$ y unidades formadoras de coloniaspor mL. Valores x10^6

2.2 Comparación entre unidades MacFarland y contajes de UFC/mL:

La tabla 7 muestra los coeficientes de correlación de Pearson entre las unidades MacFarland y los contajes de UFC/mL para todas y cada una de las especies de *Aspergillus* estudiadas, observándose que en general la correlación entre éstas variables es nula, ya que el coeficiente de Pearson para todos los inóculos preparados. fue de -0.131.

En el gráfico 5 se puede apreciar la dispersión de éstos datos y la línea de tendencia.

El grado de concordancia entre las unidades MacFarland y unidades formadoras de colonias es moderado, éste presenta un porcentaje promedio cercano al 70%, y oscila entre un 60.7 y 76.9 % con un 95% de confianza. Las especies que mostraron mejor concordancia son: *A. fumigatus* con un 73.9% y *A. niger* con 71.4%, ver tabla 8.

2.3 Comparación entre el contajes de conidias en cámara de Neubauer y contajes de UFC/mL:

La correlación entre éstas variables se resume en la tabla 7, es moderada únicamente en el caso de *A. flavus,* en vista de que presento un coeficiente de Pearson de 0.395 y en cuanto al nivel de concordancia entre las variables oscila alrededor del 65% para todas las especies, exceptuando la especie *A.terreus,* que mostró una concordancia de 76.2%, ver tabla 8.

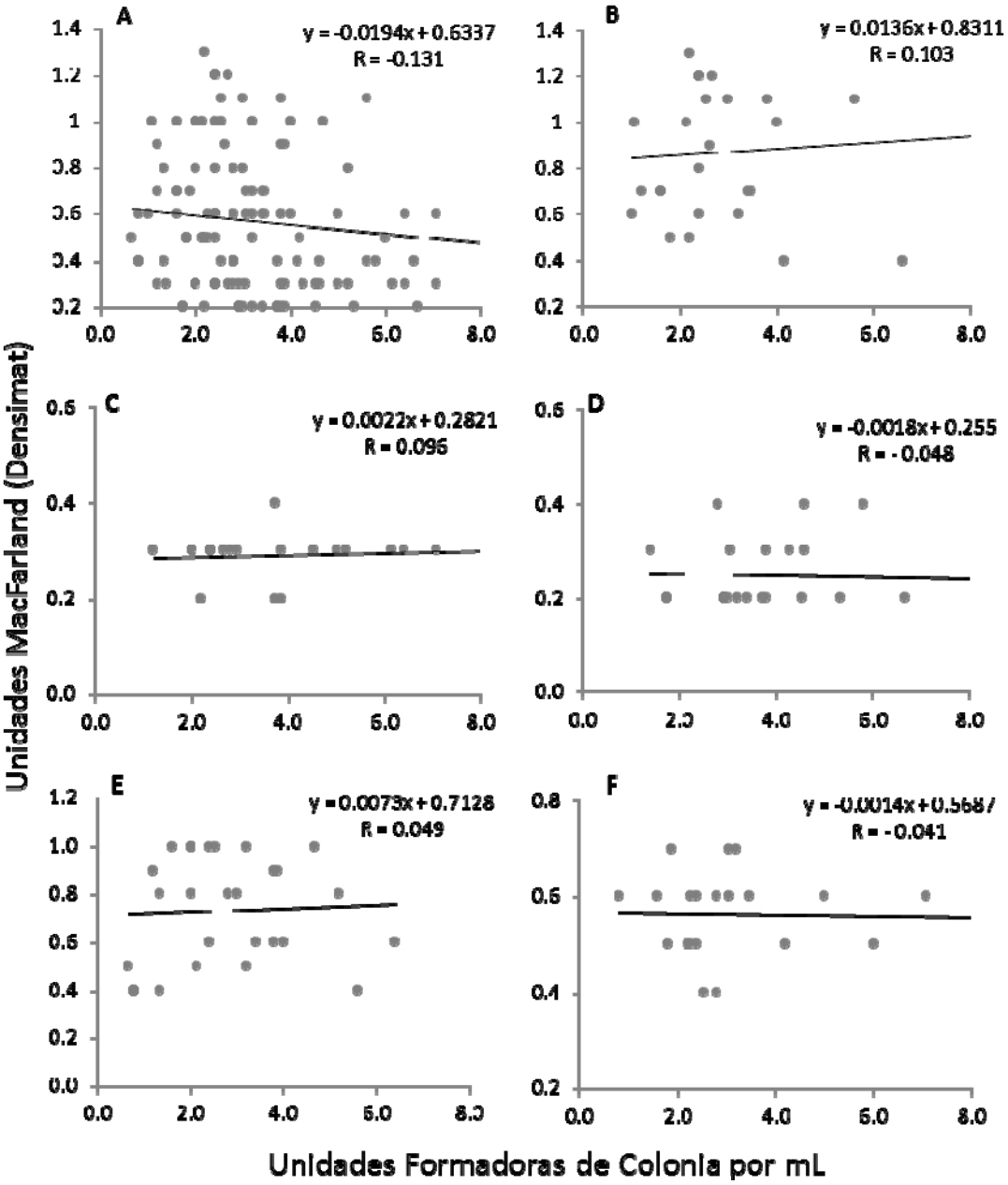

Gráfico 5. Correlación de unidades MacFarland versus contajes de UFC/mL. (A) *Aspergillus* spp. (n:121)*;* (B) *A.niger* (n:28); (C) *A. terreus* (n:21); (D) *A. fumigatus* (n:23); (E*) A. flavus* (n:27); (F) *A. nidulans* (n:22).). Inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1.

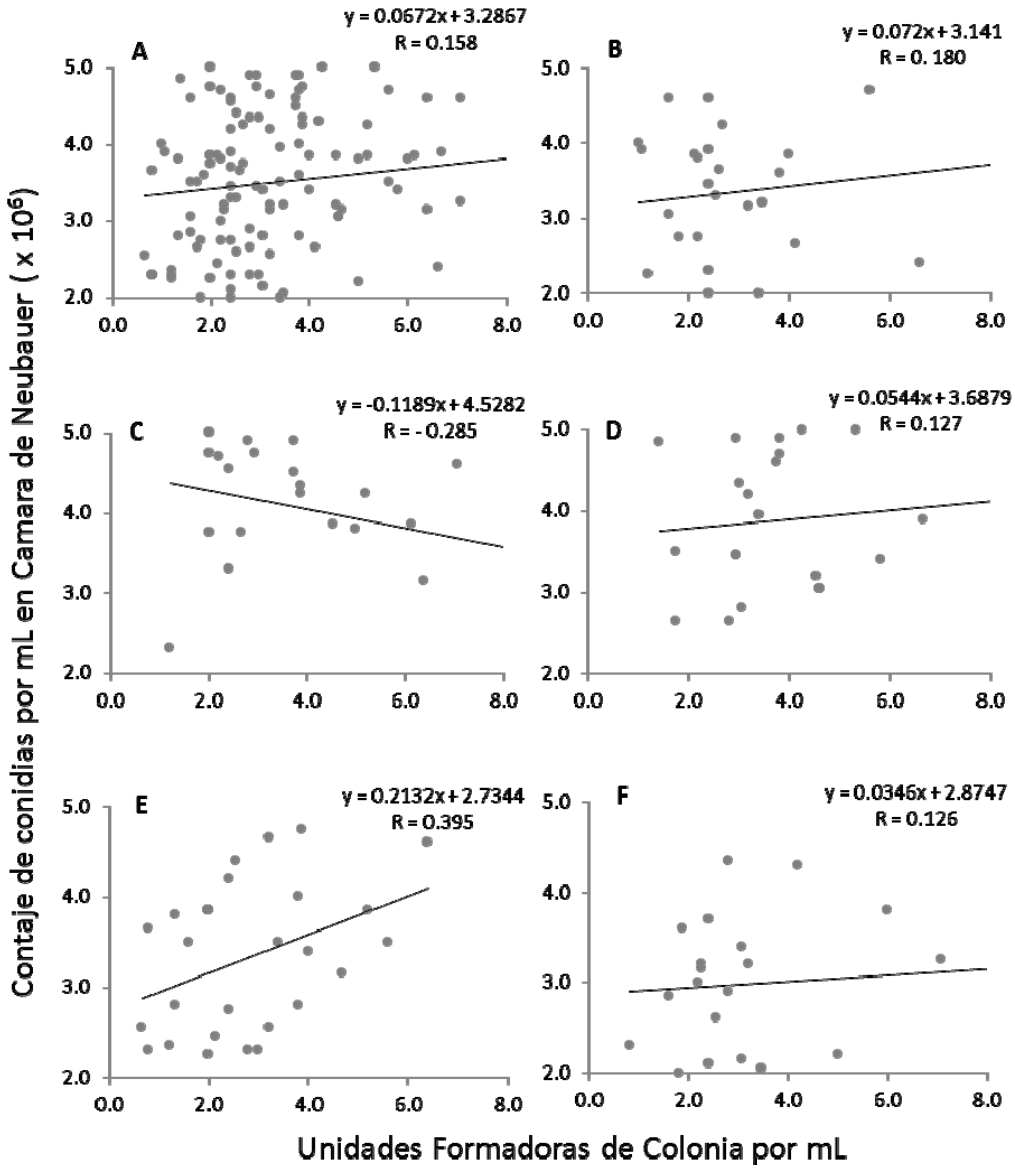

Gráfico 6. Correlación entre contajes de conidias por mL en camara de Neubauer y contajes de UFC/mL. (A) *Aspergillus* spp. (n:121); (B) *A. niger* (n:28); (C) *A. terreus* (n:21); (D) *A. fumigatus* (n:23); (E) *A. flavus* (n:27); (F) *A. nidulans* (n:22).). Inóculo preparado según el documento E.DEF 9.1.

Por otra parte, los coeficientes de variación de los contajes de conidias en cámara de Neubauer, de las lecturas de unidades McF y de los contajes de UFC/mL para los inóculos ajustados según el documento E.DEF 9.1. del EUCAST se exponen en conjunto y por especie en la tabla 9.

Tabla 9. Coeficientes de variación (%) de contaje de conidias entre las variables: contaje de conidias en cámara de Neubauer, unidades MacFarland y contaje de UFC/mL del inóculo preparado por EUCAST.

Especie	N[a]	CN[b]	McF[c]	UFC[d]
Aspergillus niger	28	23,5	33,3	65,6
Aspergillus terreus	21	19,5	14,6	50,0
Aspergillus flavus	27	24,4	28,6	39,5
Aspergillus fumigatus	23	23,1	50,0	48,8
Aspergillus nidulans	22	23,3	16,7	67,6
Aspergillus spp.	121	27,7	50,0	60,0

[a]Número de repeticiones.
[b] Densidades ópticas (530 nm).
[c]Unidades MacFarland (550 nm).
[d]Unidades formadoras de colonias por mL. Valores $x10^6$

DISCUSIÒN

En las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos para los hongos filamentosos, la preparación del inóculo es uno de los pasos más importantes [19,21]. Actualmente existen dos documentos de referencia: uno es el documento M38-A2 desarrollado por el CLSI [17] y el otro, es el E.DEF 9.1 EUCAST. En cuanto a la metodología de la preparación del inoculo, existe una marcada diferencia entre ambos documentos, debido a que el documento M38-A2 [17] refiere que la preparación del inóculo se realice mediante el uso de espectrofotometría, mientras que el E.DEF 9.1. [18] recomienda dicha preparación a través del contaje de conidias en cámara de Neubauer.

En vista de las discrepancias significativas entre los métodos de referencia para la preparación de inóculo, del cuestionamiento de las metodologías especificadas en éstos para tal fin, y a la necesidad de establecer una técnica optima, sencilla y factible de implementar en los laboratorios de micología de nuestro país, se estandarizó una tercera metodología, basada en la densitometría como una posible solución para la preparación del inoculo, que resulto ser más práctica y rápida.

En tal sentido observamos que cuando los inóculos fueron preparados inicialmente siguiendo las especificaciones del documento M38-A2 del CLSI, la correlación obtenida al comparar las lecturas de densidades

ópticas y de unidades MacFarland para las especies *A. terreus, A. fumigatus y A. flavus* fue moderada, (r: 0.541; 0.521 y 0.539 respectivamente), mientras que para *A. niger y A. nidulans* la correlación fue mínima. En el caso de *A. niger* ésta diferencia podría atribuirse a la presencia de un pigmento oscuro que causa interferencia en los métodos de lecturas con sistemas fotométricos, a pesar de haberse utilizado un blanco de color para disminuir dicha interferencia cuando se ajustó el inóculo por espectrofotometría. Esta particularidad no ha sido resaltada ni en el documento del CLSI, ni en la literatura consultada [17,22,24]. En el caso de *Aspergillus nidulans* probablemente se deba a una falta de homogeneidad en el tamaño de las conidias de ésta especie, observada durante los ensayos.

Araujo et al, hasta la fecha, ha sido el único investigador que ha publicado estudios utilizando la densitometría como método para la preparación del inóculo de pruebas de susceptibilidad en hongos filamentosos. Araujo et al, refiere correlaciones más altas que las observadas en el presente trabajo al relacionar valores de densidades ópticas y de unidades MacFarland, para las especies *A. fumigatus, A. flavus* y *A.niger*. En tal sentido los valores de coeficientes de Pearson reportados en su estudio fueron r=0.944, 0.975 y 0.645 respectivamente, mientras que los nuestros son r=de 0.521, 0.539 y 0.179. Resalta la misma particularidad que se presentó en éste estudio con *A. niger,* que mostró una correlación mucho más baja que el resto de las especies [25].

Aunque la correlación entre las lecturas de densidades ópticas y las unidades MacFarland para 3 de las especies fue moderada, hubo una elevada concordancia (81,8%) para todas las especies de *Aspergillus* estudiadas, resaltando los casos de *A. niger y A. nidulans* que mostraron una correlación mínima, pero sus concordancias fueron bastante buenas (85.2 y 95.8% respectivamente).

Resultados muy diferentes se obtuvieron cuando se determinó la correlación entre las unidades MacFarland y el contaje de conidias en CN, (inóculo preparado según la metodología del documento E.DEF 9.1 del EUCAST), ya que para éstas variables, en esta investigación la correlación obtenida fue prácticamente mínima para todas las especies de *Aspergillus* en conjunto (r:0,154). En contraste a nuestros resultados, los reportados por Araujo et al, [25] en su estudio al comparar unidades MacFarland con el contaje de conidias en CN, muestran una correlación por encima de 0.92 para todas las especies ensayadas, sin embargo, se observa una buena concordancia, que oscila entre un 70 a 87% en la mayoría de las especies.

El hecho de tan baja correlación, entre los valores de unidades MacFarland y el contaje de conidias en CN en nuestro estudio, puede ser atribuido, a que las variables comparadas son muy diferentes, la densitometría se basa en la disminución de la cantidad de luz absorbida por conidias cuando el haz atraviesa la suspensión, y es una técnica simple con

pocos pasos, que consiste únicamente en someter el inoculo preparado a la lectura en el densitómetro y por ende no se ve afectada por factores externos. En contraste, el contaje de conidias en CN es una técnica minuciosa que requiere de cierta destreza del operario, en cuanto al llenado de la cámara, y agilidad visual; además, es necesario realizar diluciones con de la suspensión, lo que genera otra fuente adicional de error.

Por otra parte, al comparar los resultados entre las variables unidades MacFarland y unidades formadoras de colonias obtenidos tanto de los inóculos ajustados según el documento M38-A2 del CLSI, como los ajustados según la metodología del documento E,DEF 9.1 del EUCAST, podemos observar que la correlación entre éstas variables para todas las especies de *Aspergillus* es mínima, ya que en el caso de los inóculos preparados por el documento M38-A2 el coeficiente de Pearson fue de 0.141 y en los preparados según el E,DEF 9.1 fue de -0.131, pero al detallar por especie, se observa una correlación moderada para *A. niger* (r=0.538) *A. terreus* (r=0.464) y una baja *A. flavus* (r=0.393) en los inóculos preparados según el CLSI. En el caso de los inóculos preparados según EUCAST no hubo correlación entre las unidades McF y los contajes de UFC/mL para ninguna especie.

Posiblemente la limitada concordancia entre las lecturas de unidades MacFarland y los contajes de UFC/mL, es debida a que ésta última es una técnica que involucra muchos pasos, como diluciones seriadas utilizando

volúmenes pequeños, adicionalmente se utiliza un volumen pequeño también para la siembra en la placa de Sabouraud, por otra parte el tiempo que se emplea en su realización podría afectar la viabilidad o reproducción de las conidias.

La alta variabilidad de los contajes de UFC/mL también se evidencia a través de los altos coeficientes de variación que mostraron los datos en relación a éste parametro, que van entre un 42.9 a un 110 %, y que difieren de manera significativa de los coeficientes de variación mostrados entre los valores de las lecturas de unidades MacFarland, ubicándose alrededor del 25% para el caso de los inóculos preparados según el documento del CLSI (la variación permitida para UFC/ml es de118,5% mientras que para DO es de 25,5%) [17].

Por otra parte los valores de porcentajes de concordancia entre las unidades MacFarland y las unidades formadoras de colonias son mucho mejores que los coeficientes de correlación de Pearson, ya que los primeros se calcularon tomando en cuenta la variabilidad permitida en cada documento de referencia, el M38-A2 del CLSI indica que la cantidad de conidias puede variar entre 0.4 y 5 $x10^6$ (CV= 118,5%) y en el documento E.DEF 9.1 del EUCAST entre 2 y 5 $x10^6$ cel/mL. (CV= 60,6%).

Hasta ahora no hay publicaciones de estudios previos en donde se hayan correlacionado lecturas de unidades MacFarland versus contaje de UFC/mL.

Igualmente cuando se observa los coeficientes de correlación de Pearson al comparar las densidades ópticas versus el contaje de UFC/ml se evidencia que no hay buena correlación, y esto es atribuible a que el método de verificación de inóculo por medio del contaje de UFC/mL , tiene una alta variación, y tal como se explicó anteriormente, se ve afectado por múltiples factores.

Corroborando los resultados arrojados en éste estudio, varios investigadores obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson variables de acuerdo a la especie y no mayores de 0.5 en la mayoría de las especies que estudiaron al correlacionar DO versus UFC/mL. Petrikkou y col. [22] obtuvieron coeficientes de Pearson entre 0.18 a 0.49 mientras que Rodriguez -Tudela y col. [24] reportaron los siguientes valores: -0.088 para *A. fumigatus*, 0.455 para *A.terreus* y 0.437 para *A. niger*, siendo *A. flavus* la única especie que mostro una buena correlación con un r: 0.824. Aberkane y col. [23] en un estudio también, reporto valores bajos al correlacionar DO versus UFC/mL, éstos son: r=0.21 para *A. fumigatus*, 0.01 para *A.terreus* y 0.434 en *A. flavus.*

Por último, los valores obtenidos en este estudio, al comparar el contaje de conidias en la cámara de Neubauer versus las unidades formadoras de colonias UFC/mL fueron similares a la mayoría de los resultados obtenidos por Petrikkou et al. [22] en especial para *A. flavus* con un coeficiente de Pearson de 0.240, (en éste estudio fue de 0.291). Estos

coeficientes de correlación bajos pueden explicarse, debido a que en éste caso las dos variables: Contaje de conidas en cámara de Neubauer y Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) poseen una alta variabilidad permitida de hasta 60,6 % [18], ya que, depende de diversos factores y a pesar de la baja correlación, se puede ver que hay una concordancia aceptable entre el 63 y 76% entre estas dos variables, lo que corrobora que aunque no se correlacionen ajustando al modelo de regresión lineal son concordantes.

Finalmente se recomienda el uso del densitometro como método alternativo para la preparación del inóculo del género *Aspergillus* en la determinación de la susceptibilidad a los antifúngicos.

CONCLUSIONES

1. La densitometría mostró ser un método adecuado, sencillo y rápido para la preparación del inoculo en las pruebas de susceptibilidad antifúngicas *para A.flavus, A.fumigatus, A.terreus y A. nidulans, A.niger.*

2. Para prepara el inoculo por densitometría de *A. niger* es necesario ajustar la lectura con un blanco de color.

3. Existen diferencias en los rangos de unidades MacFarland en la preparación de los inóculos entre las especies de *Aspergillus.*

RECOMENDACIONES

1. Para la preparación de los inóculos por densitometría se establecen los siguientes rangos de unidades MacFarland:

    - *A.flavus, y A. nidulans* 0,4 a 0,6
    - *A.fumigatus,* y *A.terreus* 0,3 a 0,4
    - *A.niger:* 0,2 a 0,8

2. Realizar pruebas de susceptibilidad a los antifungcos en especies de *Aspergillus* utilizandos los rangos recomendados de unidades MacFarland.

BIBLIOGRAFÍA

1. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus.* United States of America: The Williams & Wilkins company.1973.

2. Wilson LS, Reyes CM, Stolpman M, Speckman J, Allen K, Baney J. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. Value Health 2002;5:26-34.

3. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG. Invasive mold infections in allogeneic bone marrow transplant recipients. Clin Infect Dis. 2001;32:1319-24.

4. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. Clin Microbiol Infect. 2008; 14:5-24.

5. Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. Clin Infect Dis 2000;31:1524–1528.

6. Denning DW, Marinus A, Cohen J, Spence D, Herbrecht R, Pagano L**,** *et al.* An EORTC multicentre prospective survey of invasive aspergillosis in haematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. J Infect 1998; 37:173-180.

7. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis. 2001;32:358-366.

8. Patterson TF. Invasive mycoses: management and unmet medical needs: editorial review. Curr Opin Infect Dis 2001;14:669-71.

9. Kontoyiannis DP, Body GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. Eur J Clin Microbio Infect Dis 2002;21:161–172.

10. Patterson TF, Kirkpatrick W R, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, et al. Invasive aspergillosis: disease spectrum, treatment practices, and outcomes. Medicine 2000;79:250–260

11. Patterson T F. New agents for treatment of invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 2002; 35:367–369.

12. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2008;46:327-60.

13. Dannaoui E, Borel E, Monier MF, Piens MA, Picot S, Persat F. Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemother 2001;47:333–340.

14. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 1007;41:1364-8

15. Lass-Florl C, Kofler G, Kropshofer G, Hermans J, Keczy A, Dierich MP, et al. In vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of

clinical outcome in invasive aspergillosis. J Antimicrob Chemother 1998;42:497-502.

16. Pfaller JB, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. In Vitro Susceptibility Testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and Reference Microdilution Methods for determining Voriconazole and Itraconazole MICs. J Clin Microbiol 2003; 41:1126-1129.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard 2nd Ed. M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA.2008.

18. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 9.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for conidia forming mould. Clin Microbiol Infect 2008;14:398-405.

19. Espinel-Ingroff, A, Kerkering TM. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. J Clin Microbiol 1991;29:393-394.

20. Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:314-319.

21. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper Jr C, Fothergill A, et al. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. J Clin Microbiol 1997; 35:139-143.

22. Petrikkou E, Rodrıguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez A, Molleja, A. & Mellado, E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. J Clin Microbiol 2001;39:1345-1347.

23. Aberkane A, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Petrikkou E, Mellado E, Monzón A, et al. Comparative evaluation of two different methods of inoculums preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002;50:719-722.

24. Rodríguez JL, Chryssanthou E, Petrikkou, E**,** Mosquera J, Denning D, Cuenca-Estrella M**.** Interlaboratory evaluación of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. J Clin Microbiol 2003;41:5236-5237.

25. Araujo R, Rodriguez AG, Pina-Baz C. A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an Aspergillus suspension. J Med Microbiol 2004; 53:783–786.

26. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2nd edition. Universitat Rovira i Virgili: Centraalbureau voor Schimmercultures. 2000.

27. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. Mycoses Study Group. Clin Infect Dis 2001;33:1824-33.

28. Brakhage AA. Systemic fungal infections caused by Aspergillus species: epidemiology, infection process and virulence determinants. Curr Drug Targets 2005;6:875-886

29. Denning, DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998;26:781–803.

30. Park SJ, Mehrad B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. Clin Microbiol Rew 2009; 22:535–551.

31. Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to Aspergillus: observations on these two lines of defense in vivo

and in vitro with human and mouse phagocytes. J Clin Invest 1982;69:617-31.

32. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-97. Clin Infect Dis 2001;33:641-647.

33. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. Journal of Hospital Infection 2006; 63:246-254.

34. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. Med Mycol 2005;43:49-58.

35. Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:707-717.

36. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis 2002; 34:909–17.

37. Mersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden EV. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. Am J Respir Crit Care Med. 2004;170:621-5.

38. Reviakina V, Panizo M, Dolande M et al. Diagnóstico inmunológico de las micosis sistémicas durante cinco años 2002-2006. Rev. Soc Ven Microbiol 2007;27:112-119.

39. Iwen PC, Reed EC, Armitage JO, et al.Nosocomial invasive aspergillosis in lymphoma patients treated with bone marrow or peripheral stem cell transplants. Infect Control Hosp Epidemiol 1993;14:131-139.

40. Lumbreras C, Gavalda J. Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. Rev Iberoam Micol 2003;20:79-89.

41. Lass-Florl C, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, et al. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*:10-year single centre experience. Br J Haematol 2005;131:201−7.

42. Tapia C. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Rev Chil Infect 2009;26: 144-150.

43. Canton E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and comercial methods. Expert Rev 2009; 7:107-119.

44. Pfaller, M. A., L. Burmeister, M. S. Bartlett, and M. G. Rinaldi. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. J.Clin. Microbiol 1988; 26:1437-1441.

45. Iltrup D. Statistical methods in microbiology. Clin Microbiol Rev 1990; 3(5):219-226.

46. Bautista G, Tamayo M.C. Evaluación de pruebas diagnósticas. Estudios de concordancia. Revista científica 2005; 11(2):74-79