

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Estudio de la resistencia de *Aspergillus* spp a los antifúngicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Lucio Vicente

DIRIGIDA POR

Emilia Mellado Terrado

Madrid

© José Lucio Vicente, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE ASPERGILLUS SPP A LOS ANTIFÚNGICOS.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

JOSÉ LUCIO VICENTE

DIRECTORA

Dra. EMILIA MELLADO TERRADO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la resistencia de *Aspergillus spp* a los
antifúngicos.**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

JOSÉ LUCIO VICENTE

Directora:

Dra. Emilia Mellado Terrado

A quienes me acompañaron, mi familia y amigos

A mi tío Carlos

AGRADECIMIENTOS

Quién me conozca sabe perfectamente que esta parte de la Tesis es la que más ganas tenía de escribir, porque si algo ha persistido durante todos estos años es la increíble suerte que he tenido de sentirme tan arropado por un gran grupo de gente que me ha apoyado y me ha escoltado mental y emocionalmente durante este viaje que ha supuesto la Tesis. No creo que nunca pueda agradecer lo suficiente vuestra presencia, permanencia y amor, pero ojalá os hagáis una idea con estas palabras.

En primer lugar, Emilia. Muchas gracias por confiar en mí, por ofrecerme la oportunidad para poder iniciarme y desarrollarme como investigador durante estos años. Gracias por el tiempo dedicado, por tu vocación y motivación en este precioso mundo de la investigación que tan bien transmites y por la capacidad de resolución en los momentos más difíciles donde todo se ve cuesta arriba. Además, quería agradecer a Rocío Rubio por su enorme dedicación y amabilidad en esos primeros pasitos de la Tesis, en los que aún no sabes muy bien cómo funcionan las cosas, pero que si existen personas tan profesionales como Rocío todo acaba llegando a buen puerto.

A todas las personas que conforman el Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología. Sheila, Susana y Cris Carballo, gracias por todo el apoyo y ayuda durante estos años por el laboratorio. Ali, Laura, Mariajo, Nuria, Jorge, Ana, Cris Rueda, Leti, gracias por vuestra experiencia y comentarios durante esta época. Teresa y Cris Armentia, gracias por vuestra compañía y los momentos de risas y apoyos cuando eran necesarios. Además, quería agradecer a las personas que me acompañaron durante mi comienzo en el CNM. Óscar, gracias por tu gran visión crítica y tu infinita curiosidad, Rocío Rodas y Haroldo, gracias por acompañarme día a día en esa temporada y por vuestra infinita paciencia.

También quería agradecer a una persona que puso el primer ladrillo de la persona que soy en el trabajo, Raquel. Gracias por la paciencia que tuviste con ese chico que no había pisado un laboratorio más que para hacer prácticas antes de que empezara el TFG. Sin ti nada de esto habría sido posible.

Qué decir de la Dra. González-Jiménez... Para empezar, citando a una gran filósofa contemporánea "Es mi hermanita". Irene, cuando terminaste la Tesis me tuve que hacer a la idea de estar en el laboratorio sin ti, codo con codo. Teniendo en cuenta que en el pasado por cada paso que daba uno, el otro lo daba en paralelo y que por cada día malo estábamos mutuamente para animarlo y sacar una alegría de cada *tweet*, cada "vengo a hablar" o chascarrillo habitual. No sólo eres una gran persona, sino que además eres un ejemplo de constancia, esfuerzo y valentía. Fuiste, y eres, un referente, dentro y fuera del laboratorio, y aunque en la actualidad no ocurra, yo sé dentro de mí que la vida nos depara encontrarnos juntos en la vida laboral, no solo en nuestra larga vida de hermanos laboratoriales. Parafraseándote a ti misma "Jamás un sagitario y una escorpio hicieron tan buen equipo", te quiero.

Gracias a Irene García, por todos estos años de risas y charlas terapéuticas, eres el claro ejemplo del trabajo duro y dedicación, siempre he sentido una gran admiración por la

gran profesional y persona que eres, gracias por estos años y por los que vendrán. Gracias a mi compañero de PFIS, Juan Carlos, por aquella tirada de cartas del tarot y por las risas e historietas que acompañaron estos largos años de camino en paralelo. A Narda, eres una persona increíble, siempre amable y dispuesta. No me canso de poder seguir, aunque sea desde el otro lado del charco, tus brillantes pasos profesionales y personales... ¡Siempre nos quedará el pan de pipas!

A Suelen, mi *maluca* preferida, gracias por la temporada que pasaste aquí, llenaste el corazón a todo el que se topaba contigo y les dejabas la cara dolorida de reír continuamente, aún tengo pendiente continuar aprendiendo portugués, me tendré que descargar Duolingo de nuevo... A Alejandra, una gran compañera de fatigas, que, aunque a veces parezca desde fuera que somos como el perro y el gato, ha sido uno de mis mayores apoyos en los últimos años de Tesis y sin la cual nada de esto habría sido igual. Ha sido un placer compartir estos años y momentos juntos en el laboratorio, y los que sé que están por venir en el futuro, estoy muy orgulloso de ti. A Samu, gracias por el tiempo que hemos podido compartir y a todo tu esfuerzo y amabilidad, todo lo que te propongas lo conseguirás, no lo dudo. A Manu, sé que tu constancia y esfuerzos te llevarán a donde tú quieras. A Rebecca y Laura, os queda una etapa preciosa por delante que afortunadamente podréis compartir todos los que estáis en la actualidad por el labo, espero que sea tan increíble como vosotras. A Candela y Sergito, gracias por el tiempo que he podido compartir con vosotros, habéis hecho de cada día juntos un mejor día, enhorabuena en vuestras nuevas etapas, estoy muy orgulloso de vosotros. Y por supuesto, a Alba, mi mini-yo, ¿quién habría podido imaginar al principio que íbamos a ser inseparables? Supongo que, ya que nos parecemos tanto, si empezara a hacer una lista de las cosas positivas que te caracterizan podría ser un poco egocéntrico ya que entonces quizá también se podrían aplicar a mí, así que lo resumiré en lo feliz que me hace saber que siempre nos tendremos el uno al otro, que podré estar apoyándote en el camino que te espera y en lo mucho que nos comprendemos y queremos.

Gracias a una de las más grandes personas que he podido conocer desde que pisé el CNM. Olga, no sé si podré describir con palabras todo lo que has supuesto para mí desde que te conocí. Has sido un faro que alumbraba los rincones y periodos más oscuros de la Tesis y un espejo al que mirar para aprender del reflejo. Bien es cierto que, a medida que nos hemos conocido, nos hemos dado cuenta de lo mucho que nos parecemos, para bien o para mal. Siempre ha sido fácil hasta la conversación o pensamiento más difícil, para ti una conversación conmigo era como visitar momentos pasados sabiendo el desenlace y para mí era como tener una guía para poder continuar en momentos en los que no veía una senda clara a seguir. Eres un ejemplo de superación y perseverancia personal que me hincha el pecho de orgullo y a la vez me insufla esperanza. Supongo que todo se reduce a Todos Estos Años de Amaia... y a los que quedan por imprimir. Te quiero mucho.

Tengo un recuerdo bastante bueno, a pesar de lo dura que fue, de la época del máster. Eso no habría sido posible sin la compañía de Laura, gracias por incluirme a pesar de llegar días después de que empezara el máster y que la gente ya se hubiera agrupado,

qué ganas de seguir compartiendo vida juntos. Por supuesto no pueden faltar mis Javaos, los que éramos los pesados de la última fila. Gracias Laura Urrea, Ángel y Luismi, fuisteis imprescindibles durante el máster y me alegro de poder decir lo mismo en la actualidad. Por más momentos juntos, incluyan intercambios de lentillas, palomas radioactivas o nuevas cosas por descubrir.

Gracias a Silvia por ese periodo trabajando juntos codo con codo, de risas en el cine, sabiendo que podíamos contar el uno con el otro. Y más aún por la amistad fuera del cine.

En mi último año de carrera pude conocer a Patry, mediante nuestra diosa común, Florence Welch. Lo que nunca pude imaginar es como un concierto en Madrid podría vincularme finalmente con gente tan increíble como Zulema, Andrea, Isa, Óscar, Alba y Sonia. Gracias por todos los momentos juntos, memes, conciertos, lágrimas y risas. Siguiendo con la lista de cosas aleatorias que me han unido a gente especial encontramos OT 2018, Malena y Estefanía muchas gracias por todo lo vivido y lo que queda, y que viva Alba Reche. Tampoco estaba en mi porra que, a través de días, tardes y noches de pandemia, un juego como Among Us me uniera con más gente increíble. Gracias a Paula, Sara, Ana, Lucía y Joe por todos los momentos pasados y los que están por venir. Gracias a Elena, por todo lo grande que nos queda por compartir en el futuro.

A Alba, Noemí, Bárbara, María, Aida y Judit gracias por las risas, noches de fiesta y los apuntes impolutos a los que tenía que intentar ponerme al nivel. Además, necesito mencionar especialmente a Victoria, ya que a pesar de que la vida siempre ha intentado poner distancia entre nosotros no contaba con que fuéramos capaces de mandar audios, que han estado al límite de batir algún récord mundial, con tal de mantenernos actualizados y conectados siempre, gracias por todo amiga.

A MJ, qué decirte amiga, a pesar de que nuestra relación pudo comenzar de manera regular, con ciertas prácticas de microbiología, no pudo evolucionar mejor. Todas las llamadas, días de sofá y YouTube o días de enreco, dominar la aleatoriedad en conversaciones o pensamientos y por supuesto el cariño y apoyo que nos damos. Además, creo que es más que necesario recalcar que me introdujiste completamente en tu familia, adoptándome como un hermano más al presentarme a Laura y a Yolanda. Gracias a las tres por haberme permitido ser parte de vuestra hermandad, por todo el amor de hermanas que me habéis dado y por estar siempre. Además, no puedo alejar de esta hermandad a nuestra compañera de viernes de vía, Vero. Redescubrirnos en amistad tras la carrera ha sido genial, y compartir estos años contigo mejor aún. Gracias también a Mercedes, Roxo, Edgar y Dani, por todas las risas, cenas y cervezas compartidas.

A mis Zotes Burlaos, gracias a Adri, Pablo, Miguel, Caye, Zoe y Diego por ser la mejor manera de poder comenzar la carrera, y continuar la amistad en el presente, a pesar de que durante años nos separaran kilómetros y Tesis en diferentes idiomas.

A Carla, mi compañera de viaje (literal y metafóricamente) durante tantos años, además de la madre de mi portada, gracias por la dedicación, ayuda y paciencia con esta persona que no sabe cómo manejarse con Photoshop. Nuestra relación ha evolucionado tanto que la consideramos un matrimonio, del cual espero poder celebrar las bodas de plata, oro y diamante. Han sido tantos años juntos que no sé qué decirte a estas alturas que sorprenda, me quedaré con lo primero que me sale y siento. Gracias por el tiempo que hemos compartido juntos, creciendo el uno al lado del otro, siendo el hombro en el que llorar y el origen de las risas. Hemos vivido tantas cosas que nos han hecho ser como somos en la actualidad que solo me queda pensar en todo lo que nos queda por vivir. Gracias por todo, te quiero mucho.

Por supuesto, todo esto se lo dedico a mi familia. Gracias por el apoyo incondicional, incluso en días en los que no se sabe ni qué me pasa ni por qué. Por simplemente llegar, abrazarme y llevaros todo lo malo que me pudiera pasar. Gracias a mis padres, por haberme apoyado siempre con todo lo que pudierais y más, por quererme y soportarme. Ojalá que siempre pueda haceros sentir orgullosos de mí. A mi hermano por ser la persona que es, por haber crecido juntos y aprendiendo el uno del otro y por quererme como me quieres, nunca podrás hacerte una idea de lo orgulloso que estoy de ti, de la persona tan increíble que eres, eres mi ejemplo de constancia y de no tirar la toalla a la primera, siempre he tenido mucho de lo que aprender de ti. Gracias al resto de mi familia, mis tíos, primos y a mi abuela.

No puedo terminar los agradecimientos sin mencionar a aquellas personas que no están pero que nunca podrán dejarme. Gracias a mi abuela Vicenta y a mis abuelos, nunca os olvidaré. Sin lugar a duda la última y más especial mención queda para la persona que más me duele no poder agradecer en persona, mi tío Carlos. Daría y haría lo que fuera para que pudiéramos compartir esto juntos como tanto deseabas, te echo tanto de menos... Te quiero.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Características biológicas del género <i>Aspergillus</i>	11
1.1.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
1.1.2. <i>Aspergillus</i> spp.....	13
1.2. Infección por <i>Aspergillus fumigatus</i> y manifestaciones clínicas de la aspergilosis..	14
1.2.1. Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)	14
1.2.2. Aspergilosis pulmonar crónica (APC)	15
1.2.3. Aspergilosis invasiva (AI)	15
1.3. Diagnóstico de la aspergilosis invasiva	15
1.4. Tratamiento de la aspergilosis	16
1.4.1. Mecanismos de acción de los antifúngicos de uso clínico	16
1.4.2. Nuevos compuestos antifúngicos en desarrollo	18
1.5. Antifúngicos de uso en agricultura.....	19
1.5.1. Antifúngicos azólicos de uso en agricultura	19
1.5.2. Antifúngicos no azólicos de uso en agricultura	20
1.6. Resistencia de <i>Aspergillus</i> spp a los antifúngicos	21
1.6.1. Mecanismos de resistencia a azoles	22
1.6.2. Mecanismos de resistencia a antifúngicos no-azoles	26
1.6.3. Rutas de desarrollo de la resistencia clínica y ambiental.....	27
1.6.4. Origen y evolución de la resistencia.....	28
1.6.4.1. Sistemas de reparación de ADN	28
1.6.4.2. Estudios de eficacia biológica (<i>fitness</i>)	29
1.7. Epidemiología y distribución global de la resistencia	30
1.7.1. Vigilancia de la resistencia	31
1.7.2. Métodos de detección de la resistencia.....	32
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1. Cepas y genomas de <i>Aspergillus</i> y cultivo de las cepas	41
3.1.1. Cepas y genomas de <i>A. fumigatus</i>	41
3.1.1.1. Cepas de <i>A. fumigatus</i>	41
3.1.1.2. Genomas de <i>A. fumigatus</i> para en el estudio del gen <i>msh6</i>	41
3.1.2. Cepas de <i>A. flavus</i>	41
3.1.3. Colección de cepas aisladas en el estudio prospectivo de 3 años	41
3.1.4. Recolección de cepas ambientales del estudio.....	42
3.1.5. Cultivo de las cepas	42
3.2. Técnicas microbiológicas	43
3.2.1. Evaluación de la susceptibilidad a antifúngicos de <i>Aspergillus</i> spp	43

3.2.1.1.	E-TEST	43
3.2.1.2.	Microdilución en caldo (EUCAST)	43
3.2.1.2.1.	Antifúngicos de uso clínico	43
3.2.1.2.2.	Azoles de uso ambiental	44
3.2.1.3.	Método de cribado mediante placas de 4 pocillos	44
3.2.2.	Caracterización fenotípica de los mutantes $\Delta msh6$	45
3.2.3.	Experimentos de mutagénesis	46
3.3.	Modelo de interacción con el huésped	46
3.3.1.	Análisis de la supervivencia en el modelo alternativo de <i>Galleria mellonella</i>	46
3.4.	Técnicas de biología molecular	46
3.4.1.	Extracción de ADN de hongos filamentosos	46
3.4.2.	Identificación molecular de las cepas	47
3.4.3.	Cebadores.....	47
3.4.3.1.	Cebadores de los genes <i>cyp51</i> de <i>A. flavus</i>	47
3.4.3.2.	Cebadores del gen <i>cyp51A</i> de <i>A. fumigatus</i>	47
3.4.3.3.	Cebadores de los genes <i>cytB</i> , <i>sdhB</i> , <i>bos1</i> y <i>benA</i>	48
3.4.4.	Condiciones de PCR y secuenciación.....	48
3.4.4.1.	Amplificación de los genes <i>cyp51</i> de <i>A. flavus</i>	48
3.4.4.2.	Amplificación del gen <i>cyp51A</i> de <i>A. fumigatus</i>	48
3.4.4.3.	Amplificación de los genes <i>cytB</i> , <i>sdhB</i> , <i>bos1</i> y <i>benA</i> de <i>A. fumigatus</i>	48
3.4.4.4.	Electroforesis en gel, purificación y secuenciación	48
3.4.5.	Extracción de ARN, RT-PCR y obtención de ADNc.....	49
3.4.6.	PCR cuantitativa (qPCR).....	49
3.4.7.	Genotipado de <i>A. fumigatus</i> con el método TRESPERG	49
3.4.8.	Análisis de la secuenciación del genoma completo (WGS).....	50
3.4.8.1.	Análisis de genes implicados en los mecanismos de reparación del ADN ..	50
3.4.9.	Generación de cepas $\Delta msh6$ de <i>A. fumigatus</i>	50
3.4.9.1.	Construcción del vector.....	50
3.4.9.2.	Transformación de <i>A. fumigatus</i>	51
3.5.	Técnicas bioinformáticas	51
3.5.1.	Análisis de secuencias	51
3.5.2.	Análisis de diversidad genotípica	51
3.5.3.	Análisis filogenético.....	52
3.5.3.1.	Árbol filogenético de los genes <i>cyp51</i> de <i>A. flavus</i>	52
3.5.3.2.	Análisis filogenético de los genes implicados en el MMR	52
3.6.	Estadística	52
3.6.1.	Análisis estadístico de la virulencia (<i>G. mellonella</i>)	52
4.	RESULTADOS.....	56
4.1.	Desarrollo de un método de detección de la resistencia a azoles en <i>A. fumigatus</i> para estudios de vigilancia epidemiológica	56
4.1.1.	Evaluación de la sensibilidad a los azoles de uso clínico.....	56

4.1.2.	Evaluación de la sensibilidad a DMIs de uso agrario.....	56
4.1.3.	Patrón de crecimiento del método de cribado de las placas de 4 pocillos.....	57
4.1.4.	Publicación de los resultados	58
4.2.	Validación del método con muestras clínicas y ambientales en un estudio prospectivo de 3 años en el Hospital Universitario Severo Ochoa	60
4.2.1.	Cepas de <i>Aspergillus</i> spp	60
4.2.2.	Placas de cribado.....	60
4.2.3.	Evaluación de susceptibilidad a antifúngicos	61
4.2.4.	Amplificación y secuenciación de <i>cyp51A</i>	61
4.2.5.	Variabilidad genotípica en muestras ambientales y clínicas.....	61
4.2.6.	Publicación de los resultados	64
4.3.	Origen y desarrollo de la resistencia a los antifúngicos. Estudio del Sistema de reparación del ADN (MMR) en <i>A. fumigatus</i>	65
4.3.1.	Análisis de mutaciones en los genes MMR en una colección de genomas de <i>A. fumigatus</i>	65
4.3.2.	Construcción y caracterización fenotípica de las cepas de <i>A. fumigatus</i> Δ <i>msh6</i>	66
4.3.3.	Evaluación de la susceptibilidad a azoles en las cepas de <i>A. fumigatus</i> Δ <i>msh6</i>	67
4.3.4.	Evaluación de la virulencia en las cepas de <i>A. fumigatus</i> Δ <i>msh6</i>	68
4.3.5.	Estudio de la influencia de la delección de <i>msh6</i> en el crecimiento de <i>A. fumigatus</i> ante distintas condiciones de estrés	68
4.3.6.	Efectos de la delección de <i>msh6</i> en el desarrollo de resistencia a antifúngicos en <i>A. fumigatus</i>	68
4.3.6.1.	Desarrollo de resistencia a azoles	68
4.3.6.2.	Desarrollo de resistencia a antifúngicos no azólicos	69
4.3.7.	Análisis de los genes relacionados con los antifúngicos empleados.....	69
4.3.8.	Publicación de los resultados	70
4.4.	Mecanismos de resistencia a los azoles en <i>A. flavus</i>	72
4.4.1.	Evaluación de la susceptibilidad a antifúngicos clínicos	72
4.4.2.	Evaluación de la susceptibilidad a DMIs	72
4.4.3.	Análisis de las secuencias de los genes <i>cyp51A</i> , <i>cyp51B</i> y <i>cyp51C</i>	74
4.4.3.1.	<i>Aspergillus flavus</i> Cyp51A.....	74
4.4.3.2.	<i>Aspergillus flavus</i> Cyp51B.....	74
4.4.3.3.	<i>Aspergillus flavus</i> Cyp51C.....	74
4.4.4.	Expresión de los genes Cyp51 de <i>Aspergillus flavus</i>	75
4.4.5.	Análisis de secuencias: Alineamiento y similitud	78
4.4.6.	Análisis filogenético.....	78
4.4.7.	Publicación de los resultados	79
5.	DISCUSIÓN.....	84
6.	CONCLUSIONES.....	102
7.	BIBLIOGRAFÍA	106
8.	ANEXOS	136

ABREVIATURAS

A

- ABC** Familia de casete de unión al ATP
ATP-Binding Cassette
- ABPA** Aspergilosis broncopulmonar alérgica
- ADN** Ácido Desoxirribonucleico
- AI** Aspergilosis Invasiva
- ATU** Área de Incertidumbre Técnica
Area of Technical Uncertainty
- AmB** Anfotericina B
- AND** Anidulafungina
- APC** Aspergilosis pulmonar crónica
- APD** Agar patata dextrosa
- API** Aspergilosis pulmonar invasiva
- ARN** Ácido Ribonucleico
- AZB** Azoxistrobin

B

- BCL** Boscalid
- BMZ** Bromuconazol
- BNY** Benomyl

C

- cAMB** Anfotericina B encocleada
- cADN** Ácido Desoxirribonucleico complementario
- CEM** Concentración Mínima Efectiva
- CLSI** Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
Clinical and Laboratory Standards Institute
- CM** Colección de Miceliales
- CMI** Concentración Mínima Inhibitoria

- CPF** Caspofungina

D

- D-Amb** Anfotericina B desoxicolato
- DFZ** Difenconazol
- DMI** Inhibidores de la demetilación

E

- ECDC** Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
European Centre for Disease Prevention and Control
- ECOFF** Punto de corte epidemiológico
Epidemiological cut-off
- EPZ** Epoxiconazol
- EUCAST** Comité Europeo de ensayos de sensibilidad a antibióticos
European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing

F

- FLC** Fluconazol

G

- GYEP** Medio glucosa-extracto de levadura-peptona
Glucose-yeast-peptone medium

H

- HOG** Glicerol de alta osmolaridad
High Osmolarity Glycerol

I

- IFI** Infecciones fúngicas invasoras
- IMZ** Imazalil

Abreviaturas

ISV Isavuconazol

ITC Itraconazol

M

MBC Benzimidazoles

MCF Micofungina

MET Metconazol

MFS Superfamilia del facilitador mayor
Major Facilitator Superfamily

MM Medio mínimo

MMR Sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN
DNA mismatch repair system

MST Árbol de expansión mínima
Minimum spanning tree

N

ND No definido

O

OMS Organización Mundial de la Salud

P

PBS Tampón fosfato salino
Phosphate-buffered saline

PCR Reacción en cadena de la polimerasa
Polymerase chain reaction

PCZ Procloraz

POS Posaconazol

PPZ Propiconazol

prt Piritiamina

Q

qPCR PCR cuantitativa

quantative PCR

QoI Inhibidores de quinolonas

R

R Resistente

ROS Especies reactivas del oxígeno
Reactive oxygen species

S

S Sensible

SDHI Inhibidores de la succinato deshidrogenasa

STRAf Repeticiones cortas en tándem de *Aspergillus fumigatus*
Short Tandem Repeats Aspergillus fumigatus

T

TAE Tris-Acetato-EDTA
Tris-Acetate-EDTA

TBZ Tebuconazol

TR Repetición en tándem
Tandem Repeat

TRESPERG Método de tipificación de *A. fumigatus* que emplea dianas TRESP y el marcador ERG

V

VCZ Voriconazol

W

WGS Secuenciación de genoma completo
Whole Genome Sequencing

WT Salvaje
Wild type

RESUMEN

En la actualidad, la salud pública global se enfrenta a un gran desafío como es la gestión de las infecciones fúngicas y el preocupante aumento de la resistencia a los antifúngicos. Entre los hongos filamentosos, el género *Aspergillus* spp. destaca por su frecuente aislamiento debido a que se encuentra de manera ubicua en el ambiente y a la facilidad de dispersión de sus esporas. En concreto, dentro de este género se encuentra *A. fumigatus* como la especie mayoritaria, aunque otras especies del género, como *A. flavus*, se aíslan cada vez con más frecuencia.

Los azoles son la familia de antifúngicos de uso más frecuente tanto en el tratamiento como en la profilaxis de las infecciones causadas por *Aspergillus* spp. Además, esta familia de compuestos se emplea mayoritariamente en la eliminación de infecciones fúngicas de plantas y cosechas. El uso extensivo y continuado de los compuesto azólicos en ambos escenarios ha favorecido la aparición de aislados de *A. fumigatus* resistentes con una tendencia al alza en cuanto a su detección a nivel global. Actualmente, el problema de la resistencia antifúngica se plantea con un enfoque de Salud Global (“One Health”), ya que es crucial para comprender y analizar el problema no sólo bajo un marco clínico sino también incluyendo su desarrollo medioambiental.

Este aumento de resistencia ha llevado al ECDC a recomendar los estudios de vigilancia epidemiológica, incluyendo tanto muestras de origen clínico como ambiental, para poder evaluar la prevalencia real de la resistencia a azoles, así como las dinámicas poblacionales de *A. fumigatus*. Para poder avanzar en este sentido, es imprescindible disponer de métodos eficaces y rápidos para detectar la resistencia a azoles en *A. fumigatus* y que puedan ser empleados en estudios epidemiológicos de gran escala. En este trabajo se ha diseñado y validado un método de cribado fácil y rápido para detectar cepas de *A. fumigatus* resistentes a los azoles e identificar el mecanismo de resistencia subyacente. El método propuesto en este estudio se puede implementar en cualquier laboratorio clínico de micología con un doble uso: (i) en laboratorios clínicos como indicador rápido de la susceptibilidad a los azoles de los aislados de *A. fumigatus*, y (ii) en estudios de vigilancia para incrementar el conocimiento de la epidemiología local de la resistencia de *A. fumigatus* a los azoles.

En el segundo capítulo de esta Tesis, se ha realizado un estudio de vigilancia prospectivo de tres años de duración. En este trabajo se recogieron todas las cepas de *Aspergillus* identificadas en el hospital, tanto de origen clínico como ambiental. Más del 50% de las cepas aisladas se identificaron como *A. fumigatus*, y le siguieron en frecuencia *A. niger*, *A. terreus* y *A. flavus*. En este estudio de vigilancia se empleó el método de cribado desarrollado en esta Tesis para evaluar la susceptibilidad de estas cepas a los azoles. Se detectaron dos cepas de *A. fumigatus* resistentes, con el mecanismo de resistencia a azoles de tipo TR₃₄/L98H, una de origen clínico y otra de origen ambiental. Estos resultados validan la utilidad del método y confirman la importancia de estos estudios epidemiológicos. La comparación genotípica de las dos cepas resistentes a los azoles con una colección de cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles con el mismo mecanismo de resistencia (TR₃₄/L98H), pero con distinto origen geográfico en España y aisladas a lo largo del tiempo (20 años), mostró una estrecha relación genética, lo que sugiere que existen mecanismos genéticos subyacentes que favorecen el desarrollo de la resistencia a azoles. Además, el hallazgo de genotipos idénticos en cepas de origen clínico y ambiental de *A. fumigatus* sugiere que los pacientes hospitalizados en diferentes partes del hospital pueden

infectarse con la misma cepa, e incluso plantea la posibilidad de que los pacientes puedan contaminar el ambiente mediante la emisión de aerosoles.

En el tercer capítulo de este trabajo se ha investigado la base de la relación genética que existe entre las cepas resistentes con mecanismo TR₃₄/L98H, profundizando en las alteraciones en la vía de reparación del ADN (MMR). Se han evaluado 4 genes del MMR: *msh2*, *msh6*, *pms1* y *mlh1* para estudiar su posible implicación en la resistencia a antifúngicos en *A. fumigatus*. El estudio de 163 genomas de *A. fumigatus* reveló que una mutación en el gen *msh6* (G240A), destacaba por su prevalencia entre cepas resistentes a azoles con un mecanismo de resistencia tipo TR₃₄/L98H. Debido a este hallazgo, se generaron cepas deficientes en el gen *msh6*, para evaluar su papel en el desarrollo de resistencia a antifúngicos observándose que las cepas Δ *msh6* producen un mayor número de colonias mutantes resistentes a dos familias de antifúngicos no azólicos y que no presentan diferencias fenotípicas ni en virulencia respecto a la cepa parental. El estudio de los genes del sistema de reparación del ADN de *A. fumigatus* apoya la hipótesis de que la adquisición de resistencia antifúngica en este hongo podría estar, al menos parcialmente, propiciada por la inestabilidad genética causada por alteraciones en el MMR. Los resultados obtenidos sugieren que un fenotipo hipermutador de *A. fumigatus* podría proporcionar una ventaja en ambientes expuestos a múltiples antifúngicos, sin ser perjudicial para su eficiencia biológica y/o virulencia.

Por otra parte, se empiezan a detectar cepas resistentes a los azoles en otras especies de *Aspergillus* como es *A. flavus*. En este caso, la detección de mecanismos de resistencia a azoles presenta una peculiaridad al tener 3 isoenzimas que codifican la diana de los azoles, Cyp51A, Cyp51B, y Cyp51C. En el cuarto capítulo de este trabajo se analizaron los diferentes genes *cyp51* y la sensibilidad a azoles de una colección de cepas *A. flavus* en la que se encontraron tres cepas resistentes. La mutación P214L se identificó en la enzima Cyp51A de una cepa, relacionada con una mutación con vinculación probada a la resistencia a azoles en *A. fumigatus* (Cyp51A_P216L). También se identificó la mutación H349R en Cyp51C, aunque su relación con la resistencia a azoles no ha sido probada. Por último, el aumento de la expresión del gen *cyp51A*, se contempla como posible mecanismo de resistencia, aunque sería necesario investigar más a fondo su contribución a la resistencia a los antifúngicos.

ABSTRACT

Nowadays, global public health faces a major challenge, such as the management of fungal infections and the concerning increase of antifungal resistance. Among filamentous fungi, the genus *Aspergillus* spp. stands out for being one of the most frequently isolated fungi due to its ubiquitous nature in the environment and the easy dispersal of its spores. Within this genus, *A. fumigatus* is the most frequently isolated species, although other species, such as *A. flavus*, are increasingly isolated.

Azole drugs are the most frequently used family in the treatment and prophylaxis of infections caused by *Aspergillus* spp. Furthermore, this family of compounds has been used for more than 40 years for non-medical purposes, such as the elimination of fungal infections of crops and plants. The extensive and continued use of azole compounds in both scenarios has favoured the emergence of resistant *A. fumigatus* isolates with an increasing global detection trend. Due to this, it is crucial to apply a One Health approach to fully comprehend and analyse the issue of antifungal resistance not only under a clinical vision but also including the environmental development.

This increase has led the ECDC to recommend epidemiological surveillance studies, including both clinical and environmental samples, to evaluate the real prevalence of azole resistance, as well as the population dynamics of *A. fumigatus*. To advance in this direction, it is crucial to have effective and rapid methods to detect azole resistance in *A. fumigatus* that can be used in large-scale epidemiological studies. In this work, an easy and rapid method has been developed and validated to detect azole-resistant *A. fumigatus* strains and identify the underlying resistance mechanism. This method can be implemented in any clinical mycology laboratory with a dual use: (i) in clinical routine as a rapid indicator of the azole susceptibility of *A. fumigatus* isolates, and (ii) in surveillance studies to identify the true burden of azole-resistant *A. fumigatus* isolates at a local level.

In the second chapter of this thesis, a three-year prospective surveillance study has been carried out. Among *Aspergillus* strains identified in the hospital more than 50% of the isolated strains were *A. fumigatus*, followed in frequency of isolation by *A. niger*, *A. terreus* and *A. flavus*. All strains were subjected to a preliminary susceptibility testing using the before mentioned screening method. Two resistant strains of *A. fumigatus* were detected, with the mechanism of resistance to azoles type TR₃₄/L98H, one of clinical origin and the other of environmental origin. The isolation of azole-resistant strains in both settings proves the usefulness of the developed method and highlights the importance of these large-scale epidemiological studies. The genotypes of the two azole-resistant *A. fumigatus* strains were compared with those of a collection of azole-resistant *A. fumigatus* strains that presented the same resistance mechanism (TR₃₄/L98H), but with different geographical origin in Spain and isolated along 20 years. The phylogenetic analysis showed a close relationship between these strains regardless the origin and date of isolation, suggesting the existence of underlying genetic mechanisms that could facilitate the development of azole resistance. Moreover, the discovery of identical genotypes among clinical and environmental *A. fumigatus* strains suggests that patients hospitalized in different parts of the hospital could be infected with the same strains, and even raises the possibility that patients may contaminate the environment through aerosol emissions.

In the third chapter of this work, we were deep on understanding the basis of the genetic relationship among the azole resistant strains by studying the alterations in the DNA repair pathway (MMR). Four MMR genes were evaluated: *msh2*, *msh6*, *pms1* and *mlh1* to study their

involvement in the emergence of antifungal resistance in *A. fumigatus*. The study of 163 *A. fumigatus* genomes revealed that an amino acid substitution in the *msh6* gene (G240A) was highly prevalent among strains with TR₃₄/L98H azole resistance mechanism. Therefore, the deletion of the *A. fumigatus msh6* gene was carried out to evaluate its role in the development of antifungal resistance. The $\Delta msh6$ strains did not present any phenotypic or virulence differences with respect to the parental strain. However, the $\Delta msh6$ strains showed an increased number in resistant colonies after the exposure to non-azole fungicides boscalid and benomyl. This study supports the hypothesis that the emergence of antifungal resistance in this fungus could be, at least partially, driven by genetic instability caused by alterations in MMR. The results obtained suggest that a hypermutator phenotype could provide an advantage to *A. fumigatus* in environments exposed to antifungals, without being detrimental to its fitness and/or virulence.

On the other hand, strains resistant to azoles are increasingly detected in other *Aspergillus* species such as *A. flavus*. In this case, the detection of azole resistance mechanisms is challenging because it harbours 3 genes that encode the target of azoles, *cyp51A*, *cyp51B*, and *cyp51C*. In the fourth chapter of this thesis the azole susceptibility of an *A. flavus* collection was evaluated. Also, we analysed the sequences and expression of the three *cyp51* genes. The P214L amino acid substitution was identified in the Cyp51A of a strain, related to a mutation with proven link to azole resistance in *A. fumigatus*, P216L. The H349R mutation in Cyp51C was also identified, in another strain, although its contribution to azole resistance remains unclear. Finally, increased expression of the *cyp51A* gene is considered as a possible azole resistance mechanism, although its contribution to resistance would need to be further investigated.

1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores retos en materia de salud del siglo XXI es hacer frente a la resistencia antimicrobiana con el fin de mitigar la gravedad de las enfermedades infecciosas en humanos. El aumento de la resistencia a los antimicrobianos limita la capacidad de prevenir y tratar las enfermedades infecciosas causadas por diferentes microorganismos. Esto supone una amenaza considerable a la salud pública, a nivel global. De entre los distintos patógenos que poseen mecanismos de resistencia a antimicrobianos, los hongos son de especial interés, debido a su capacidad de causar infecciones fúngicas invasoras (IFIs).

En la actualidad el número de IFIs se ha visto incrementado por varias razones, siendo una de las causas principales una mayor capacidad diagnóstica de las IFIs y del agente etiológico causante de la infección, lo cual es fundamental para un mejor abordaje del cuadro clínico desarrollado. A pesar de ello, las IFIs están asociadas a porcentajes muy elevados de morbimortalidad, incluso pudiendo llegar a un 90% en ciertos grupos de pacientes (Fang *et al.*, 2023). Esto es debido a que las IFIs están estrechamente relacionadas con especies fúngicas, mayoritariamente patógenos oportunistas, que causan infecciones graves en pacientes bajo tratamiento de larga duración con corticoesteroides, receptores de trasplantes de órgano sólido o pacientes hematológicos, entre otros (Taccone *et al.*, 2015; Patterson *et al.*, 2016).

Entre las IFIs más frecuentes, la aspergilosis invasiva (AI) se presenta como el mayor reto de la micología médica actual. El diagnóstico precoz es difícil y el tratamiento complejo, por ello, se puede entender que los antifúngicos se utilicen a la menor sospecha de infección. Así, el protocolo para el tratamiento de la enfermedad base incluye la profilaxis con antifúngicos. Esta situación ha facilitado el desarrollo de resistencias secundarias a los fármacos empleados. Este hecho comienza a ser un problema que se agrava con la existencia de resistencia cruzada entre los triazoles clínicos y otros azoles de la misma familia que se usan como antifúngicos en la agricultura (Georgiadou y Kontoyiannis, 2012).

Para hacer frente al problema, la Organización Mundial de la Salud ha publicado recientemente (2023) un plan estratégico frente a la resistencia antimicrobiana basado en el concepto "One Health" donde se incluye, entre otros, el objetivo de reforzar el estudio de la resistencia a los antifúngicos (WHO *et al.*, 2023). La importancia de este concepto se debe a los cambios que se han producido en las interacciones entre personas, animales, plantas y nuestro medio ambiente. Este enfoque es especialmente importante cuando se trata de un patógeno ambiental, como es el caso del patógeno *Aspergillus fumigatus*, ya que su presencia ubicua en el ambiente hace crucial el estudio multidisciplinar entre los distintos abordajes, tanto clínicos como ambientales, desde los que se puede analizar el problema.

1.1. Características biológicas del género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* se encuentra distribuido de forma ubicua en la naturaleza, y las especies que lo conforman han sido detectadas por todo el mundo gracias a su capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas (25°C-37°C). A pesar de que los nichos ecológicos en los que crecen varían por factores bióticos y abióticos, estos hongos pueden encontrarse en diferentes tipos de sustratos como la vegetación en descomposición, aire, cultivos, y en el suelo (Van De Veerdonk *et al.*, 2017; Nji, Babalola y Mwanza, 2023). Las especies de *Aspergillus* se caracterizan por ser hongos filamentosos saprófitos, de manera que degradan la materia orgánica presente

Introducción

en los diferentes sustratos, presentando un rol vital en los ciclos de reciclaje de distintos nutrientes, como el nitrógeno y el carbono (Nji, Babalola, y Mwanza 2023). Por sus particularidades, hay ciertas especies que tienen un gran valor en la industria biotecnológica debido a su capacidad de participar en los procesos de fermentación y a la producción de ciertas enzimas de interés (Souza Guimaraes y da Costa Souza 2017; Cairns, Nai, y Meyer 2018). Sin embargo, algunas especies del género *Aspergillus* representan graves problemas en el ámbito agrícola por su habilidad para producir micotoxinas que contaminan los cultivos y suponen un peligro sanitario (Eskola *et al.*, 2020).

Las especies pertenecientes al género *Aspergillus* son capaces de producir un elevado número de esporas asexuales denominados conidios y estos pueden ser inhalados en grandes cantidades por las personas. Estas esporas, de entre 2 y 5 μM de diámetro, se desarrollan en unas estructuras llamados conidióforos, donde ocurre el ciclo asexual de su reproducción (Baltussen *et al.* 2020).

Este género está situado taxonómicamente dentro del reino *Fungi*, concretamente en el filo *Ascomycota*. Se divide a su vez en seis subgéneros (*Aspergillus*, *Cremeri*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes* y *Polypaecilum*) en los cuales se conocen más de 300 especies (Fang y Latgé 2018; Houbraeken *et al.* 2020). A pesar del elevado número de especies que conforman el género, solo una pequeña parte de éstas son especies patógenas de humanos, como *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* o *A. niger*, entre otras (Pathakumari, Liang, y Liu 2020).

1.1.1. *Aspergillus fumigatus*

Dentro de las especies del género *Aspergillus* que causan infecciones en humanos, conocidas como aspergilosis, *A. fumigatus* es la especie de mayor importancia clínica al ser la especie aislada con más frecuencia y la mayor causante de la variedad invasora de la enfermedad en individuos inmunocomprometidos (Abad *et al.*, 2010; Arastehfar *et al.*, 2021). Esto puede deberse a ciertas particularidades de la especie como es su elevada tasa de crecimiento, un menor tamaño de las esporas (entre 2 y 3 μM) o una mayor capacidad de dispersión de las mismas (Van De Veerdonk *et al.*, 2017).

Tradicionalmente se ha considerado que *A. fumigatus* solo se reproducía asexualmente y que la diversidad genética de la especie dependía de un ciclo parasexual que consistía en la fusión de hifas (Latgé, 1999). A pesar de ello, recientemente se ha descrito un ciclo sexual en *A. fumigatus* y un estado teleomorfo que se denomina *Neosartorya fumigata*. Sin embargo, cabe destacar que se trata de una especie heterotálica y que una sola cepa no es capaz de desarrollar en cultivo los cuerpos fructíferos correspondientes al teleomorfo, debiendo ser enfrentadas dos cepas compatibles durante largo tiempo para que los formen (O’Gorman *et al.*, 2009).

En las dos últimas décadas, una de las grandes problemáticas relacionadas con *A. fumigatus* es la alarmante tendencia global de detección de cepas que son multiresistentes a los azoles (Chowdhary *et al.*, 2017; Garcia-Rubio *et al.*, 2017; Latgé y Chamilos, 2019). La resistencia a azoles supone una grave amenaza a la recuperación de los pacientes ya que está estrechamente relacionada con el fallo terapéutico y a una mayor mortalidad (van der Linden *et al.*, 2011; Meis *et al.*, 2016; Paul E Verweij *et al.*, 2016).

1.1.2. *Aspergillus* spp

A pesar de que *A. fumigatus* es el principal agente de la aspergilosis, otras especies del género, como *A. terreus*, *A. niger* o *A. flavus* también pueden ocasionar aspergilosis (Krishnan *et al.*, 2009; Kanaujia *et al.*, 2023). De manera general, la prevalencia de estas especies es similar entre distintos estudios de vigilancia epidemiológica en España, a pesar de que el orden de prevalencia pueda variar entre estudios (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013, 2018; Vidal-Acuña *et al.*, 2019).

A. niger, además de por su prevalencia y su rol como patógeno causante de diferentes formas de aspergilosis, destaca por su gran importancia en la industria biotecnológica, sobre todo en la industria alimentaria, siendo capaz de producir ácido cítrico, y otras enzimas de interés (Schuster *et al.*, 2002).

A. terreus, también juega un importante papel en la industria de la fermentación por la producción de ciertos metabolitos como el ácido itacónico (Lass-Flörl *et al.*, 2021). Además, una característica importante de la especie es la resistencia intrínseca que presenta a un antifúngico de la familia de los polienos, la anfotericina B (AmB) (Vahedi Shahandashti y Lass-Flörl, 2019; Kanaujia *et al.*, 2023).

A. flavus es una especie del género *Aspergillus* peculiar porque presenta algunas características especiales. Aunque es una de las especies que se aíslan con mayor frecuencia en España, la prevalencia de *A. flavus* aumenta en Asia, Oriente Medio y África, ya que presenta una mayor adaptación a condiciones climáticas áridas en comparación con otras especies de *Aspergillus* (Krishnan *et al.*, 2009; Rudramurthy *et al.*, 2019). Al contrario que *A. fumigatus*, los conocimientos sobre los mecanismos de resistencia a ciertos antifúngicos, como los azoles, son limitados. En *A. fumigatus* los mecanismos de resistencia a azoles están mayoritariamente relacionados con mutaciones en la diana de los azoles Cyp51A, o de forma aislada en Cy51B. Sin embargo, *A. flavus* presenta 3 isoenzimas, Cyp51A, Cyp51B y Cyp51C lo que complica el estudio de la resistencia (Rudramurthy *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Además de presentar manifestaciones clínicas diferentes en los cuadros de aspergilosis, *A. flavus* es un hongo muy dañino en el ámbito agrícola por ser un patógeno de cultivos. Además, produce un tipo de micotoxina, las aflatoxinas, que contaminan los cultivos, causando pérdidas muy elevadas en la agricultura. Pero también puede causar intoxicaciones graves con importantes complicaciones de salud debido a su potencial carcinógeno en humanos (Klich, 2007; Amaike y Keller, 2011; Guan *et al.*, 2019; Rudramurthy *et al.*, 2019).

Es necesario destacar que en las últimas décadas se ha producido un importante cambio en la clasificación taxonómica de los hongos. La existencia de complejos de especies ha ocasionado la descripción de nuevas especies, denominadas como especies crípticas, que fueron clasificadas taxonómicamente e identificadas de manera errónea en el pasado. De manera que para identificar correctamente la especie de *Aspergillus* a la que pertenece un aislado se recomienda usar otras dianas como la calmodulina o la β -tubulina (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2012; Arastehfar *et al.*, 2021; Fernandez-Pittol *et al.*, 2022). Un ejemplo de especie críptica del género *Aspergillus* que se clasificaba erróneamente en el pasado y que es difícil de diferenciar sin los métodos actuales recomendados es *A. lentulus*, que pertenece al complejo de *Fumigati* y que tiene unos perfiles de resistencia a antifúngicos distintos a *A. fumigatus* (Balajee *et al.*, 2005; Sugi *et al.*, 2014).

Introducción

1.2. Infección por *Aspergillus fumigatus* y manifestaciones clínicas de la aspergilosis

A. fumigatus es capaz de producir un elevado número de esporas que son liberadas al ambiente, y cientos de estas esporas son inhaladas a diario por los humanos. Debido a su pequeño tamaño, estas esporas pueden llegar hasta los alveolos pulmonares. El resultado de la inhalación de estas esporas depende del estado inmunitario de la persona. En el caso de las personas inmunocompetentes, las esporas son eliminadas por la respuesta inmune innata de las vías aéreas mediante la barrera mucosa o por los macrófagos alveolares si consiguen alcanzar el alveolo pulmonar (Balloy y Chignard, 2009; Margalit y Kavanagh, 2015; Van De Veerdonk *et al.*, 2017; Solano y Vázquez, 2018). En cambio, en el caso de personas inmunocomprometidas, como receptores de trasplantes de órgano sólido, pacientes hematológicos o tratados con inmunosupresores, estas primeras barreras del sistema inmune innato están debilitadas, de manera que las esporas pueden alcanzar los alveolos pulmonares y acaban germinando, penetrando en los pulmones causando la variante invasora de la aspergilosis, y pudiéndose ocasionar la diseminación hematogena de la infección a otros órganos (Figura 1) (Arastehfar *et al.*, 2021; Kanaujia *et al.*, 2023).

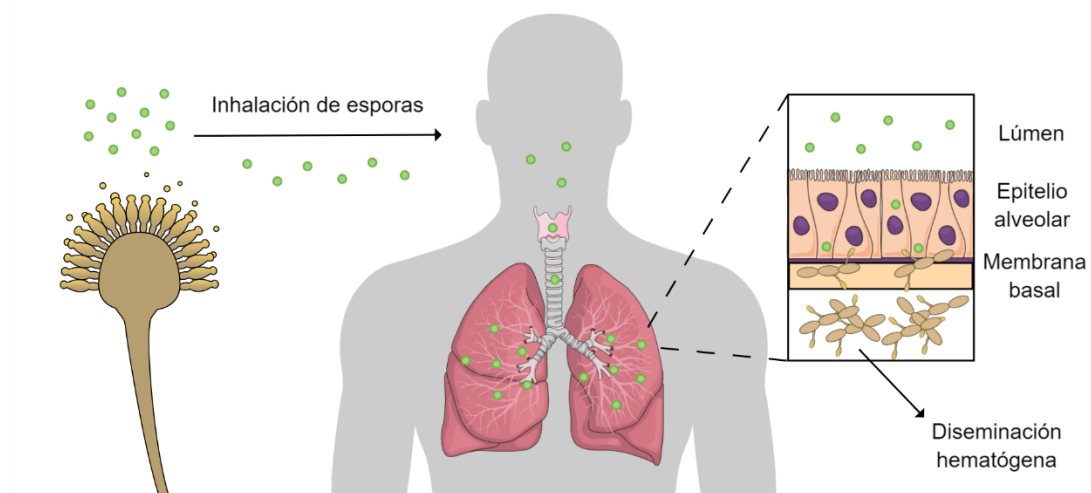


Figura 1. Ciclo de infección de *A. fumigatus* al ser inhalado por un individuo inmunocomprometido, desde la inhalación de las esporas hasta la posterior diseminación hematogena.

Las diferentes especies del género *Aspergillus* pueden causar un amplio espectro de variantes de la aspergilosis en función de la capacidad de respuesta inmunitaria del huésped y de la patogenicidad y virulencia de la especie (Paulussen *et al.*, 2017; Van De Veerdonk *et al.*, 2017).

1.2.1. Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)

La aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) es un raro trastorno pulmonar inducido por una reacción de hipersensibilidad contra *A. fumigatus*. A pesar de que este tipo de aspergilosis es diagnosticada fundamentalmente en pacientes con fibrosis quística o que padecen asma, también existe un grupo poblacional que presenta una cierta predisposición genética a sufrir este tipo de enfermedad (Agarwal *et al.*, 2013; Latgé y Chamilos, 2019). La ABPA cursa clínicamente con unos síntomas bastante inespecíficos como asma severo, tos crónica, fiebre, dolor de pecho o malestar general (Agarwal *et al.*, 2013; Kosmidis y Denning, 2015; Kanj *et al.*,

2018). Debido a estos síntomas inespecíficos, la prevalencia de la enfermedad está subestimada, aunque se estima que al menos 4 millones de personas se encuentran afectadas en todo el mundo (Agarwal *et al.*, 2013).

1.2.2. Aspergilosis pulmonar crónica (APC)

La aspergilosis pulmonar crónica (APC) es una enfermedad compleja que está estrechamente relacionada con otras patologías pulmonares, principalmente con la tuberculosis pulmonar. Debido a esta relación tan íntima, la prevalencia de la APC se considera subestimada, aunque se cree que es un problema global debido a la prevalencia de ciertas patologías pulmonares con las que se vincula (Denning *et al.*, 2016, 2018). Esta enfermedad progresa muy lentamente en el tiempo, con un curso de enfermedad insidioso en el que el paciente sufrirá fatiga, pérdida de peso, tos, fiebre o falta de aire (Denning y Chakrabarti, 2017).

Relacionado con la APC, el aspergiloma, que también se conoce como bola fúngica, es un cúmulo de hifas aglutinadas, fibrina, detritus celulares y moco (Loussert *et al.*, 2010; Fortún *et al.*, 2012). Se trata de una forma de aspergilosis localizada que ocurre cuando *A. fumigatus* coloniza ciertas cavidades parenquimales que existían por enfermedades previas como la tuberculosis (Loussert *et al.*, 2010; Latgé y Chamilos, 2019). La prevalencia de esta manifestación es mayor en África y en el sudeste asiático, estimándose en más de un millón de personas afectadas a nivel global (Chakraborty y Baradhi, 2023). En esta manifestación clínica se genera un microambiente en el interior del aspergiloma de hipoxia en el cual, se asume que *A. fumigatus* se tiene que adaptar y hacer una serie de cambios morfológicos que no se presentan en otros tipos de aspergilosis, y aunque se desconoce bastante en la actualidad, sería muy interesante para poder comprender la enfermedad y como poder afrontarla clínicamente (Van De Veerdonk *et al.*, 2017).

1.2.3. Aspergilosis invasiva (AI)

De todas las formas de aspergilosis, la aspergilosis invasiva (AI) es la manifestación más grave en pacientes inmunocomprometidos, con un total de 4 millones de pacientes en el mundo. Esta enfermedad tiene asociada hasta un 50% de mortalidad, aún siendo diagnosticada y tratada, en pacientes con leucemia o aquellos que han tenido un trasplante de células madre hematopoyéticas (Latgé y Chamilos, 2019). La mortalidad puede aumentar en el caso de aquellas AI que no se diagnostican y tratan a tiempo (Brown *et al.*, 2012). En el caso de estos pacientes, el sistema inmune se encuentra gravemente debilitado y las esporas pueden llegar hasta los alveolos pulmonares, germinando y provocando la denominada aspergilosis pulmonar invasiva (API), de esta manera las hifas de *A. fumigatus* invaden las arteriolas pulmonares y el parénquima pulmonar provocando una necrosis isquémica (Kanj *et al.*, 2018; Latgé y Chamilos, 2019). Un cuarto de los pacientes que sufren IPA pueden experimentar invasión vascular, el hongo puede diseminarse a través del sistema circulatorio, pudiendo llegar a riñones, hígado o sistema nervioso central, en este último caso asociándose a una mortalidad por encima del 80% (Fortún *et al.*, 2012; Kanj *et al.*, 2018; El-Baba *et al.*, 2020).

1.3. Diagnóstico de la aspergilosis invasiva

El diagnóstico de la AI se considera un reto, al no existir una prueba de diagnóstico de referencia conocida como "gold standard". El diagnóstico se basa en la combinación de diferentes hallazgos como los resultados de pruebas microbiológicas (cultivo o exámenes histopatológicos), imágenes radiológicas, evaluaciones clínicas de los pacientes o más recientemente pruebas

Introducción

moleculares (Latgé y Chamilos, 2019; Kanaujia *et al.*, 2023). A pesar de que algunas pruebas, como la detección de galactomanano o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), presentan un mejor resultado diagnóstico, también tienen limitaciones en función de la muestra analizada (Arastehfar *et al.*, 2021). La complicación a la hora de identificar un caso de AI, ya sea por la dificultad de la toma de muestras, los diferentes problemas a la hora de tomar imágenes radiológicas con valor diagnóstico o los problemas al estandarizar ciertas pruebas diagnósticas, concluye en la presunción de AI sin saber si se trata realmente de AI, por lo que se ha llegado a la determinación de clasificar los diferentes casos de AI, como: probable, posible o probado (Bassetti *et al.*, 2021).

Como consecuencia de la problemática para establecer un diagnóstico claro y definitivo de la enfermedad, y a pesar de los avances actuales en diagnóstico y tratamiento, la AI está directamente relacionada con un elevado porcentaje de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Esto se debe fundamentalmente a que se produce un retraso en el inicio de un tratamiento antifúngico adecuado y a su vez está estrechamente relacionado con el aumento de la resistencia a antifúngicos que compromete aún más la capacidad para actuar frente a la AI (Fang *et al.*, 2023; Kanaujia *et al.*, 2023).

1.4. Tratamiento de la aspergilosis

En la actualidad, existen tres grandes familias de antifúngicos para el tratamiento clínico de las infecciones fúngicas sistémicas: equinocandinas, polienos y azoles (Latgé y Chamilos, 2019; von Lilienfeld-Toal *et al.*, 2019). A pesar de que algunas familias, como azoles y polienos, comparten una diana común, sus mecanismos de acción difieren.

1.4.1. Mecanismos de acción de los antifúngicos de uso clínico

La familia de las equinocandinas se compone de tres antifúngicos (anidulafungina, micafungina y caspofungina) que se usan en la clínica para tratar infecciones causadas por hongos (Odds *et al.*, 2003). Las equinocandinas son unos compuestos muy seguros debido a que la diana no se encuentra en humanos al ser específica de hongos (Latgé y Chamilos, 2019). El mecanismo de acción de estos antifúngicos se basa en la inhibición, mediante un bloqueo no competitivo, de la enzima 1,3- β -D-glucano sintasa. Esta enzima forma parte de un complejo proteico que se encarga de la producción de un componente primordial de la pared celular de los hongos como es el 1,3- β -D-glucano. La inhibición de su síntesis altera la presión osmótica de la pared produciendo un aumento de la permeabilidad y la lisis celular (Grover, 2010; Patil y Majumdar, 2017). Esta familia de compuestos es el tratamiento de elección frente a las candidiasis invasoras por su acción fungicida, aunque en el caso de las aspergilosis invasoras estos antifúngicos presentan un efecto fungistático, presumiblemente atribuido a diferencias en el contenido de glucano en la pared celular entre levaduras y hongos filamentosos (Patil y Majumdar, 2017). A pesar de ello se ha observado que las equinocandinas pueden ser efectivas en tratamientos combinados con antifúngicos azólicos (Panackal, 2016; Aruanno *et al.*, 2019).

La familia de los polienos, en la que destaca el fármaco más utilizado, la anfotericina B (AmB). En el pasado y de manera tradicional, se ha establecido que el mecanismo de acción de este antifúngico se debía a la unión de la molécula al ergosterol presente en la membrana plasmática fúngica de manera que se inducía la formación de poros en la membrana, aumentando su permeabilidad y ocasionando la lisis celular (Brajtburg *et al.*, 1990; Mesa-Arango *et al.*, 2012).

Pero en la actualidad se conocen otros mecanismos de acción de AmB, como la adhesión y secuestro del ergosterol (Gray *et al.*, 2012) o la inducción de estrés oxidativo mediante la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), afectando a la permeabilidad de la membrana plasmática (Mesa-Arango *et al.*, 2014). La primera formulación de este compuesto, Anfotericina B deoxicolato sódico (D-AmB) fue introducida a finales de los años 50 para tratar múltiples infecciones fúngicas (Mesa-Arango *et al.*, 2012). A pesar de que durante décadas fue el tratamiento de elección, por su elevada actividad frente a patógenos fúngicos, su uso se limitó debido a la elevada nefrotoxicidad. Esta toxicidad se debe a la afinidad de la AmB por el colesterol, similar al ergosterol, que se encuentra presente en las células humanas (Hamill, 2013; Stone *et al.*, 2016). Con el tiempo, y para resolver su nefrotoxicidad, se han desarrollado nuevas formulaciones, como son el complejo AmB lípido, la dispersión coloidal de AmB y la AmB liposomal, que consisten en una combinación con lípidos para ayudar a disminuir la toxicidad del fármaco manteniendo su actividad antifúngica (Mesa-Arango *et al.*, 2012; Hamill, 2013; Stone *et al.*, 2016).

Por último, la familia de antifúngicos que juega un mayor rol en la profilaxis y tratamiento de las aspergilosis invasivas son los azoles (Solano y Vázquez, 2018). Esta familia de antifúngicos, que se denominan DMIs, incluye muchos compuestos con la particularidad de que se usan tanto en la clínica como en el ámbito agrícola (Meneau y Sanglard, 2005). El mecanismo de acción de los azoles comparte diana con los polienos, el ergosterol, pero en este caso se inhibe, mediante bloqueo competitivo, una enzima que posee un rol esencial en la ruta de síntesis del ergosterol, la 14 α -esterol demetilasa. Esta enzima pertenece al complejo proteico citocromo P450 Cyp51. Cyp51 tiene como función eliminar el grupo metil, en la posición C-14, de los precursores del ergosterol, como lanosterol y eburicol. Los azoles inhiben a Cyp51 bloqueando la síntesis de ergosterol, elemento esencial en la membrana plasmática, alterando su permeabilidad, impidiendo el crecimiento celular y ocasionando la lisis celular. (Bossche *et al.*, 1995; Odds *et al.*, 2003; Carmona y Limper, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

Esta familia de compuestos se puede dividir en dos grupos en función de su estructura química, en concreto respecto a los átomos de nitrógeno que poseen en su anillo, dos átomos en el caso de los imidazoles, y tres átomos en el caso de los triazoles (Nett y Andes, 2016; Nocua-Báez *et al.*, 2020). En 1969 se comercializó la primera generación de compuestos de la familia de los azoles, con representantes como el clotrimazol y miconazol. A principios de los años 80 se mejoró la seguridad y el espectro de acción de los azoles con la llegada del ketoconazol, también de la familia de los imidazoles. Posteriormente, se desarrollaron los triazoles con la introducción de un átomo de nitrógeno más en el anillo característico de los azoles. Primero se comercializó el fluconazol en 1989 y pocos años después el itraconazol (ITC) (Nocua-Báez *et al.*, 2020; Shafiei *et al.*, 2020). A pesar de su relevancia en la línea de desarrollo de los azoles, el fluconazol no presenta actividad frente a las especies del género *Aspergillus* (Shafiei *et al.*, 2020) y, actualmente, el ITC se emplea de manera común en APC o aspergilosis alérgicas (Nett y Andes, 2016). En la actualidad, la terapia clínica con azoles ha cambiado considerablemente al desarrollarse y permitirse el uso clínico de otros triazoles como voriconazol (VCZ) en 2002, posaconazol (POS) en 2006, y más recientemente el isavuconazol (ISV) en 2015 (Nocua-Báez *et al.*, 2020; Shafiei *et al.*, 2020). El tratamiento de elección frente a la AI es VCZ debido a su menor toxicidad frente al tratamiento basado en AmB, a pesar de que presenta ciertos problemas de toxicidad relacionados con trastornos visuales, síntomas neurológicos o posibles

Introducción

alteraciones cardiovasculares. En general los triazoles son compuestos muy bien tolerados y seguros con respecto a otros fármacos como la AmB (Nett y Andes, 2016; Mounier *et al.*, 2018; El-Baba *et al.*, 2020). ISV puede actuar como una buena alternativa al uso de VCZ en pacientes con AI (Jenks y Hoenigl, 2018; Nocua-Báez *et al.*, 2020), es más, parece que presenta una mejor tolerancia en el paciente con un menor desarrollo de síntomas asociados al tratamiento con el azol (Husain y Camargo, 2019).

1.4.2. Nuevos compuestos antifúngicos en desarrollo

A pesar de que existen una serie de compuestos aptos y seguros para el tratamiento clínico de las infecciones fúngicas existen limitaciones debido a efectos de toxicidad, ineficacia frente a ciertos patógenos fúngicos, como las equinocandinas en el tratamiento de la aspergilosis, o el aumento de las especies fúngicas que presentan resistencia a antifúngicos como los aislados de *A. fumigatus* resistentes a los azoles. Todas estas limitaciones suponen un reto en el tratamiento de las infecciones fúngicas y conducen a la necesidad de desarrollar nuevos fármacos antifúngicos frente a estos organismos (Hoenigl *et al.*, 2021; Boyer *et al.*, 2023).

Este desarrollo de nuevos antifúngicos se puede realizar por diferentes aproximaciones: existe la posibilidad de ampliar el arsenal de antifúngicos que se basen en algún mecanismo de acción ya conocido, mejorando los fármacos actuales, nuevas formulaciones, o explorando la acción de ciertos compuestos frente a nuevas dianas (Wiederhold, 2022).

Por ejemplo, existe una nueva formulación de AmB encocleada, cAmB, basado en el uso de nanocristales, que permite la utilización por vía oral. Presenta el mismo mecanismo de acción que las otras formulaciones de AmB, con un potencial considerable en el tratamiento de infecciones fúngicas y como profilaxis en pacientes inmunodeprimidos, mostrando buenos resultados de tolerancia y bajos niveles de toxicidad en los primeros estadios de ensayos clínicos (Kibathi *et al.*, 2018; Aigner y Lass-Flörl, 2020). Dentro de la familia de los triazoles, el opelconazol es un compuesto azólico de uso inhalatorio, de manera que puede alcanzar elevadas concentraciones en pulmón evadiendo las complicaciones por toxicidad que tienen ciertos antifúngicos de uso sistémico (Logan *et al.*, 2022; Boyer *et al.*, 2023). El opelconazol, además, presenta una actividad antifúngica de amplio espectro frente a especies de *Candida* y a ciertas especies del género *Aspergillus*, como *A. fumigatus* (Hoenigl *et al.*, 2021), mostrando una elevada actividad *in vitro* frente a cepas susceptibles y resistentes a azoles de *A. fumigatus* (Colley *et al.*, 2017).

La rezafungina es un nuevo compuesto de la familia de las equinocandinas, manteniendo su mecanismo de acción basado en el bloqueo de la 1,3- β -D-glucano sintasa, con una mejora de su estabilidad, seguridad y farmacocinética/farmacodinámica respecto al resto de equinocandinas (García-Effron, 2020; Pfaller *et al.*, 2020). Además, muestra actividad, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, frente a diferentes especies del género *Aspergillus*, incluido *A. fumigatus* (Wiederhold, 2022). Ibrexafungerp, a pesar de pertenecer a una familia distinta de antifúngicos como son los triterpenoides, presenta un mecanismo de acción similar a las equinocandinas, inhibiendo también la 1,3- β -D-glucano sintasa, aunque con un sitio de unión distinto, por lo que se puede emplear frente a aquellas cepas que sean resistentes a las equinocandinas. Además, se ha comprobado que se trata de un compuesto con actividad *in vitro* frente a *A. fumigatus* (Angulo *et al.*, 2022).

Como representante de las orotomidas, una nueva familia de antifúngicos, la olorofima presenta un mecanismo de acción novedoso, provoca la inhibición de la dihidroorotato deshidrogenasa, una oxidorreductasa involucrada en la ruta de biosíntesis de la pirimidina (Oliver *et al.*, 2016). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de este antifúngico frente a *A. fumigatus* son bajas (Jørgensen *et al.*, 2018) y el compuesto presenta una elevada actividad frente *A. fumigatus*, incluyendo cepas resistentes a azoles, y otras especies del género *Aspergillus*, incluidas especies crípticas (Rivero-Menendez, Cuenca-Estrella, *et al.*, 2019; Seyedmousavi *et al.*, 2019).

Otro nuevo compuesto, el fosmanogepix, es el precursor del manogepix, un antifúngico que presenta un mecanismo de acción distinto al inhibir la acetiltransferasa Gwt1, esencial para el transporte y anclaje de las manoproteínas a la pared celular, que son específicas de los patógenos fúngicos (Hata *et al.*, 2011; Hoenigl *et al.*, 2021). Al intervenir en el anclaje de estas manoproteínas se originan cambios en la virulencia o el crecimiento celular del hongo (Teclegiorgis *et al.*, 2020). Este antifúngico presenta una amplia actividad frente a múltiples tipos de hongos, incluidas cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles (Logan *et al.*, 2022).

A pesar de que en la actualidad hay muchos compuestos que están siendo evaluados en ensayos clínicos, la investigación y el desarrollo posterior de los compuestos es un proceso largo y costoso que limita el interés que se proyecta en posibles compuestos con interés clínico (Fisher *et al.*, 2022).

1.5. Antifúngicos de uso en agricultura

En el ámbito agrícola es habitual el uso de distintos tipos de compuestos que presentan actividad antifúngica frente a hongos patógenos de plantas, de manera que se limite su crecimiento, el daño que generan en los cultivos y las consecuentes pérdidas económicas que suponen (Jørgensen y Heick, 2021).

Existen distintas clases de antifúngicos de uso en agricultura. Mayoritariamente se utilizan compuestos azólicos, inhibidores de la demetilación (DMI), pero también otros antifúngicos no azólicos, entre los que se encuentran distintas familias de compuestos. Actualmente hay cuatro grupos de acción fungicida con un alto riesgo de desarrollo de resistencias: 1) Benzimidazoles (MBCs), 2) Inhibidores de quinolonas (QoI), llamados normalmente estrobilurinas, 3) inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHIs) y 4) recientemente se han introducido fungicidas con nuevos modos de acción como los fenilpirroles. A pesar de pertenecer a familias distintas, en la práctica es habitual que los cultivos se traten con mezclas compuestas de antifúngicos con distintos mecanismos de acción (Bosch *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2022).

1.5.1. Antifúngicos azólicos de uso en agricultura

En el contexto agrícola los azoles, o DMIs, son de los compuestos más usados para evitar las infecciones fúngicas en los cultivos debido a su alta actividad frente a un amplio espectro de hongos patógenos de plantas (Stensvold *et al.*, 2012; Jørgensen y Heick, 2021; Ratnadass y Sester, 2023). A pesar de que su uso está extendido por todo el mundo, Europa y Asia se caracterizan por su uso masivo, y América del Norte por un uso minoritario (Jeanvoine *et al.*, 2020).

Desde su aprobación a finales de los años 70, los DMIs se comenzaron a usar para la protección de los cultivos distinguiéndose dos clases distintas como en el caso de los azoles clínicos, los

Introducción

imidazoles y los triazoles (Hollomon, 2017). Dentro del grupo de los imidazoles destacan compuestos como el imazalil (IMZ) y el procloraz (PCZ) (Bus, 1992; Johanson y Blazquez, 1992; Hollomon, 2017; Jørgensen y Heick, 2021). Entre los numerosos triazoles, existen ciertos representantes muy estudiados, como metconazol (MET), tebuconazol (TBZ), propiconazol (PPZ), epoxiconazol (EPZ), difenoconazol (DFZ) y bromuconazol (BMZ), siendo estos últimos 5 azoles muy similares estructuralmente a los azoles clínicos, y más en concreto con el voriconazol (Snelders *et al.*, 2012; Stensvold *et al.*, 2012; Taher *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018; Zubrod *et al.*, 2019; Garcia-Rubio *et al.*, 2021).

1.5.2. Antifúngicos no azólicos de uso en agricultura

Dentro de las distintas familias de antifúngico no azólicos de uso agrícola, destacan los Qols, también conocidos como estrobilurinas, por convertirse en unos de los fungicidas más usados para proteger los cultivos frente a distintos patógenos de plantas desde su comercialización en el año 1996 (Bartlett *et al.*, 2002; Fernández-Ortuño *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2021). El mecanismo de acción fungicida de las Qols es muy particular y se basa en la unión del antifúngico al citocromo b, concretamente en sitio Qo, bloqueando la transferencia de electrones entre el citocromo b y el citocromo c1, inhibiendo la respiración mitocondrial y evitando la síntesis de ATP, y conduciendo en última instancia a la muerte celular (Balba, 2007; Feng *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2022). Su amplio espectro de acción y eficacia fungicida son las características que le han proporcionado una mayor popularidad para prevenir los patógenos de los cultivos (Feng *et al.*, 2020). Dentro de esta familia destacan compuestos como el azoxitrobin, trifloxistrobin o piraclostrobin (Bartlett *et al.*, 2002; Fernández-Ortuño *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2020), que pueden ser empleados de manera individual o en combinación con otros antifúngicos, incluidos los DMIs (Oliveira *et al.*, 2022).

Los SDHIs son otra clase de fungicidas usados en la práctica agrícola contra diferentes especies de hongos. Originalmente denominados carboxamidas por la carboxina, el primer SDHI se comercializó en 1966 (Sierotzki y Scalliet, 2013). Estos antifúngicos se unen a la ubiquinona del complejo II mitocondrial, inhibiendo la cadena transportadora de electrones, de manera que se produce una interrupción en la producción de ATP y finalmente la muerte celular (Veloukas *et al.*, 2014; Yanicostas y Soussi-yanicostas, 2021; Bouillaud, 2023). El complejo al que se unen las SDHIs no es específico de hongos, ya que se encuentra presente en todos aquellos organismos que tengan mitocondrias, por lo que el uso de estos fungicidas pueden ser una potencial fuente de toxicidad en humanos, como ya ha sido observado en otros organismos, como el pez cebra (Yanicostas y Soussi-yanicostas, 2021). Desde su introducción a finales de los años 60, se han desarrollado nuevas generaciones de SDHI con un espectro de acción más amplio que sus predecesores, entre estos compuestos destacan boscalid (BCL), fluopiram, isopirazam o sedaxane, entre otros (Brauer *et al.*, 2019; Yanicostas y Soussi-yanicostas, 2021).

A finales de los años 60 aparecieron los MBCs, compuestos heterocíclicos que no solo presentan actividad antifúngica, sino que además tienen diferentes usos terapéuticos como antivirales, antiinflamatorios o antibacterianos (Pathare y Bansode, 2021; Banerjee *et al.*, 2023). La acción antifúngica de estos compuestos se debe a su capacidad para unirse a los monómeros de β -tubulina, ocasionando una disrupción de la polimerización de los microtúbulos de modo que no se produce la división celular y la muerte celular (Ermler *et al.*, 2013; Vela-Corcía *et al.*, 2018).

En la actualidad, los MBCs comercializados son benomil (BNY), carbendazim, metil-tiofanato y tiabendazol (Vela-Corcía *et al.*, 2018).

Entre otros antifúngicos con distintos modos de acción encontramos fludioxonil, un antifúngico sintético de la clase de los fenilpirroles que se emplea habitualmente para proteger cultivos frente a patógenos de plantas (Schruefer *et al.*, 2021, 2023). El mecanismo de acción de este antifúngico está relacionado con la vía “High Osmolarity Glycerol” o HOG, implicada en la respuesta a diferentes tipos de estrés, generando una reorganización a nivel de la pared celular y en última instancia la lisis de la célula (Wiedemann *et al.*, 2016). No es habitual encontrar hongos resistentes a este antifúngico en el ambiente, lo que sugiere que el coste de mutaciones que confieren resistencia son mayores que los beneficios que les aporta (Kilani y Fillinger, 2016). A pesar de ello, cuando se encuentran patógenos resistentes a fludioxonil suelen presentar resistencia a otro tipo de antifúngico como es iprodiona, antifúngico que pertenece a la familia de las dicarboxamidas, por lo que parece que estos dos antifúngicos comparten similitudes en sus mecanismos de acción (Fillinger *et al.*, 2012; Kilani y Fillinger, 2016; Oiki *et al.*, 2022).

1.6. Resistencia de *Aspergillus* spp a los antifúngicos

En la actualidad, la resistencia a antifúngicos limita las opciones terapéuticas a la hora de tratar infecciones de hongos patógenos, conduciendo a un aumento de los fallos terapéuticos y a una mayor mortalidad (Van Der Linden *et al.*, 2013; Cowen *et al.*, 2015; Meis *et al.*, 2016).

Antes de comenzar a desarrollar los distintos mecanismos de resistencia a antifúngicos es importante definir qué se entiende por resistencia microbiológica, que se define como la no-sensibilidad a un antifúngico (CMI superior al punto de corte establecido para un antifúngico y microorganismo concreto), evaluado mediante métodos de determinación de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* (Kanafani y Perfect, 2008). La resistencia a antifúngicos puede ser adquirida, en el caso de que se desarrolle debido a la exposición a los antifúngicos (como la resistencia de *A. fumigatus* a los azoles), o intrínseca si se presenta de manera inherente a la propia especie fúngica sin necesidad de exposición previa al antifúngico (como la resistencia de *A. terreus* a AmB) (Denning, 2022).

En la actualidad la técnica de referencia en la evaluación de la susceptibilidad antifúngica se basa en técnicas de microdilución en caldo. Existen dos métodos de referencia de evaluación de la susceptibilidad antifúngica, uno de ellos validado por instituciones estadounidenses como es CLSI (“Clinical and Laboratory Standards Institute”, <https://clsi.org/>), y el método validado por instituciones europeas, EUCAST (“European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing”, <https://www.eucast.org/>) (Bosetti y Neofytos, 2023). A pesar de ciertas diferencias en la metodología entre CLSI y EUCAST, son métodos muy similares que concluyen en un mismo resultado, la determinación de las CMIs, siendo esta la concentración mínima de un antifúngico necesaria para inhibir el crecimiento de una especie fúngica determinada. En el pasado la susceptibilidad de un hongo a un antifúngico en concreto se clasificaba como sensible, intermedio o resistente; en la actualidad el concepto de intermedio ha sido revisado y definido como “sensible, cuando se incrementa la exposición”. Estos resultados son empleados junto con los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos para determinar los puntos de corte clínicos (Pérez-Cantero *et al.*, 2020; Bosetti y Neofytos, 2023).

Introducción

Tabla 1: Concentraciones mínimas inhibitorias establecidas como puntos de corte clínicos, según el método EUCAST, para los antifúngicos empleados en las infecciones causadas por *A. fumigatus*.

		CMI Punto de corte (mg/L)								
		Polienos			Equinocandinas			Azoles		
		AmB	AND	CPF	MCF	FLC	ISV	ITC	POS	VCZ
<i>A. fumigatus</i>	S ≤	1	ND	ND	ND	-	1	1	0.125	1
	R >	1	ND	ND	ND	-	2	1	0.25	1
	ATU	-	-	-	-	-	2	2	0.25	2

CMI, Concentración mínima inhibitoria; S, sensible; R, resistente; ATU, Área de Incertidumbre Técnica; AmB, anfotericina B; AND, anidulafungina; CPF, caspofungina; MCF, micafungina; FLC, fluconazol; ISV, isavuconazol; ITC, itraconazol; POS, posaconazol; VCZ, voriconazol; ND, No Definido.

En el caso de *A. fumigatus*, se han descrito los puntos de corte frente a los principales antifúngicos de uso clínico y pueden ser consultados en las guías de EUCAST y CLSI que se actualizan periódicamente (Humphries *et al.*, 2018; Guinea, 2020) (**Tabla 1**). Además, recientemente se ha introducido el término Área de Incertidumbre Técnica (ATU) cuando un valor determinado de CMI se encuentra en un área en la que existen dificultades interpretativas (Arendrup *et al.*, 2020).

La resistencia a azoles en el género *Aspergillus*, especialmente en *A. fumigatus*, está vinculada tanto al uso de azoles en la clínica, en tratamientos y en profilaxis, como al uso de DMIs para proteger las cosechas (García-Rubio *et al.*, 2017; Pérez-Cantero *et al.*, 2020). En la práctica agrícola, el uso de DMIs va dirigido a patógenos de plantas, pero al compartir *A. fumigatus* nicho ecológico con estos patógenos se ve accidentalmente expuesto a estos fungicidas e indirectamente se somete a la presión selectiva de estos compuestos y se favorece el desarrollo de resistencias a los mismos (Zhang *et al.*, 2017; Verweij *et al.*, 2020). De forma similar esto ocurre con otros antifúngicos no azólicos que se utilizan por su acción fungicida frente diversas especies de hongos patógenos de plantas, como los MBCs, SDHIs o Qols, que pueden ser empleados individualmente o en combinación entre ellos o con DMIs, por lo que *A. fumigatus* por exposición en los campos de cultivo, puede desarrollar mecanismos de resistencia a estos fungicidas sin ser realmente el objetivo de los mismos (Bosch *et al.*, 2014; Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2022).

Debido a las coincidencias en el uso de estos antifúngicos y la presencia de *A. fumigatus* de forma ubicua, es esencial conocer los mecanismos de resistencia frente a antifúngicos azólicos y no azólicos para comprender las dinámicas de desarrollo de resistencia a antifúngicos en el ámbito agrícola.

1.6.1. Mecanismos de resistencia a azoles

El mecanismo de acción de los azoles basa su actividad en la diana Cyp51, una enzima clave en la síntesis del ergosterol. En *A. fumigatus* al igual que gran parte de las especies del género *Aspergillus*, existen dos isoenzimas: Cyp51A y Cyp51B (codificadas por los genes *cyp51A* y *cyp51B*) (Mellado *et al.*, 2001). Las isoenzimas presentan un ancestro común, pero se diferenciaron en su evolución en dos líneas de parálogos diferenciados, aunque se debe incluir

un tercero, Cyp51C, que solo se encuentra en ciertas especies del género *Aspergillus*, como en *A. flavus* (Pérez-Cantero *et al.*, 2020).

En *A. fumigatus*, existen distintos mecanismos que están relacionados con la resistencia a azoles, aunque mayoritariamente la resistencia se relaciona con las mutaciones o sobreexpresión de Cyp51A (García-Rubio *et al.*, 2017), y en casos puntuales se describen otros mecanismos como las mutaciones de Cyp51B, la sobreexpresión de bombas de flujo y otras alteraciones de proteínas independientes de Cyp51A/B (González-Jiménez *et al.*, 2020; Pérez-Cantero *et al.*, 2020; Arastehfar *et al.*, 2021; Rogers *et al.*, 2022).

Entre los mecanismos de resistencia dependientes de Cyp51A existen dos tipos diferentes. En primer lugar, las diferentes mutaciones puntuales en la zona codificante del gen *cyp51A* alteran la susceptibilidad de *A. fumigatus* a los azoles, existiendo diferentes patrones de resistencia a azoles en función de cómo afecte la mutación de Cyp51A al reconocimiento e interacción con los distintos azoles (Warrilow *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; García-Rubio *et al.*, 2017). A pesar de que se han descrito múltiples mutaciones puntuales en Cyp51A, solo en cinco mutaciones (G54, G138, P216L, M220 y G448) se ha podido demostrar la relación directa con la resistencia a los azoles. Además, estas mutaciones generan un perfil muy concreto de resistencia a azoles (**Figura 2**) (Rogers *et al.*, 2022; Bosetti y Neofytos, 2023). En la mutación G54, la más frecuente, se encuentran diferentes sustituciones como G54E/A/R/W/V, presentando unos perfiles de resistencia únicamente a ITC y POS (Díaz-Guerra *et al.*, 2003; Mann *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2003). La sustitución P216L es responsable de un perfil similar de resistencia cruzada sólo a ITC y POS, aunque se ha descrito en raras ocasiones (Camps, Van Der Linden, *et al.*, 2012; Ballard *et al.*, 2018). Respecto a la mutación en G138, existen diferentes variantes, como G138R/C/S que dan lugar a un fenotipo resistente a todos los azoles (Snelders *et al.*, 2010; Oliver *et al.*, 2013; McKinney *et al.*, 2021). Por otro lado, las distintas variaciones de mutaciones de M220 (M220R/I/L/K/T/V) también generan un perfil de resistencia a ITC y con una disminución de la susceptibilidad a POS y VCZ con valores variables según el aminoácido que sustituye a la metionina (Mellado *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2013). Por último, la mutación G448S confiere resistencia a VCZ y disminución de la susceptibilidad a POS e ITC (Peláez *et al.*, 2012a; Kidd *et al.*, 2015; Lavergne *et al.*, 2017).

Introducción

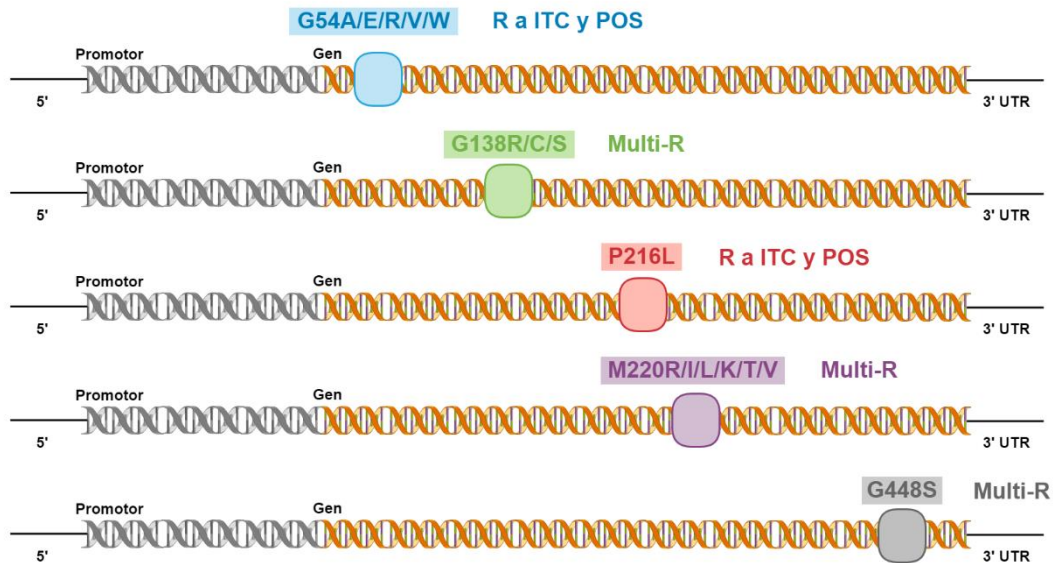


Figura 2: Modificaciones en el gen *cyp51A* de *A. fumigatus* basadas en mutaciones puntuales asociadas a resistencia a azoles clínicos.

En un 10% de las cepas de *A. fumigatus* se describen combinaciones de tres o cinco mutaciones puntuales, como F46Y/M172V/E427K y F46Y/M172V/N248K/D255E/E427K, que presentan un perfil de sensibilidad particular con CMI a los azoles mayores que las cepas sensibles (**Figura 3**) (Howard *et al.*, 2009; van der Linden *et al.*, 2011; Kidd *et al.*, 2015). Existe un debate en torno a su clasificación en función de la susceptibilidad a azoles, al describirse estos aislados en pacientes que presentan un tratamiento durante un largo periodo de tiempo con VCZ se sugiere que el empleo de este antifúngico está relacionado con la detección de cepas con estas combinaciones de mutaciones puntuales (Alanio *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a los distintos perfiles de susceptibilidad que presentan y a los puntos de corte clínicos establecidos, estas cepas no pueden ser catalogadas como resistentes, por lo que habitualmente son clasificadas como sensibles (García-Rubio, Alcazar-Fuoli, *et al.*, 2018).

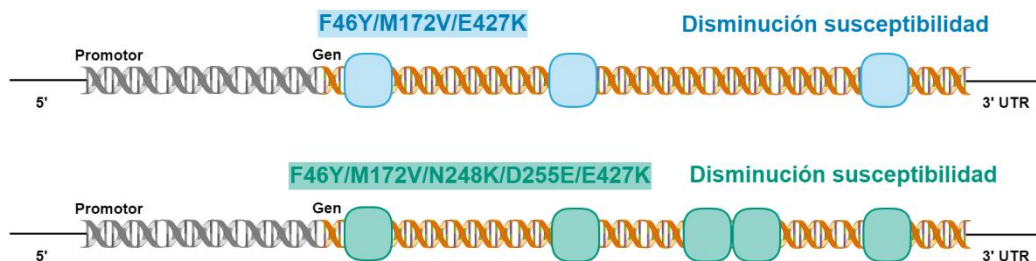


Figura 3: Combinaciones de mutaciones puntuales en el gen *cyp51A* de *A. fumigatus* con perfiles de susceptibilidad disminuida a azoles clínicos.

Existe otro tipo de mecanismo de resistencia que se basa en la sobreexpresión de Cyp51A como consecuencia de inserciones de repeticiones en tándem de un número variable de bases en el promotor del gen, denominados “tandem repeats” (TR) (**Figura 4**). Existen diferentes TR en función del número de bases que se integren (TR₃₄, TR₄₆, TR₅₃ y TR₁₂₀) y que pueden ir, o no, acompañadas de mutaciones puntuales en el gen (García-Rubio *et al.*, 2017; Latgé y Chamilos, 2019; Pérez-Cantero *et al.*, 2020). El mecanismo más descrito y estudiado es la inserción de 34 pares de bases acompañado de una mutación puntual L98H, conocido como TR₃₄/L98H (Mellado *et al.*, 2007; Wiederhold *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018; Gonçalves *et al.*, 2021). Aunque existen aislados resistentes que presentan una combinación del mecanismo TR₃₄/L98H y dos mutaciones puntuales más, S297T y F495I (TR₃₄/L98H/S297T/F495I) que se encuentra frecuentemente en cepas procedentes de Asia (Pontes *et al.*, 2020).

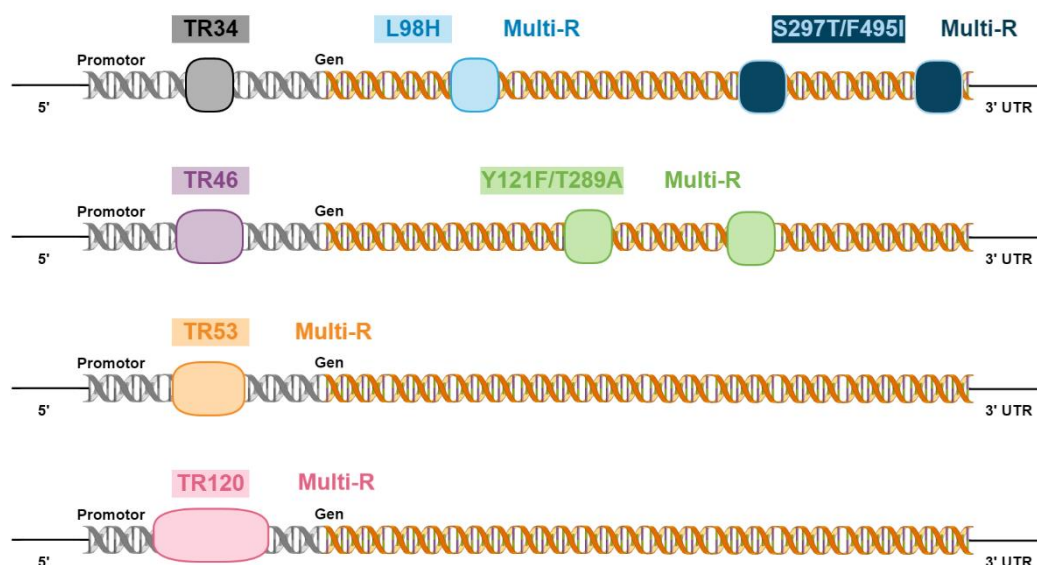


Figura 4: Inserciones en tándem de variable tamaño en el promotor de *cyp51A* acompañadas en algunos casos con mutaciones puntuales en el gen *cyp51A* de *A. fumigatus*, asociados con perfiles de multiresistencia a azoles de uso clínico.

Más recientemente, se describe un mecanismo basado en la inserción de un TR de 46 pares de bases con dos mutaciones, Y121F y T289A (TR₄₆/Y121F/T289A) (Vermeulen *et al.*, 2012; van der Linden *et al.*, 2015; Wiederhold *et al.*, 2016; Ahangarkani *et al.*, 2020; Asadzadeh *et al.*, 2023). Por último, y muy esporádicamente, se han descrito dos mecanismos de resistencia a azoles que no presentan ninguna mutación que acompañe al TR, una inserción de 53 pares de bases y una inserción de 120 pares de bases (TR₅₃ y TR₁₂₀, respectivamente) (Hodiamont *et al.*, 2009; Hare *et al.*, 2019). Independientemente del tipo de TR y las mutaciones acompañantes, estos mecanismos están siempre relacionados con resistencia a todos los azoles clínicos (Pérez-Cantero *et al.*, 2020).

En el caso de otras especies del género *Aspergillus*, los mecanismos de resistencia a azoles han sido estudiados ocasionalmente. En el caso de *A. flavus*, existen estudios de los mecanismos de resistencia a azoles incluyendo su característica diferencial ya que esta especie posee un tercer parálogo de la diana de los azoles, Cyp51C. Además, *A. flavus* tiene una especial relevancia

Introducción

epidemiológica al ser una de las principales especies no-*fumigatus* causante de aspergilosis en el mundo (Krishnan *et al.*, 2009). En relación a mutaciones puntuales asociadas a resistencia a azoles en *A. flavus*, destaca la mutación Y319H en Cyp51C que está asociada a una susceptibilidad reducida a VCZ (Paul *et al.*, 2015), y otras mutaciones, en los tres parálogos de Cyp51, que han sido propuestas como responsables de la resistencia a azoles, aunque su implicación en la misma no se ha demostrado (Rudramurthy *et al.*, 2017).

Aunque las alteraciones relacionadas con Cyp51A representan el principal mecanismo de resistencia a azoles en *A. fumigatus*, se ha descrito la existencia de un porcentaje considerable de cepas resistentes a los azoles que no presentan alteraciones ni en el promotor ni en el gen de *cyp51A* (Bueid *et al.*, 2010; Chowdhary *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2019). Algunos de estos mecanismos parecen estar relacionados con la sobreexpresión bombas de flujo que reducen la concentración intracelular de los azoles. En este sentido se han descrito alteraciones de la familia de transportadores ABC ("ATP-Binding Cassette") o de las bombas de la familia MFS ("major facilitator superfamily", pero dado que en *A. fumigatus* existe un alto número de bombas de flujo, la relación entre la sobreexpresión de estos transportadores y la resistencia a azoles no está totalmente demostrada (Chowdhary *et al.*, 2014; Cowen *et al.*, 2015; Moye-Rowley, 2015).

Por otro lado, se ha empezado a estudiar las alteraciones del parálogo de Cyp51A, Cyp51B, y se ha descrito que la sobreexpresión de este gen se ha visto relacionada con cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles (Buied *et al.*, 2013) y más recientemente con la presencia de una mutación puntual en *cyp51B*, G457S, que se ha propuesto como posible mecanismo de resistencia a azoles (Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2020). Además, existen otros genes implicados en la ruta de biosíntesis del ergosterol como *hmg1*, en el cual se han descrito distintas mutaciones como D242Y, F262del, S269F, S305P, P309L, F390Y/L o I412S en relación con el desarrollo de resistencia a azoles, aunque su implicación directa está aún no está del todo definida (Hagiwara *et al.*, 2018; Rybak *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019; Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021).

1.6.2. Mecanismos de resistencia a antifúngicos no-azoles

Como se ha mencionado con anterioridad, *A. fumigatus* se encuentra en el ambiente compartiendo nicho ecológico de manera natural con otros patógenos fúngicos de plantas. Por esta razón en el intento de controlar las poblaciones de hongos que infectan a los cultivos, el uso de fungicidas en el campo supone una presión selectiva no solo a esos patógenos de plantas sino también a *A. fumigatus*, que puede favorecer la emergencia de cepas resistentes a los mismos (Fraaije *et al.*, 2020; Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021).

Uno de los antifúngicos más utilizados en el campo es la familia de los QoIs que tienen como diana el citocromo b, codificado por *cytB*. En los limitados estudios que se han realizado respecto a la resistencia a QoIs en *A. fumigatus*, se han descrito ciertas mutaciones de la diana relacionadas con la resistencia, como son F129L, que confiere resistencia a azoxitrobin pero no a piraclostrobin y G143A, relacionada con resistencia general a QoIs (Fraaije *et al.*, 2020; Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2022). Otro de los antifúngicos utilizados son los SDHIs, y la resistencia a los mismos se asocia a dos mutaciones en *sdhB*, H270R/Y relacionadas con la resistencia únicamente a BCL (Fraaije *et al.*, 2020; Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021). Y por último, las mutaciones presentes en el gen que codifica la diana de los MBCs, *benA*, como

E198A/Q y F200Y, que se han descrito en cepas resistentes a los MBCs (Fraaije *et al.*, 2020; Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2022).

En este punto es interesante resaltar que las cepas de *A. fumigatus* con resistencia a fungicidas no azólicos presentan una estrecha relación genética con cepas que son resistentes a azoles clínicos y DMIs con mecanismos de resistencia basados en TR₃₄/L98H (Fraaije *et al.*, 2020; Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2022). Esta relación sugiere que podría existir un vínculo con el desarrollo de la resistencia de *A. fumigatus* a los azoles.

1.6.3. Rutas de desarrollo de la resistencia clínica y ambiental

El aumento de cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles en la última década, ha llevado a muchos grupos a desarrollar líneas de investigación en este campo. El aumento de resistencia se debe fundamentalmente al uso de azoles clínicos como profilaxis y tratamientos de larga duración en la clínica, pero sobre todo al uso de DMIs en el ambiente agrícola para eliminar los patógenos de plantas en cultivos (Stensvold *et al.*, 2012; Garcia-Rubio *et al.*, 2017; Arastehfar *et al.*, 2021; Jørgensen y Heick, 2021). Al existir diferentes tipos de azoles y de su uso, tanto en clínica como en agricultura, entender dónde se origina la resistencia y de qué manera se produce nos permitirá comprender la evolución de la resistencia y eso facilitará obtener conocimientos para frenar su aumento y dispersión a nivel global. Existen dos rutas bien diferenciadas: una ruta clínica y una ruta ambiental (Figura 5).

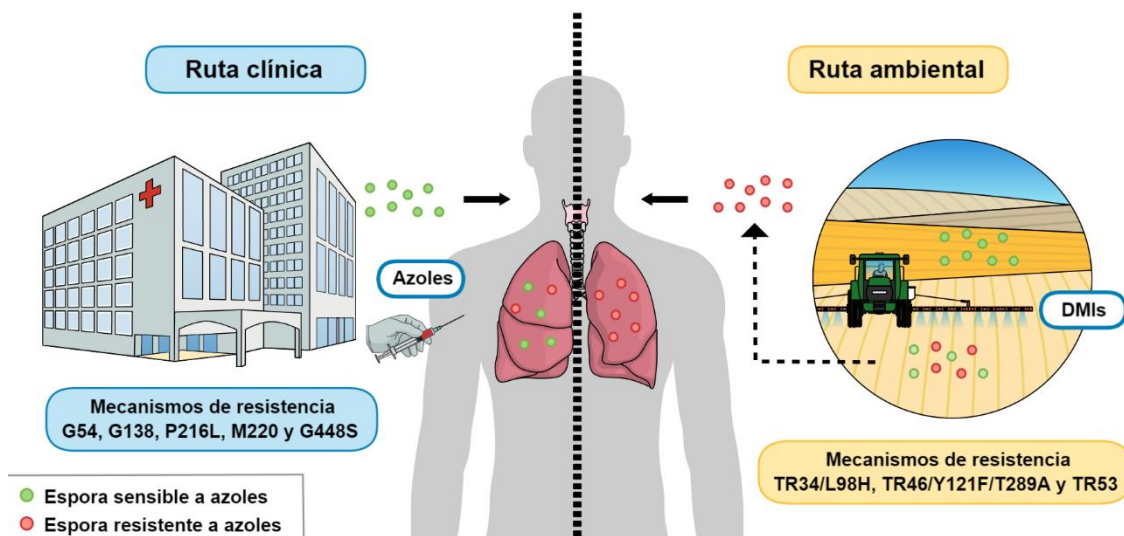


Figura 5: Desarrollo de resistencia a azoles en *A. fumigatus* por las dos distintas rutas, clínica y ambiental, y los mecanismos de resistencia a azoles relacionados con las rutas descritas.

En la ruta clínica, o también llamada médica, el desarrollo de la resistencia ocurre *in vivo*, dentro del paciente, cuando las cepas de *A. fumigatus*, inicialmente sensible a los azoles, se ve expuesta durante un largo periodo de tiempo, a los azoles que se administran como profilaxis o tratamiento contra las aspergilosis. En esta vía de desarrollo de resistencia a azoles pertenecen los mecanismos de resistencia basados en mutaciones puntuales en *cyp51A*: G54, G138, P216L, M220 y G448S (Camps, Van Der Linden, *et al.*, 2012; Garcia-Rubio *et al.*, 2017; Rogers *et al.*, 2022). El azol empleado en la terapia del paciente y las mutaciones que se describen en los

Introducción

aislados resistentes de estos pacientes están directamente relacionadas. Por ejemplo, el hallazgo de cepas de *A. fumigatus* que poseen una mutación del tipo G448S está relacionado con tratamientos de larga duración con VCZ (Pelaez *et al.*, 2012a). También, el uso de posaconazol e itraconazol siempre da lugar a la selección de cepas con mutaciones G54 o P216L (Mann *et al.*, 2003; Dannaoui *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Camps, Van Der Linden, *et al.*, 2012). La única manera de evaluar si el desarrollo de la resistencia ha sido mediante esta ruta es mediante el análisis genético de cepas de *A. fumigatus* aisladas de muestras del paciente separadas en el tiempo. De esta manera se puede comprobar la existencia de cepas isogénicas antes (sensibles) y después del tratamiento (resistentes) (Howard *et al.*, 2009; Mortensen *et al.*, 2011; Camps, Van Der Linden, *et al.*, 2012).

En la ruta ambiental, el desarrollo de la resistencia a azoles ocurre de manera previa a la infección en pacientes, es decir tiene lugar en el ambiente agrícola debido al empleo de DMIs, y posteriormente las esporas resistentes son inhaladas por el paciente. Los mecanismos asociados a esta ruta están basados en las inserciones de TR, con o sin mutación puntual añadida, como TR₃₄/L98H, TR₄₆/Y121F/T289A y TR₅₃ (Snelders *et al.*, 2008; Garcia-Rubio *et al.*, 2017). Ciertos hallazgos apoyan la existencia de esta ruta ambiental, en primer lugar la similitud estructural entre DMIs y los azoles de uso clínico que conlleva resistencia cruzada entre ambos grupos (Garcia-Rubio *et al.*, 2021), y además el aislamiento de cepas de *A. fumigatus* con este tipo de mecanismos de resistencia en pacientes que no habían recibido tratamiento previo con azoles, por lo que la selección del mecanismo de resistencia no pudo haber ocurrido en el paciente (Stensvold *et al.*, 2012; Pelaez *et al.*, 2015; Gonzalez-Jimenez, Lucio, Menéndez-Fraga, *et al.*, 2021). Por último y muy relevante la estrecha relación genética que presentan las cepas resistentes a azoles que presentan un mecanismo de resistencia TR₃₄/L98H, sugiriendo un origen común y la posterior expansión global (Garcia-Rubio *et al.*, 2018). Además, recientemente mediante análisis de secuencias de genomas completos de *A. fumigatus* se ha demostrado la relación genética entre las cepas multirresistentes a fungicidas, tanto azoles como no-azoles, lo que indicaría un ancestro/patrón de evolución común y confirmaría el origen ambiental de este tipo de *A. fumigatus* resistente a los azoles (Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021).

1.6.4. Origen y evolución de la resistencia

La aparente estrecha relación genética de las cepas de *A. fumigatus* que poseen mecanismos de resistencia basados en TR, especialmente TR₃₄/L98H, sugiere la existencia de otros mecanismos implicados en el fondo genético de estas cepas que les podría proporcionar una mejor adaptación al medio.

1.6.4.1. Sistemas de reparación de ADN

La estabilidad genética está directamente relacionada con la capacidad del ADN para evitar errores que ocurren durante la replicación. Así, se ha descrito que ciertas alteraciones de las vías de reparación del ADN, favorece la inestabilidad genética, y este hecho parece estar involucrado en el desarrollo de resistencia a antifúngicos en ciertas especies de patógenos, incluido *A. fumigatus* (dos Reis *et al.*, 2018).

Entre los mecanismos de reparación de ADN destaca el sistema de reparación de errores, MMR ("DNA mismatch repair system", MMR), que se encarga del reconocimiento y reparación de los errores que puedan ocurrir durante la replicación celular (Harfe y Jinks-Robertson, 2000; Iyer

et al., 2006; Li, 2008). En el caso de los organismos eucariotas, este sistema se compone de dos complejos, con múltiples proteínas, diferenciados por sus funciones: MutS, cuya función principal es reconocer el error, y MutL que ejecuta la reparación del mismo (Harfe y Jinks-Robertson, 2000; Iyer *et al.*, 2006; Li, 2008; Larrea *et al.*, 2010; Gambhir *et al.*, 2022).

El sistema MMR se encuentra conservado tanto en bacterias como en organismos eucariotas. En hongos, ha sido caracterizado y estudiado fundamentalmente en *Saccharomyces cerevisiae* (Reenan y Kolodner, 1992; Mendillo *et al.*, 2005; Boiteux y Jinks-Robertson, 2013; Dahal *et al.*, 2017; Boyce, 2022). Pocos estudios han evaluado este sistema de reparación de ADN en *A. fumigatus*, aunque se conoce que este sistema está especialmente conservado en el filo *Ascomycota*, y está compuesto por genes como *msh1*, *msh2*, *msh3*, *msh4*, *msh6* o *mlh1* (Phillips *et al.*, 2021).

En ocasiones el sistema MMR puede presentar algún tipo de alteración, principalmente por mutaciones, lo cual se traduce en la interrupción de las funciones que cumple. Es decir, ocurren fallos en la detección de los errores y su eliminación, por lo que se favorece la aparición de los denominados fenotipos hipermutadores, aunque la proporción en la que estas mutaciones pueden darse difiere en función del gen del sistema MMR que se ve afectado por la alteración (Gambhir *et al.*, 2022). En los últimos años se han realizado diferentes estudios con patógenos fúngicos que presentan ciertas alteraciones en el sistema MMR para evaluar la posible relación con un aumento del desarrollo de resistencia a antifúngicos. En *C. glabrata* se han encontrado resultados contradictorios sobre la implicación de MSH2. En ciertos estudios no se encuentra ningún tipo de asociación entre cepas con alteraciones en MSH2 y un aumento del desarrollo de resistencias a antifúngicos (Dellière *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2018; Bordallo-Cardona *et al.*, 2019). Sin embargo, en otro estudio se sugiere que este fenotipo hipermutador ligado a alteraciones de MSH2 está relacionado con un aumento de resistencias a antifúngicos (Healey *et al.*, 2016). Los resultados de este último estudio están en sintonía con los obtenidos al estudiar las alteraciones de ciertos genes del sistema MMR en el desarrollo de resistencia a antifúngicos en *Cryptococcus neoformans* (Boyce *et al.*, 2017) y *C. deuterogattii* (Billmyre *et al.*, 2017), así como se ha observado también en uno de los únicos estudios realizados con *A. fumigatus* (dos Reis *et al.*, 2019).

A pesar de que tradicionalmente se cree que los fenotipos hipermutadores están ligados a una gran disminución de la eficacia biológica por el coste de las mutaciones, los resultados observados en los anteriores estudios muestran que también presenta ventajas, ya que les permite tener una mayor variabilidad genética, aumentando su adaptabilidad a situaciones extremas como la presión selectiva de un antifúngico, sin afectar necesariamente a su eficacia biológica (*fitness*) (Healey *et al.*, 2016; Billmyre *et al.*, 2017; Albehajani *et al.*, 2022).

1.6.4.2. Estudios de eficacia biológica (*fitness*)

La selección de cepas que poseen mutaciones depende directamente de la ventaja que las mutaciones confieren a las cepas para competir y sobrevivir frente al resto de las poblaciones fúngicas. Es decir, es dependiente de los costes y los beneficios que la alteración aporta en su *fitness* respecto a cepas que no la presentan.

De manera tradicional, se asume que los mecanismos de resistencia están relacionados con una disminución del *fitness* de las cepas resistentes frente a las cepas salvajes cuando no está

Introducción

presente el antifúngico (Anderson, 2005). En los estudios de evaluación del *fitness* es habitual realizar pruebas fenotípicas para determinar si existen diferencias de crecimiento frente a distintas temperaturas, condiciones de estrés oxidativo o sobre la pared celular y diferencias en la virulencia de las cepas, como se han realizado en diferentes estudios con patógenos fúngicos (Vincent *et al.*, 2013; Valsecchi *et al.*, 2015; Hawkins y Fraaije, 2018).

Los resultados de las evaluaciones fenotípicas de los costes y beneficios de las mutaciones en los patógenos fúngicos difieren en función del microorganismo y de los mecanismos responsables de la resistencia a antifúngicos. En el caso de la resistencia a AmB en el género *Candida*, concretamente para *C. albicans* y *C. tropicalis*, un estudio demuestra que la resistencia a AmB conlleva un importante coste para las células, mostrando hipersensibilidad *in vitro* a multitud de estresores y disminución de la virulencia en modelos *in vivo* (Vincent *et al.*, 2013). Sin embargo, otro estudio con *C. albicans* resistentes a fluconazol, concluyó que a pesar de mostrar inicialmente una limitación en su *fitness* respecto a las cepas parentales se llegaba a una compensación del mismo con el paso del tiempo en los nuevos linajes de las cepas resistentes (Cowen *et al.*, 2001). Por el contrario, un estudio con cepas de *C. glabrata* resistentes a azoles demuestra que la virulencia de estas cepas resistentes es incluso mayor que las cepas sensibles (Ferrari *et al.*, 2009). En *A. fumigatus* resistentes a azoles, diferentes estudios muestran que no se observan diferencias de virulencia entre las cepas sensibles y las resistentes (Mavridou *et al.*, 2010) ni diferencias en el *fitness* entre cepas sensibles y resistentes en condiciones de ausencia de azoles (Valsecchi *et al.*, 2015). Sin embargo, otro estudio demostró que a pesar de que si se observaba una disminución del *fitness* en cepas de *A. fumigatus* resistente a los azoles frente a cepas sensibles, en ausencia de azoles, este coste se acababa compensando con otro tipo de mutaciones (Paul E. Verweij *et al.*, 2016).

A pesar de estos estudios puntuales el impacto de la resistencia a antifúngicos en el *fitness* es bastante desconocido, posiblemente debido a que en estas cepas se encuentran implicados un amplio conjunto de cambios genotípicos y de expresión génica, por lo que aún queda mucho por estudiar.

1.7. Epidemiología y distribución global de la resistencia

Los aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles se encuentran distribuidos por todo el mundo. Este hecho es de especial relevancia por su implicación en una mayor mortalidad de los pacientes infectados debido al aumento de posibilidades de fallo terapéutico (Paul E Verweij *et al.*, 2016; Latgé y Chamilos, 2019).

Los aislados resistentes a azoles se encuentran en todos los continentes, aunque de manera mayoritaria se detectan en Europa (Rath *et al.*, 2012; Bromley *et al.*, 2014; Prigitano *et al.*, 2014, 2019; Bader *et al.*, 2015; Steinmann *et al.*, 2015; van Ingen *et al.*, 2015; Vermeulen *et al.*, 2015; Führen *et al.*, 2015; Jeanvoine *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2018; Sewell *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020; Guegan *et al.*, 2021). Sin embargo, el resto de continentes también han empezado a estudiar este aumento de resistencia, encontrándose cepas resistentes en Oceanía (Kidd *et al.*, 2015; McKinney *et al.*, 2021), Asia (Chen *et al.*, 2016, 2020; Onishi *et al.*, 2017; Dabas *et al.*, 2018; Nakano *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021), África (Amona *et al.*, 2022), y América (Le Pape *et al.*, 2016; Hurst *et al.*, 2017; Gonzalez-Lara *et al.*, 2019; Etienne *et al.*, 2021; Macedo *et al.*, 2021; Monpierre *et al.*, 2021; Gómez Londoño y Brewer, 2023).

A pesar de que los aislados de *A. fumigatus* se encuentran distribuidos de manera global, la prevalencia de la resistencia a azoles en *A. fumigatus* varía mucho entre las diferentes partes del mundo, incluida España, ya que en función del estudio realizado se encuentran prevalencias que van desde menos del 1% hasta el 15% (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013, 2018; Escribano *et al.*, 2013, 2020; Rivero-Menendez *et al.*, 2019; Vidal-Acuña *et al.*, 2019). Estos resultados tan variables confirman la necesidad de aumentar la vigilancia de aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles y hacerlo de manera consensuada, para poder tener una idea clara de prevalencia real.

1.7.1. Vigilancia de la resistencia

Debido a la problemática a nivel global de la resistencia a antifúngicos, y en concreto de la resistencia a azoles en *A. fumigatus*, el aumento de la vigilancia epidemiológica es crucial para conocer de manera adecuada las distribuciones poblaciones de *A. fumigatus* y la prevalencia de la resistencia a azoles. Por esta razón el "European Centre for Disease Prevention and Control" (ECDC) estableció como primordiales los estudios de vigilancia epidemiológica a nivel local, de manera que permita manejar de una mejor manera la información que estos estudios aportan (ECDC *et al.*, 2013).

Como se ha tratado de remarcar en esta tesis, es importante no centrar únicamente el foco en la resistencia a azoles en cepas de *A. fumigatus* de origen clínico. El desarrollo de la resistencia a los azoles está directamente relacionado con el medioambiente, por lo que es muy importante ampliar los conocimientos que aportan los estudios de vigilancia epidemiológica incluyendo cepas de origen ambiental, ya que se hipotetiza que son una fuente de diseminación de cepas de *A. fumigatus* resistente a azoles en el ámbito hospitalario (Gonzalez-Jimenez, Lucio, Menéndez-Fraga, *et al.*, 2021). A pesar de que en los últimos años en España ya se han empezado a incluir cepas de *A. fumigatus* origen ambiental en estudios de vigilancia (Escribano *et al.*, 2021; Peláez-García de la Rasilla *et al.*, 2022), la norma hasta los últimos años era realizar estos estudios únicamente con cepas de origen clínico, lo cual mostraba una imagen limitada de la distribución de las especies del género *Aspergillus* y la prevalencia de la resistencia a azoles (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013, 2018; Vidal-Acuña *et al.*, 2019).

Para llevar a cabo esta vigilancia se emplean métodos estandarizados que permitan detectar la resistencia a azoles y, además, métodos de tipificación molecular para estudiar las relaciones genéticas entre los distintos aislados de *A. fumigatus*, tanto clínicos como ambientales. Aunque han sido descritos distintos métodos de tipificación (Bain *et al.*, 2007; de Ruyter *et al.*, 2007; Klaassen, 2009; Alanio *et al.*, 2017), en la actualidad habitualmente se utilizan dos métodos, que destacan por su elevado poder de discriminación: "Short Tandem Repeat of *A. fumigatus*" (STRAf) (De Valk *et al.*, 2005) y TRESPERG (García-Rubio *et al.*, 2016). A pesar de que ambos métodos son buenos, STRAf destaca por tener un mayor poder discriminatorio, y TRESPERG porque es más sencillo en cuanto a metodología y requiere de un menor equipamiento y conocimientos específicos, por lo que puede emplearse en cualquier laboratorio (García-Rubio *et al.*, 2018).

Introducción

1.7.2. Métodos de detección de la resistencia

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la técnica de referencia empleada para evaluar la susceptibilidad a los antifúngicos es la microdilución en caldo, y como métodos estandarizados y validados se encuentran los descritos por CLSI y EUCAST. A pesar de su relevancia en cuanto a este tipo de metodología, presentan una serie de limitaciones relacionadas con su complejidad. Se trata de pruebas con un elevado coste, tiempo de preparación y complejidad a la hora de realizarlas, por lo que son métodos que están directamente vinculados a centros especializados donde haya personal debidamente capacitado tanto para la realización de las pruebas como su posterior lectura e interpretación.

A finales de los años 2000 se diseñó un método de detección de resistencia a azoles en *A. fumigatus* basado en placas de 4 pocillos que contenían agar bacteriológico y tres de estos pocillos se suplementaban con azoles de uso clínico, ITC, VCZ y POS, siendo el cuarto un pocillo de control de crecimiento (Linden *et al.*, 2009). Este método es mucho más fácil y rápido de realizar que los anteriores métodos estandarizados, por lo que en la última década ha sido empleado en distintos estudios para validarlo y comenzar a usarlo como método de cribado en estudios de detección de cepas de *A. fumigatus* resistente a azoles (Arendrup *et al.*, 2017; Buil *et al.*, 2017). A pesar de que no es una prueba con valor de detección de resistencia a azoles definitiva, ya que se necesita comprobar los valores de susceptibilidad mediante las técnicas estandarizadas clásicas de microdilución en caldo y secuenciando tanto el promotor como el gen de *cyp51A* para estudiar el mecanismo de resistencia asociado, EUCAST ha recomendado este método por su gran capacidad de cribaje e importancia en los estudios de vigilancia epidemiológica (Guinea *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El éxito del tratamiento de las infecciones fúngicas se ve mermado por la creciente detección de hongos resistentes a los antifúngicos. Entre los diferentes patógenos causantes de las infecciones fúngicas destaca el género *Aspergillus*, con ciertas especies más representativas por su frecuencia de aislamiento y características particulares relacionadas con la resistencia a azoles como *A. fumigatus* y *A. flavus*. Los azoles son el tratamiento de primera línea frente a las infecciones causadas por *Aspergillus* spp., por lo que la resistencia a azoles en estos hongos es una preocupación a nivel global. Debido al aumento de aislados resistentes a azoles de *Aspergillus* spp., especialmente *A. fumigatus*, el ECDC recomienda los estudios de vigilancia epidemiológica, incluyendo tanto muestras de origen clínico como ambiental, para poder comprender y valorar las dinámicas poblacionales de *Aspergillus* spp. y la prevalencia local de la resistencia a azoles. En la actualidad existen dos métodos de referencia para detectar la resistencia a antifúngicos (EUCAST y CLSI), pero se encuentran limitados a centros de referencia, con personal y materiales especializados. Debido a ello, es necesario favorecer el uso de métodos de detección rápida de resistencia a azoles, que puedan ser utilizados como cribado de los aislados obtenidos, y así acelerar y facilitar su posterior evaluación epidemiológica. La resistencia a azoles está relacionada con una posible vía de desarrollo ambiental, ya que en la clínica se detectan aislados de *A. fumigatus* con mecanismos de resistencia tipo TR₃₄/L98H, en pacientes que no han sido expuestos a un tratamiento con azoles. Esto es posible debido a que *Aspergillus* spp. se encuentra de manera ubicua en el ambiente, en zonas agrícolas donde se emplean antifúngicos de distintas clases, tanto azólicos como no azólicos, para combatir otros patógenos fúngicos de plantas, de manera que las especies de *Aspergillus* se ven expuestas indirectamente a una presión selectiva por el uso de estos antifúngicos. El estudio filogenético de cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles con mecanismos de resistencia tipo TR₃₄/L98H muestra una estrecha relación genética entre estas cepas independientemente de su origen geográfico, y aunque se desconoce cómo se origina el desarrollo de la resistencia a los antifúngicos se hipotetiza que deben existir otros mecanismos genéticos implicados.

Para poder avanzar en estos dos campos, es imprescindible disponer de métodos eficaces y rápidos para detectar la resistencia a azoles en *A. fumigatus* y que puedan ser utilizados en estudios epidemiológicos a gran escala. Esta ventaja supondría un gran impacto en la comprensión de las poblaciones de *A. fumigatus* y la prevalencia de la resistencia a azoles. Además, es necesario desentramar como se origina y desarrolla la resistencia a antifúngicos y los distintos mecanismos genéticos que subyacen a estos complejos eventos. Por otra parte, se empiezan a detectar cepas resistentes a los azoles en otras especies de *Aspergillus* como es *A. flavus*. En este caso, la detección de mecanismos de resistencia a azoles en presenta una peculiaridad al tener 3 isoenzimas que codifican la diana de los azoles, Cyp51, existiendo A, B y C, y en el que aún queda mucho por investigar.

Con estas premisas, en esta Tesis Doctoral se plantearon tres objetivos principales que se desarrollaron en cuatro Capítulos:

Primer objetivo: Desarrollo y validación de un método de detección rápida de la resistencia a azoles en *A. fumigatus*.

Capítulo 1: Desarrollo de un método de detección de la resistencia a azoles en *A. fumigatus* para estudios de vigilancia epidemiológica.

Capítulo 2: Validación del método con muestras clínicas y ambientales en un estudio prospectivo de 3 años en el Hospital Universitario Severo Ochoa.

Segundo objetivo: Estudio de mecanismos genéticos implicados en el origen y desarrollo de la resistencia a los antifúngicos en *A. fumigatus*.

Capítulo 3: Origen y desarrollo de la resistencia a los antifúngicos. Estudio del Sistema de reparación del ADN en *A. fumigatus*.

Tercer objetivo: Estudio de mecanismos de resistencia a los azoles en *A. flavus* basados en alteraciones de las tres isoenzimas de Cyp51.

Capítulo 4: Mecanismos de resistencia a los azoles en *A. flavus*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas y genomas de *Aspergillus* y cultivo de las cepas

A lo largo de esta Tesis se han utilizado un gran número de cepas de distintas especies del género *Aspergillus*, en función de los objetivos propuestos.

3.1.1. Cepas y genomas de *A. fumigatus*

3.1.1.1. Cepas de *A. fumigatus*

En el objetivo relacionado con el desarrollo del método de cribado se emplearon un total de 104 cepas de *A. fumigatus*, tanto de origen clínico como ambiental. El gen *cyp51A* de estas cepas ya había sido previamente amplificado y secuenciado por lo que se conoce si son cepas salvajes (WT) o cepas con mecanismos de resistencia a azoles conocidos. De ellas, 50 eran WT para *cyp51A* y las 54 restantes presentaban algún mecanismo de resistencia a azoles basado en mutaciones puntuales en el gen *cyp51A* como G54 (11 cepas), M220 (6 cepas), G448S (7 cepas); o mecanismos de resistencia tipo TR como TR₃₄/L98H (22 cepas), TR₃₄/L98H/S297T/F495I (2 cepas), TR₄₆/Y121F/T289A (4 cepas) y TR₅₃ (2 cepas) (**ANEXO I**). En los experimentos de transformación para el estudio del gen *msh6* se empleó la cepa de *A. fumigatus* *akuB*^{KU80}.

3.1.1.2. Genomas de *A. fumigatus* para en el estudio del gen *msh6*

Para estudiar este objetivo se utilizaron los genomas de 144 cepas de *A. fumigatus*, de diferente origen geográfico y obtenidas a lo largo de un periodo de 20 años (de 2001 a 2021). Esta colección de genomas incluye cepas sensibles y resistentes a los azoles. En el grupo de resistentes se encuentran cepas con distintos mecanismos de resistencia como G54, M220, G448S, TR₃₄/L98H, TR₃₄/L98H/S297T/F495I, TR₄₆/Y121F/T289A y TR₅₃ (**ANEXO II**).

3.1.2. Cepas de *A. flavus*

Para este capítulo se utilizaron veinte cepas de *A. flavus* obtenidas de aislados clínicos. Catorce de estas cepas provienen de la colección de hongos filamentosos (CM) del Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. Además, se incluyeron seis cepas del Hospital Universitario Central de Asturias (TP) (**Tabla 2**). La cepa de *A. flavus* ATCC2004304 se utilizó como cepa de referencia.

3.1.3. Colección de cepas aisladas en el estudio prospectivo de 3 años

En el estudio prospectivo de 3 años realizado en el Hospital Universitario Severo Ochoa, se aislaron un total de 335 cepas de *Aspergillus* spp., de las cuales 283 procedían de aislados clínicos y un total de 52 procedían de aislados ambientales del hospital. Todas las cepas aisladas fueron identificadas morfológicamente a nivel macro y microscópico bajo procedimientos micológicos estandarizados e identificados a nivel de especie mediante métodos rutinarios del Hospital Universitario Severo Ochoa (identificación fenotípica y/o mediante identificación molecular) (**ANEXO III**).

Materiales y métodos

Tabla 2. Aislados clínicos de *A. flavus*. Tipo de muestra clínica y año de aislamiento.

Cepa	Tipo de muestra	Año de aislamiento
CM7668	Espudo	2015
CM8087	Biopsia cutánea	2016
CM9165	Broncoaspirado	2018
CM9174	Lavado broncoalveolar	2018
CM9189	Broncoaspirado	2018
CM9195	Líquido sinovial	2018
CM9228	Espudo	2018
CM9267	Biopsia	2018
CM9298	Biopsia nasal	2018
CM9326	Lavado broncoalveolar	2018
CM9329	Absceso cerebral	2018
CM9331	Lavado broncoalveolar	2018
CM9684	Desbridamiento mastoideo	2019
TP642	Espudo (fibrosis quística)	2017
TP968	Espudo (fibrosis quística)	2018
TP992	Herida quirúrgica	2018
TP1004	Espudo (fibrosis quística)	2018
TP1115	Espudo (fibrosis quística)	2018
TP1179	Espudo (fibrosis quística)	2018
ATCC2004304	Cepa de referencia	-

3.1.4. Recolección de cepas ambientales del estudio

Las muestras de aire ambiental fueron obtenidas utilizando un muestreador de aire AESAP1075 (Sampl'air Lite, AES Laboratories). Se recogieron dos muestras de 1 m³ de aire por cada día de muestreo, uno a la entrada de la habitación del hospital y otra en el centro de la misma habitación. Las muestras se recogían utilizando placas de agar Sabouraud suplementadas con Gentamicina/Cloranfenicol que se irradiaban con la muestra de aire, para posteriormente sellarlas e incubarlas a 35°C durante 5 días. La recolección de estos aislados se realizó por el Departamento de Medicina Preventiva del Hospital Universitario Severo Ochoa. El número de muestreos ambiental fue irregular debido a protocolos de limpieza, el impacto de la COVID-19 o las obras que se produjeron en el propio hospital. El número de muestras de aire a lo largo de los 3 años fue: 230 muestras de aire en 2019, 222 muestras de aire en 2020 y 317 muestras de aire en 2021.

3.1.5. Cultivo de las cepas

Independientemente de la especie, las cepas de *Aspergillus* spp. empleadas en esta Tesis se cultivaron en tubos de vidrio (25 mL) con 10 mL de medio Agar Patata Dextrosa (APD) (Oxoid, Madrid, España). Las cepas se incubaron a 37°C durante diferentes periodos de tiempo hasta que se observaba una esporulación de las cepas adecuada (entre 2 y 6 días en función de la especie). En el momento en el que la esporulación era la adecuada, se recogían las conidas empleando 5 mL de Tween 20 (0,1%) estéril que se añadía al tubo de APD, y esta solución de esporas se utilizó para realizar los diferentes experimentos a la concentración necesaria.

3.2. Técnicas microbiológicas

3.2.1. Evaluación de la susceptibilidad a antifúngicos de *Aspergillus* spp

3.2.1.1. E-TEST

La determinación de la susceptibilidad a antifúngicos empleando E-test (bioMérieux, España) se realizó con las tiras comerciales de ITC, VCZ y POS siguiendo el método previamente descrito (Pfaller *et al.*, 2003). El inóculo se ajustó a 10^5 conidias/mL, del cual se sembraron 200 μ L en las placas de agar-RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) suplementadas con 2% de glucosa. El inóculo se distribuyó uniformemente por toda la placa con un hisopo para posteriormente depositar la tira del E-test. Estos experimentos se repitieron al menos dos veces por cada cepa.

3.2.1.2. Microdilución en caldo (EUCAST)

3.2.1.2.1. Antifúngicos de uso clínico

La prueba de susceptibilidad antifúngica mediante microdilución en caldo se realizó de acuerdo al método de referencia de 9.4 del EUCAST (Guinea *et al.*, 2022). Los antifúngicos de uso clínico que se utilizaron fueron AmB (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España), ITC (Janssen Pharmaceutica, Madrid, España), VCZ (Pfizer SA, Madrid, España), POS (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ, USA), ISV (Basilea Pharmaceutica, Basel, Suiza), terbinafina (Novartis, Basel, Suiza), caspofungina (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA), micafungina (Astellas Pharma, Inc., Tokyo, Japón) y anidulafungina (Pfizer SA, Madrid, España). Las rangos de concentraciones variaron en función de los antifúngicos: de 0.03 a 16 mg/L para AmB, terbinafina y caspofungina; de 0.015 a 8 mg/L para ITC, VCZ, POS e ISV; de 0.008 a 4 mg/L para anidulafungina y de 0.004 a 2 mg/L en el caso de la micafungina. Las cepas ATCC204304 (*A. flavus*) y ATCC204305 (*A. fumigatus*) fueron utilizadas como cepas de control del método. La lectura visual de los resultados se realizó a las 24 y 48 h de incubación en atmósfera húmeda a 37°C. En el caso de las equinocandinas, el punto de corte visual era la concentración en la que se observaba un cambio visible en la morfología de las hifas de los pocillos en comparación con el pocillo control, es decir, la concentración mínima efectiva (CEM). Para la terbinafina, la AmB y los azoles, el punto de corte se establecía en la concentración antifúngica que generaba una completa inhibición visual del crecimiento, es decir la concentración mínima inhibitoria (MIC). Estos experimentos se repitieron al menos dos veces por cepa.

Los puntos de corte clínicos para interpretar los resultados obtenidos del método de susceptibilidad a antifúngicos mediante microdilución en caldo han sido establecidos por EUCAST para determinar la resistencia de *A. fumigatus* a los azoles y a la AmB. En base a estos puntos de corte se interpretaron los de otras especies del género, como en el caso de *A. flavus*. Mediante estos puntos de corte se pueden clasificar las cepas de *A. fumigatus* como sensibles (S), resistentes (R) o en ATU a los distintos antifúngicos, para AmB ($S \leq 1$, $R > 1$), ITC y VCZ ($S \leq 1$, $R > 1$, ATU = 2), ISV ($S \leq 1$, $R > 2$, ATU = 2) y para POS ($S \leq 0.125$, $R > 0.25$, ATU = 0.25) (Arendrup *et al.*, 2020). En el caso de *A. flavus*, los puntos de corte clínicos solo están definidos para ITC ($S \leq 1$, $R > 1$, ATU = 2) e ISV ($S \leq 1$, $R > 2$, ATU = 2), para nuestro estudio solo consideramos las cepas de *A. flavus* que presentaron resistencia a ITC.

Materiales y métodos

3.2.1.2.2. Azoles de uso ambiental

En este trabajo se evaluó la sensibilidad de ocho inhibidores de la demetilación (DMIs) de uso agrario. Dos de estos DMIs eran imidazoles, IMZ y PCZ, y también se usaron seis triazoles, MET, TBZ, EPZ, DFZ, BMZ y miclobutanil (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España). El estudio de sensibilidad se realizó utilizando metodología EUCAST. Las concentraciones finales de cada uno de estos antifúngicos oscilaban entre 0.06 a 32 mg/L. La lectura se realizó a las 24 y 48 h de su incubación en atmosfera húmeda a 37°C. No hay puntos de corte establecidos para estos antifúngicos por lo que se consideraban sensibles o resistentes al comparar con los rangos de CMI que se observaran para las cepas de control.

3.2.1.3. Método de cribado mediante placas de 4 pocillos

En esta Tesis se ha llevado a cabo una modificación y ampliación de un método de cribado ya descrito empleado para la detección de aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles (van der linden *et al.*, 2009). Se utilizaron placas de 4 pocillos (Nunc™ Non-Treated Multidishes, Thermo Scientific) en las que cada pocillo se rellenó con 1 mL de agar-RPMI 1640 suplementado con glucosa 2% y las concentraciones adecuadas de cada antifúngico, como se describe a continuación. Este método consiste en dos placas, una de ellas tendrá los pocillos suplementados con azoles de uso clínico (**Figura 6A**) y la otra placa se suplementará con DMIs de uso agrario (**Figura 6B**). Las placas con azoles clínicos contenían ITC (la concentración en el pocillo es de 4 mg/L), VCZ (1 mg/L), POS (0.25 mg/L) y un cuarto pocillo sin azol que se emplea como pocillo de control de crecimiento. Las concentraciones de los azoles clínicos han sido modificadas respecto al método inicial para adaptarse a la introducción del concepto de ATU, de manera que aquellas cepas que presenten una CMI al límite de la sensibilidad/resistencia puedan ser captadas en el cribado. Por otro lado, las placas con DMIs están suplementadas con IMZ (16 mg/L), PCZ (16 mg/L), MET (1 mg/L) y EPZ (32 mg/L).

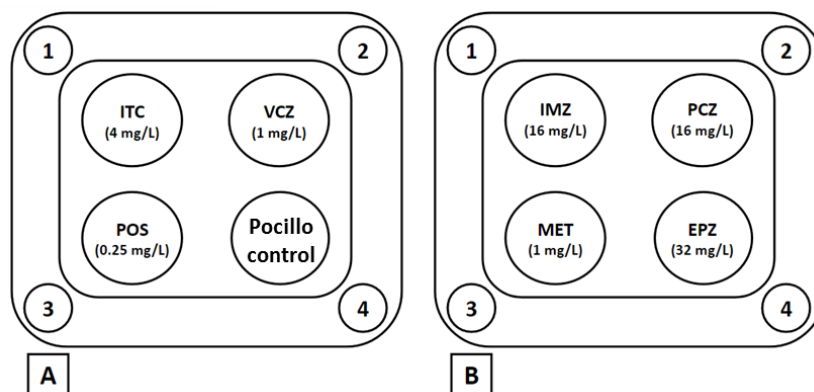


Figura 6. Placas de 4 pocillos que contienen medio RPMI-Agar y (A) antifúngicos clínicos: itraconazol (ITC, pocillo 1), voriconazol (VCZ, pocillo 2), posaconazol (POS, pocillo 3) y un pocillo como control de crecimiento control sin azol (pocillo 4), y (B) DMIs: imazalil (IMZ, pocillo 1), procloraz (PCZ, pocillo 2), metconazol (MET, pocillo 3) y epoxiconazol (EPZ, pocillo 4).

Preparación de las placas de cribado:

Los volúmenes que se mencionan en las instrucciones están estimados para producir 45 placas:

1. Añadir 0.75 g de Agar Bacteriológico, Agar No. 1 (Oxoid, Madrid, España) y 25 mL de agua destilada a 8 botellas de vidrio de 50 mL (4 botellas para los azoles clínicos y otras 4 para los DMIs).

2. Mezclar en un agitador magnético durante 5 min.
3. Autoclavar las botellas para esterilizar el medio con agar.
4. Atemperar el medio RPMI antes de mezclar con el agar preparado.
5. Preparar las soluciones madre de los antifúngicos (1600 mg/L de los azoles clínicos y 1000 mg/L de los DMIs, diluidos en DMSO) mientras se autoclava el medio.
6. Una vez autoclavado el medio RPMI, dejar que baje la temperatura al menos hasta los 60°C.
7. Añadir 25 mL de medio RPMI y el volumen correspondiente de cada antifúngico a añadir a su botella de vidrio correspondiente:
 - a. Los volúmenes que hay que añadir de los azoles clínicos son 125 µL de la solución madre de ITC, 32 µL de la solución madre de VCZ y 8 µL de la solución madre de POS.
 - b. Los volúmenes que hay que añadir de los DMIs son 800 µL de la solución madre de IMZ y PCZ, 50 µL de la solución madre de MET y 1600 µL de la solución madre de EPZ.
8. Mezclar adecuadamente y transferir 1 mL al pocillo correspondiente.

Las placas fueron inoculadas con un hisopo previamente empapado en Tween 20 (0.1%) para poder recolectar conidias de las placas con la cepa en estudio. Las placas fueron incubadas en atmósfera húmeda a 37°C durante 48 h, tiempo tras el cual se procedía a la lectura visual de crecimiento en comparación con el pocillo de control de crecimiento. Las cepas se consideraron resistentes a cada antifúngico cuando presentaron un crecimiento similar al del pocillo control en los pocillos suplementados con azoles. Las cepas consideradas como resistentes se incluyeron en la confirmación de la susceptibilidad a azoles mediante microdilución (EUCAST) y posterior confirmación por amplificación y secuenciación del gen *cyp51A*.

3.2.2. Caracterización fenotípica de los mutantes $\Delta msh6$

Para poder caracterizar los mutantes $\Delta msh6$ (T3 y T6) obtenidos de la transformación de la cepa parental *akuB*^{KU80} al eliminar el gen *msh6* se llevaron a cabo una serie de experimentos en las cepas que se expusieron a distintas condiciones de estrés y así determinar si había alguna diferencia con respecto a la cepa parental.

Se emplearon placas con 20 mL de medio mínimo-agar bacteriológico Nº1 (Oxoid, Madrid, España) suplementadas con distintos compuestos y a distintas condiciones. En todos los casos, y para cada condición, se inocularon cuatro concentraciones decrecientes de conidias (10^4 , 10^3 , 10^2 y 10) de las cepas $\Delta msh6$ (T3 y T6) y *akuB*^{KU80}, pudiendo analizar así si existían diferencias en características del crecimiento entre las mismas.

Para poder evaluar la supervivencia de las cepas a distintas temperaturas se llevó a cabo el crecimiento de estas cepas a 37°C, 45°C, 50°C y 60°C. Para evaluar el crecimiento de estas cepas ante distintos tipos de estrés se suplementaron las placas de medio mínimo con diferentes compuestos. Para determinar la resistencia al estrés oxidativo las placas se suplementaron con menadiona (0.005% y 0.02%), y para determinar la resistencia a estrés de pared celular las placas se suplementaron con Rojo Congo (Sigma Aldrich, Madrid, España) (10 mg/L, 50 mg/L y 100 mg/L) y Calcofluor White (Sigma Aldrich, Madrid, España) (10 mg/L y 100 mg/L). En todos los

Materiales y métodos

casos las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 h en oscuridad y se realizaron al menos dos réplicas de los experimentos por cepa.

3.2.3. Experimentos de mutagénesis

Los experimentos de mutagénesis con las cepas $\Delta msh6$ (T3 y T6) y la cepa parental (*akuB*^{KU80}) se realizaron en placas de medio mínimo suplementadas con distintos antifúngicos a concentraciones: 2 mg/L de POS, 4 mg/L de VCZ, 32 mg/L de PCZ, BNY, BCL o AZB (estos 4 últimos compuestos fueron comprados en Sigma-Aldrich Química, Madrid, España). Estas placas se inocularon con un total de 10⁹ conidias de las cepas a estudio y se incubaron a 37°C durante 14 días, realizando observaciones diarias para detectar si crecían colonias resistentes. En el caso de crecimiento, la colonia era aislada en una nueva placa de medio mínimo suplementada con el antifúngico en el que hubiera crecido anteriormente, de manera que si volvía a crecer confirmábamos la resistencia del aislado y se procedía al análisis de los genes implicados en la resistencia a cada antifúngico.

3.3. Modelo de interacción con el huésped

3.3.1. Análisis de la supervivencia en el modelo alternativo de *Galleria mellonella*

Las diferencias de virulencia de las cepas $\Delta msh6$ o (T3 y T6) y la cepa parental *akuB*^{KU80}, se realizó con un análisis de la supervivencia empleando el modelo de infección alternativo con *G. mellonella* (TruLarv™ BioSystems Technology, UK). Las larvas fueron infectadas con las cepas a estudio mediante un protocolo ya descrito con anterioridad (Gomez-Lopez *et al.*, 2014). Se hicieron grupos de 20 larvas (de 0.2 a 0.3 g de peso) para cada condición del estudio: (i) inóculos de 10³, (ii) inóculos de 10⁴ conidias de cada cepa, (iii) larvas inoculadas solo con PBS, como grupo control y (IV) grupo de larvas sin ningún inóculo como control de viabilidad de las larvas. Las larvas se incubaron a 37°C durante 8 días, anotando el conteo diario de la mortalidad. Este experimento fue realizado al menos 3 veces y los resultados fueron representados como los valores medios de los tres experimentos.

3.4. Técnicas de biología molecular

3.4.1. Extracción de ADN de hongos filamentosos

La extracción del ADN de *Aspergillus*, se realizó a partir de un micelio crecido en placas con medio líquido. Para ello se utilizaron placas Petri (5 cm de diámetro) conteniendo medio GYEP líquido (2% de glucosa, 0.3% extracto de levadura, 1% peptona) (Difco, Soria Melguizo, Madrid, España). Las placas se inocularon con 50 μ L de una solución de esporas de cada cepa que se incubaba durante 24 h a 37°C. El micelio resultante, se depositó sobre un papel Whatman N°1, y una vez seco se introdujo en un tubo falcon que contenía 6 bolitas de vidrio de 4mm (Merck, Madrid, España). Tras congelación rápida en nitrógeno líquido el micelio se pulverizó mecánicamente utilizando un vortex a máxima velocidad. Posteriormente el ADN genómico se extrajo con el método del fenol-cloroformo descrito previamente (Tang *et al.*, 1992).

3.4.2. Identificación molecular de las cepas

Todas las cepas empleadas en esta Tesis fueron identificadas molecularmente mediante la amplificación por PCR y secuenciación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 and y la porción del gen de la β -tubulina (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008).

3.4.3. Cebadores

3.4.3.1. Cebadores de los genes *cyp51* de *A. flavus*

Los genes *cyp51A*, *cyp51B* y *cyp51C* de las cepas de *A. flavus* empleadas en el estudio de mecanismos de resistencia a azoles en esta especie fueron amplificados y secuenciados usando los cebadores descritos en la **tabla 3**. Algunos de los cebadores usados fueron previamente descritos en otro trabajo (Paul *et al.*, 2015).

3.4.3.2. Cebadores del gen *cyp51A* de *A. fumigatus*

El promotor del gen *cyp51A*, así como su región codificante, fueron ampliados y secuenciados empleando los cebadores descritos previamente (Mellado *et al.*, 2007).

Tabla 3. Cebadores usados para amplificar y secuenciar los genes *cyp51A*, *cyp51B* y *cyp51C* de *A. flavus*, y cebadores empleados en la RT-PCR.

Uso	Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Referencia
<i>cyp51A</i> gen y promotor	Afla_Cyp51A_F1	CAAGAACAGCCTGCACAGAG	(Paul <i>et al.</i> , 2015)
	Afla_Cyp51A_R1	GGGTGGATCAGTCTTATTA	
	Afla_Cyp51A_F2	GCAATCATCGTCCTAAATC	
	Afla_Cyp51A_R2	CTGTCCATTCTTGTAGGTA	
	Afla_Cyp51A_F3	GCATGAGGGAGATCTATATG	
	Afla_Cyp51A_R3	CCTATAATTGCTGGTTTCG	
	Afla_Cyp51A_F4	TGAAGCTATTCAATGTAGAC	
	Afla_Cyp51A_R4	ACTGCTGATGGTGTGCTAAG	
RT_PCR	Cyp51A_RT_F	TAAATCTGTTGCGCCAGCTC	Este trabajo
	Cyp51A_RT_R	ATCTCCTCGGCATTGACATC	
<i>cyp51B</i> gen y promotor	Afla_Cyp51B_F1	ATGGGCATCCTAGCTGCATTC	Este trabajo
	Afla_Cyp51B_R1	GGCGGTGTATATGGTAATCTC	
	Afla_Cyp51B_F2	CCCTTGGTATTTTCATTGGTTCCC	
	Afla_Cyp51B_R2	TTTCATGTTACCATGGGCCC	
	Afla_Cyp51B_F3	TTTCATGTTACCATGGGCCC	
	Afla_Cyp51B_R3	TTCAGAGCTAACAGCGATGGC	
	Afla_Cyp51B_F4	CGGAAGAACATTTCCCTGATCC	
	Afla_Cyp51B_R4	CGTCTGGCAATATCATGCAC	
RT_PCR	Cyp51B_RT_F	CGGAAGTACCATCAGCTATG	Este trabajo
	Cyp51B_RT_R	ACACAGGAGTTGTAAGTGGG	
<i>cyp51C</i> gen y promotor	*CypC_Af1_F	CAATGGTGCTGACAAACCTG	(Paulet <i>et al.</i> 2015)
	*CypC_Af2_R	CAAAGGAGCGACACATAAG	
	AflaCYP51CF2	GGTAATGTCTGGTCATAGG	
	AflaCYP51CR2	ATGAGCTTGGGAATTGGG	
	AflaCYP51CF3	CGAATTCATCCTCAATGG	
	AflaCYP51CR3	GTCTCTCGGATCACATT	
	AflaCYP51CF4	GGAActTACCAAGAGCA	
	*CypC_Af8_R	GCTCATCATAATGCATGAGG	
RT_PCR	Cyp51C_RT_F	CGCATGCTGAACAAGACTAG	Este trabajo
	Cyp51C_RT_R	TCCGCGTTCACGTCTTTTCAG	

Materiales y métodos

3.4.3.3. Cebadores de los genes *cytB*, *sdhB*, *bos1* y *benA*

Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación de los genes *cytB*, *sdhB* y *benA* fueron descritos en un estudio previo (Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021) o, en el caso de *bos1* se diseñaron para este trabajo (tabla 4).

Tabla 4. Cebadores usados para amplificar y secuenciar los genes *cytB*, *sdhB*, *bos1* y *benA*

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Uso
<i>benA</i>	benA_F1	CGATCTCGAGCCTGGTACC	PCR y secuenciación
	benA_R2	GACAGCACGGAAAGAGTGAG	
<i>cytB</i>	CytB_F1	CACCTAGTGTATTAGAAGC	PCR
	CytB_R2	CGTGTTTTGCACCTAATTGC	
	CytB_FS1	GAGAGACGTAAATAATGG	Secuenciación
	CytB_RS2	GGTCTGAACTGTACTCCTC	
<i>sdhB</i>	sdhB_F1	GTCATCAGAATCAAGAACG	PCR y secuenciación
	sdhB_R2	GCAAATGTAATGCAACATGAC	
<i>bos1</i>	Bos1_F	CAAGTGCGTGAAATTGCGGC	PCR y secuenciación
	Bos1_R	GTACCTACTTCTTGGAATC	

3.4.4. Condiciones de PCR y secuenciación

3.4.4.1. Amplificación de los genes *cyp51* de *A. flavus*

Los parámetros específicos de amplificación de los genes *cyp51* de *A. flavus* diferían únicamente en las temperaturas de anillamiento. Las condiciones generales de amplificación eran 1 ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a una temperatura concreta según los pares de cebadores a usar, 2 minutos a 72°C y un ciclo final de 5 minutos a 72°C.

Las temperaturas concretas de la fase de anillamiento para los cebadores de *cyp51A* fueron: 54°C para F1 y R1, y 55°C para F2 y R2, F3 y R3, F4 y R4. En el caso de los cebadores de *cyp51B*: 60°C para F1 y R4. Y, por último, para los cebadores de *cyp51C*, 58°C para 1_F y 2_R, 54°C para 3_F y 4_R, 52°C para 5_F y 6_R y 54°C para 7_F y 8_R.

3.4.4.2. Amplificación del gen *cyp51A* de *A. fumigatus*

El gen *cyp51A* de *A. fumigatus* se amplificó utilizando los parámetros descritos con anterioridad en nuestro grupo (Mellado *et al.*, 2007). Un ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C para el gen de *cyp51A* y 56°C para el promotor, 2 minutos a 72°C y un ciclo final de 5 minutos a 72°C.

3.4.4.3. Amplificación de los genes *cytB*, *sdhB*, *bos1* y *benA* de *A. fumigatus*

Los genes *cytB*, *sdhB* y *benA* de *A. fumigatus* se amplificaron utilizando parámetros descritos previamente en nuestro grupo (Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021) o descritos en este trabajo. En resumen: un ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C para el gen *sdhB*, a 56°C para el gen *cytB*, a 61°C para el gen *bos1* y a 60°C para *benA*, 2 minutos a 72°C y un ciclo final de 5 minutos a 72°C.

3.4.4.4. Electroforesis en gel, purificación y secuenciación

Tras la amplificación se procedió a una comprobación mediante electroforesis en gel para observar si se había realizado con éxito. Se utiliza un gel de agarosa (Sigma) 0.8% preparado en

tampón TAE (1X) (tris base 0,04 M, ácido acético glacial y EDTA 1 mM) empleando como agente intercalante Midori Green (NIPPON Genetics EUROPE GmbH). Para poder comparar el tamaño del amplicón generado utilizó la escalera molecular de 1 kB (Promega). Una vez comprobado, se realizó la purificación de los productos amplificados mediante Illustra ExoProStar 1-step (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido) y se secuenciaron empleando el kit Big-Dye (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Microbiología.

3.4.5. Extracción de ARN, RT-PCR y obtención de ADNc

Para el estudio de la expresión de los genes *cyp51* de *A. flavus* fue necesario extraer ARN fúngico. Para ello necesitábamos tener una concentración de 10^6 conidas/mL en un volumen total de 100 mL de medio mínimo líquido que se incubó durante 18 h a 37°C en agitación a 150 rpm. Una vez crecido el micelio se recogió y secó con papel miracloth (CalbiochemR, Merck Millipore, España). Una vez completamente seco se congeló en nitrógeno líquido para llevar a cabo la pulverización con un mortero previamente enfriado a -70 °C. El ARN del micelio pulverizado se obtuvo siguiendo las instrucciones del fabricante y usando el RNeasy plant minikit (Qiagen, Madrid, España). Para obtener el ADNc se realizó la transcripción reversa (RT-PCR) empleando el kit comercial ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EEUU). La mezcla de la reacción de la PCR se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (1 µg de RNA, 1 µg/mL de los cebadores (dT), 4.5 µL de agua libre de RNAsa, 4 µL del tampon de reacción ImProm-II (5X), 4 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTPs, 0.5 µL de inhibidores de la ribonucleasa, rRNasin® (Promega, Madison, WI, EEUU), y 1 µL de la transcriptasa reversa, ImProm-IITM (Promega, Madison, WI, EEUU), quedando en un volumen final de 20 µL. La RT-PCR se llevó a cabo con los siguientes parámetros: 5 min a 25°C, 60 min a 42°C y 15 min a 70°C. Finalmente, el ADNc resultante se diluyó en agua libre de RNAsa (1:5) para ser empleada en la PCR cuantitativa (qPCR).

3.4.6. PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR se llevó a cabo para determinar las diferencias de expresión relativa de los genes *cyp51* entre aislados de *A. flavus* sensibles y resistentes a azoles. El gen β -tubulina de *A. flavus* se empleó como gen constitutivo de referencia. Los cebadores específicos para la qPCR están descritos en la tabla 3. La mezcla de la reacción de la qPCR se realizó con SensiMix SYBR-Hi carboxy-X-rhodamine (Bioline, Barcelona, España). Las condiciones de la PCR fueron 10 min a 95°C y 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 5 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C. Cada experimento se realizó por triplicados con ARN aislado de dos replicas biológicas distintas. Los cambios de expresión génica fueron calculados con el método $2^{-\Delta Ct}$ y normalizado con el gen de la β -tubulina (Schmittgen y Livak, 2008). Los cambios de expresión fueron calculados en relación con *cyp51A* de la cepa de *A. fumigatus* de referencia ATCC20044304.

3.4.7. Genotipado de *A. fumigatus* con el método TRESPERG

Las cepas de *A. fumigatus* aisladas en el estudio prospectivo del Hospital Universitario Severo Ochoa fueron genotipadas siguiendo el método de TRESPERG previamente descrito nuestro grupo (García-Rubio *et al.*, 2018).

Materiales y métodos

3.4.8. Análisis de la secuenciación del genoma completo (WGS)

3.4.8.1. Análisis de genes implicados en los mecanismos de reparación del ADN

La búsqueda de mutaciones en genes implicados en los MMR se realizó utilizando una colección de 163 genomas completos de *A. fumigatus*. Parte de ellos se obtuvieron secuenciando cepas de nuestro laboratorio utilizando Nextera® XT Library Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU) (Gonzalez-Jimenez et al. 2021; Garcia-Rubio et al., 2018). Algunos genomas se descargaron de bases de datos disponibles de forma pública. A los datos que se obtuvieron en su momento sobre susceptibilidad a azoles y mecanismos de resistencia a azoles de las cepas se les añadieron posteriormente datos sobre la resistencia a otros antifúngicos no azólicos (Gonzalez-Jimenez et al., 2021). Se definieron cuatro grupos de cepas de *A. fumigatus* en base a su susceptibilidad o resistencia y sus mecanismos de resistencia a antifúngicos azólicos y no azólicos. Posteriormente se procedió al análisis de las mutaciones responsables de cambio de aminoácido en 4 genes pertenecientes al sistema MMR: *msh2*_ Afu3g09850, *msh6*_ Afu4g08300, *pms1*_ Afu2g13410 y *mlh1*_ Afu5g11700.

3.4.9. Generación de cepas $\Delta msh6$ de *A. fumigatus*

3.4.9.1. Construcción del vector

Para poder determinar el papel de Msh6 se llevó a cabo la eliminación del gen *msh6* de la cepa de *A. fumigatus* *akuB*^{KU80} y se reemplazó por el marcador de resistencia a piriamina (*prt*) (Figura 7). El cassette de transformación fue generado utilizando PCR de fusión. Las condiciones de la amplificación fueron 2 minutos a 98°C y después 30 ciclos de 30 segundos a 98°C, 15 segundos a 55°C y 2min a 98°C con una elongación final de 7 minutos a 68°C. La mezcla de la reacción de PCR fue realizada usando PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara Bio USA, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando los cebadores p1 y p2 para la amplificación del fragmento 5', p4 y p6 para el extremo 3' y p3 y p5 para el inserto de *prt* (Tabla 5). Para la amplificación del cassette de fusión final las condiciones de PCR fueron de 1 min a 95°C, luego 35 ciclos de 30 segundos a 95°C seguidos de 6 minutos a 68°C, terminando con un paso final de 6 minutos a 68°C. Los cebadores usados para amplificar el cassette completo fueron p1 y p6 (Tabla 5). La PCR fue realizada usando Advantage® Polymerase Mix (Takara Bio USA, Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante, mezclando equitativamente los tres extractos para conformar el cassette. La localización de los cebadores y el diseño del vector de fusión se muestran en la figura 7.

Tabla 5. Cebadores empleados en la construcción del cassette $\Delta msh6$.

Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Amplicón
p1	AGCTCGACTTCGATACAGAAGCCTCCAATG	1300 pb
p2	GTTACCAATGGGATCCCGTAATCAATTGCCCGTTTGTAGTGGTGGTATCGGTATGGCACTC	
p3	GAGTGTCCATACCGATACCACCACTAAACGGGCAATTGATTACGGGATCCCATTGTAAC	1900 pb
p5	CATACTCCCCTAGAACCCCTTGACGAAGCAATGGCCTCTTGCATCTTTGTTTGTATTATA	
p4	TATAATACAAACAAAGATGCAAGAGGCCATTGCTTCGTCAAGGGTTCTAGTGGGAGTATG	1400pb
p6	CCTTTATCATCGTGCGCCTCCTATTTCTCC	
p7	CCAGTGTGCTACAGCTTACCCAAGTAAGAG	4600 pb
P8	ACGCCCTCTCACTGTCACTATATCTACTGC	

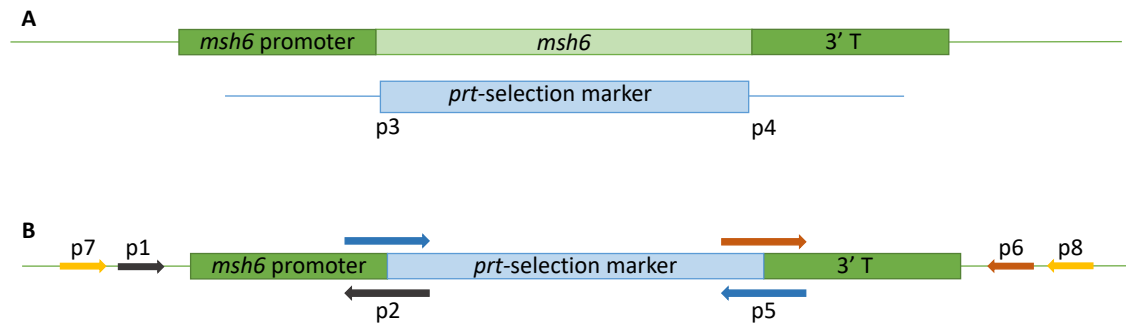


Figure 7. Construcción del cassette de fusión para la delección del gen *msh6* de *A. fumigatus* en la cepa *akuB^{KU80}*. El gen deleccionado *msh6* está reflejado en color verde claro y el marcador de selección de piritiamina en azul claro. (A) Mapa de la cepa parental *msh6*-WT y el marcador de selección de piritiamina (*prt*). (B) Diseño del cassette de fusión para la cepa de *A. fumigatus* $\Delta msh6$.

3.4.9.2. Transformación de *A. fumigatus*

La transformación de la cepa de *A. fumigatus* se logró mediante el uso de protoplastos, como ya se describió con anterioridad (Oakley *et al.*, 2006). Los transformantes obtenidos se seleccionaron en placas de medio mínimo suplementadas con 0.5 g/mL de piritiamina (Sigma Aldrich, Madrid, España). Los mutantes se confirmaron posteriormente mediante PCR y secuenciación empleando los cebadores p7 y p8 (**figura 7, tabla 5**) y los mutantes confirmados se nombraron con la letra T seguida de un número.

3.5. Técnicas bioinformáticas

3.5.1. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas a lo largo de la Tesis, tanto de los genes *cyp51* de *A. flavus*, como de los genes *cyp51A*, *sdhB* y *benA* de *A. fumigatus* o de los genes implicados en el método TRESPERG se editaron y ensamblaron usando el paquete de software Lasergene (ADNStar Inc., Madison, WI). La traducción a proteínas de las secuencias de ADN se realizó con el paquete de SeqBuilder (ADNStar Inc., Madison, WI).

Las secuencias de los distintos genes estudiados se compararon con los genes de cepas de referencia para identificar posibles mutaciones. En el caso del gen *cyp51A* de *A. fumigatus*, la cepa de referencia es CBS 144.89 (NCBI accession number AFUB_063960). Para los genes *cyp51* de *A. flavus*, las cepas de referencia son: *A. flavus* NRRL3357 (Cyp51A, NCBI accession number XP_002375123; Cyp51B, NCBI accession number XP_002379130; Cyp51C, NCBI accession number XP_002383931), *A. flavus* AF70 (Cyp51A, NCBI accession number KOC13200; Cyp51B, NCBI accession number KOC13803; Cyp51C, NCBI accession number KOC15064) y *A. oryzae* RIB40 (Cyp51A, NCBI accession number XP_001819419; Cyp51B, NCBI accession number XP_001822241; Cyp51C, NCBI accession number XP_001824687). Y, por último, para los genes *sdhB*, *cytB*, *bos1* y *benA* de *A. fumigatus* se utilizó cepa de referencia A1163 (SdhB, BenA, CytB y Bos1 NCBI accession number DS499597.1).

3.5.2. Análisis de diversidad genotípica

El análisis de diversidad genotípica se realizó como se ha descrito previamente (García-Rubio *et al.*, 2016) y se representó gráficamente usando un minimum spanning tree (MST) creado con la combinación de los datos del genotipado TRESPERG utilizando el software de BioNumerics (version 6.0.1) (Applied Maths, Belgium).

Materiales y métodos

3.5.3. Análisis filogenético

3.5.3.1. Árbol filogenético de los genes *cyp51* de *A. flavus*

El árbol filogenético fue obtenido mediante un análisis de máxima verosimilitud (Hess y Goldman, 2011) usando el programa InfoQuestTH FP, versión 4.5 (Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA, USA). Las secuencias de proteínas de Cyp51A, Cyp51B y Cyp51C de *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* AF70 y *A. oryzae* RIB40 se compararon con las secuencias de aminoácidos derivadas de las proteínas Cyp51 de otros hongos filamentosos: *A. fumigatus* AfCyp51A; (NCBI accession number AAK73659); *A. fumigatus* AfCyp51B (NCBI accession number AAK73660); *A. terreus* AtCyp51A (NCBI accession number EAU33678); *A. terreus* AtCyp51B (NCBI accession number EAU36124); *Fusarium graminearum* FgCyp51A (NCBI accession number ESU09049); FgCyp51B (NCBI accession number EWZ31250) y FgCyp51C NCBI accession number ESU17718); *Fusarium oxysporum* FoCyp51A (NCBI accession number RKK94077), FoCyp51B (NCBI accession number EWY82136) y FoCyp51C (NCBI accession number EWY82136); *Penicillium italicum* PiCyp51 (NCBI accession number CAA89824); *Penicillium digitatum* PdCyp51 (NCBI accession number CAD277993); *Oculimacula yallundae* OyCyp51 (NCBI accession number AAG44831); *Oculimacula acufiformis* OaCyp51 (NCBI accession number AAF18468); *Neurospora crassa* NcCyp51 (NCBI accession number EAA34813.); *Erysiphe necator* EnCyp51 (NCBI accession number AAD55135).

3.5.3.2. Análisis filogenético de los genes implicados en el MMR

Las secuencias de todos los genomas analizados se alinearon utilizando como referencia el genoma de *A. fumigatus* CBS144.89/A1163 (Número de acceso de GenBank ABDB00000000.1) para buscar mutaciones en los genes *mlh1*, *pms1*, *msh2* y *msh6*, y determinar si existía una relación entre las mutaciones en los genes implicados en el MMR y las mutaciones correspondientes a los distintos mecanismos de resistencia a azoles en *A. fumigatus*.

3.6. Estadística

3.6.1. Análisis estadístico de la virulencia (*G. mellonella*)

Los análisis estadísticos de los resultados de los ensayos de virulencia con *G. mellonella* se realizaron con el paquete de programas GraphPad Prism (versión 11.0) (SPSS Inc., EEUU). Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier se analizaron mediante la prueba log-rank (Mantel-Cox) para determinar su significancia. Un p valor < 0.01 se consideró significativo.

4. RESULTADOS

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Desarrollo de un método de detección de la resistencia a azoles en *A. fumigatus* para estudios de vigilancia epidemiológica

4.1.1. Evaluación de la sensibilidad a los azoles de uso clínico

Las cepas de *A. fumigatus* presentaron un amplio rango de valores de CMI a los distintos azoles clínicos empleados en el estudio (**Tabla 6**). Todas las cepas que no presentaban modificaciones en *cyp51A* (WT) fueron sensibles a todos los azoles clínicos. Los perfiles de las cepas resistentes a azoles, variaron según la modificación que presentaban en *Cyp51A*. Las cepas que tenían la mutación G54 fueron resistentes a ITC y POS, pero sensibles a VCZ, las cepas con mutaciones tipo M220 fueron resistentes a ITC, con CMIs variable a VCZ y POS, y por último, las cepas con mutaciones G448S presentaron resistencia a VCZ y diferentes CMIs para ITC y POS. Todas las cepas resistentes a azoles que tenían mecanismos de resistencia tipo TR en el promotor del gen *cyp51A*, con mutaciones o no en *Cyp51A*, mostraron un perfil común de multiresistencia a azoles.

Tabla 6. Rangos de concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) de los aislados de *A. fumigatus* a azoles de uso clínico y a DMIs. Los aislados de *A. fumigatus* se agruparon en función de sus perfiles de sensibilidad a azoles y a los distintos mecanismos de resistencia a azoles basados en modificaciones en *Cyp51A* que subyacen.

Susceptibilidad a azoles / Modificaciones en <i>Cyp51A</i> (#)	Rangos de CMIs a azoles clínicos (mg/L)			CMIs a DMIs (mg/L)			
	ITC	VCZ	POS	Imidazoles		Triazoles	
				IMZ	PCZ	MET	EPZ
S a azoles							
WT (50)	0.25-0.5	0.125-0.5	0.06-0.125	0.125-0.5	0.125-0.5	0.125-0.5	2-4
R a azoles: Mutaciones puntuales							
G54 (11)	>8	0.25-0.5	1->8	0.06-0.125	0.125-0.25	0.06-0.125	0.5-2
M220 (6)	>8	0.25-1	0.25-2	0.25-2	0.25-1	0.25-1	4-16
G448S (7)	1-2	>8	0.25-1	0.5-2	1-2	1-32	8-32
R a azoles: Integraciones tipo TR							
TR ₃₄ /L98H (22)	>8	4-8	0.5-1	1-8	2-8	1-2	>32
TR ₃₄ /L98H/S297T/F495I (2)	>8	4-8	0.5-1	8	>32	4-16	>32
TR ₄₆ /Y121F/T289A (4)	2-4	4->8	0.5	32->32	16->32	8-16	>32
TR ₅₃ (2)	>8	2-4	0.5-1	2-8	2-8	2	>32

Número de aislados. Abreviaturas: CMI, concentración mínima inhibitoria; DMI: inhibidores de la demetilación; S, sensible; R, resistente; TR, Tandem Repeat; ITC: Itraconazol; VCZ: Voriconazol; POS: posaconazol; IMZ, Imazalil; PCZ, prochloraz; MET, metconazol; EPZ, epoxiconazol.

4.1.2. Evaluación de la sensibilidad a DMIs de uso agrario

Los rangos de CMIs de las cepas de *A. fumigatus* a cada DMI evaluado se muestran en la **tabla 6**. La mayoría de las cepas resistentes a los azoles que presentaban mecanismos de resistencia basadas en integraciones tipo TR en el promotor del gen *cyp51A* presentaban mayores CMIs a todos los DMIs utilizados en el estudio. A pesar de que se trata de un fenotipo observado de manera general entre estos aislados, se observan algunas diferencias en función de los diferentes mecanismos de resistencia.

Las cepas que presentan mutaciones G54 mostraron una hipersusceptibilidad a todos los DMIs estudiados, independientemente de que fueran imidazoles o triazoles. Las cepas con la mutación G448S mostraron mayor sensibilidad frente a los imidazoles que a triazoles. Entre las cepas con mecanismos tipo TR, se observaron diferentes perfiles de susceptibilidad en función del TR que presentaban: aquellas cepas con mecanismos de resistencia a azoles tipo TR₃₄/L98H o TR₅₃ tenían CMI's muy elevadas solo para EPZ, mientras que las cepas con mecanismos tipo TR₃₄/L98H/S297T/F495I presentaron CMI's muy elevadas frente a los triazoles y al imidazol PCZ. Sin embargo, las cepas con mecanismos TR₄₆/Y121F/T289A presentaron CMI's muy elevadas frente a todos los DMIs estudiados, triazoles e imidazoles.

4.1.3. Patrón de crecimiento del método de cribado de las placas de 4 pocillos

Todas las cepas de *A. fumigatus* sensibles a los azoles crecieron únicamente en el pocillo control que no contenía ningún azol. Sin embargo, las cepas de *A. fumigatus* resistentes a los azoles mostraron diferentes patrones de crecimiento en los pocillos suplementados con diferentes azoles. Estos patrones de crecimiento en las placas de cribado coincidían con los resultados obtenidos en la evaluación de la susceptibilidad antifúngica de estas cepas, de manera que era posible asociar patrones de crecimientos concreto a mecanismos de resistencia a azoles específicos (**Tabla 7**).

Tabla 7. Resultados del cribado con el método desarrollado de los aislados de *A. fumigatus* a azoles clínicos y DMIs (imidazoles y triazoles).

Susceptibilidad a azoles / Modificaciones en Cyp51A (#)	Resultados del cribado						
	Azoles clínicos			DMIs			
	ITC	VCZ	POS	Imidazoles		Triazoles	
				IMZ	PCZ	MET	EPZ
S a azoles							
WT (50)	-	-	-	-	-	-	-
R a azoles: Mutaciones puntuales							
G54 (11)	+	-	+	-	-	-	-
M220 (6)	+	V	V	-	-	-	-
G448S (7)	V	+	V	-	-	+	-
R a azoles: Integraciones tipo TR							
TR ₃₄ /L98H (22)	+	+	+	-	-	+	+
TR ₃₄ /L98H/S297T/F495I (2)	+	+	+	-	+	+	+
TR ₄₆ /Y121F/T289A (4)	V	+	+	+	+	+	+
TR ₅₃ (2)	+	+	+	-	-	+	+

Número de aislados. Abreviaturas: DMI: inhibidores de la demetilación; S, sensible; R, resistente; V, variable; TR, Tandem Repeat; ITC: Itraconazol; VCZ: Voriconazol; POS: posaconazol; IMZ, Imazalil; PCZ, prochloraz; MET, metconazol; EPZ, epoxiconazol.

Solo dos grupos de cepas resistentes a azoles presentaban particularidades en cuanto a los perfiles de susceptibilidad a azoles clínicos. Las cepas con mutaciones tipo M220 mostraban un crecimiento variable en los pocillos suplementados con VCZ y POS, mientras que las cepas con mutaciones tipo G448S presentaban un crecimiento variable en los pocillos suplementados con ITC y POS, resultado que también se observa en el rango de CMI's al evaluar su susceptibilidad a estos azoles. El patrón de crecimiento a azoles clínicos y DMIs que se obtuvo para cada tipo de

Resultados

mecanismo de resistencia a azoles se muestra en la **figura 8**. Una de las limitaciones de este estudio es que el rango de CMI_s y el patrón de crecimiento observado en este método de las cepas que presentan mecanismos de resistencia a azoles tipo TR₃₄/L98H y TR₅₃ son muy parecidos, por lo que no presentan patrones distintivos que permitan discriminar visualmente entre un mecanismo u otro, así que siempre será necesario llevar a cabo la confirmación mediante métodos moleculares, secuenciando el gen *cyp51A* y su promotor.

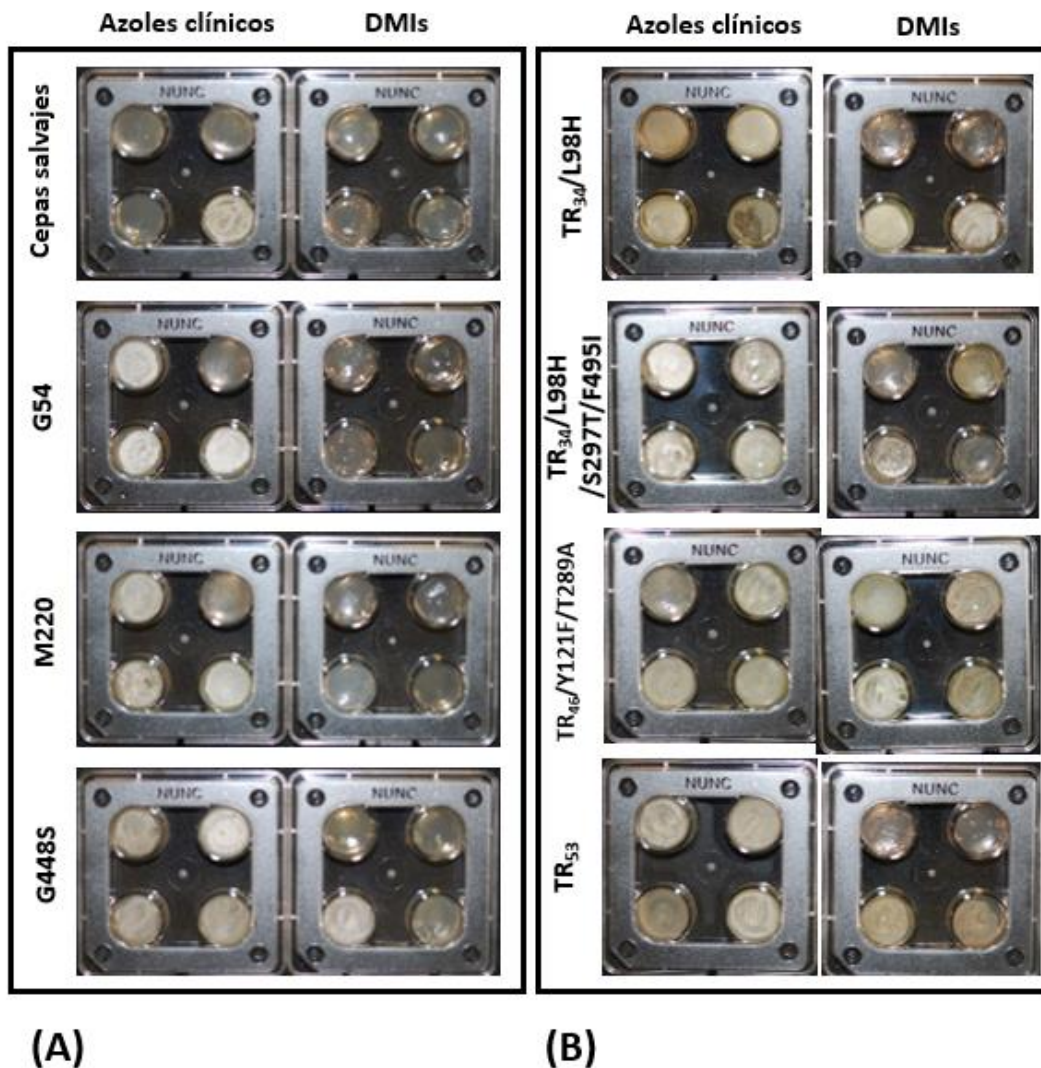



Figura 8. Placas de cribado (azoles clínicos y DMIs) inoculadas con cepas de *A. fumigatus* con diferentes mecanismos de resistencia a azoles basados en modificaciones en Cyp51A. Patrones de crecimiento para cepas de *A. fumigatus* con mutaciones puntuales en Cyp51A (A) patrones de crecimiento par cepas con mecanismos de resistencia a azoles tipo TR (B).


4.1.4. Publicación de los resultados

La descripción del método fue objeto de una publicación en la revista *Mycoses* en 2022 y el contenido de la publicación se resume a continuación:


Artículo: Lucio J, Gonzalez-Jimenez I, Garcia-Rubio R, Cuetara MS, Mellado E. 2022. An expanded agar-based screening method for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*. Feb;65(2):178-185. doi: 10.1111/myc.13400. IF: 4.9. Mycology 8/30 (Q2); Dermatology 10/70(Q1) (**Anexo IV**).



Mycoses
Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases

ORIGINAL ARTICLE |  Full Access

An expanded agar-based screening method for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*

Jose Lucio, Irene Gonzalez-Jimenez, Rocio Garcia-Rubio, Maria Soledad Cuetara, Emilia Mellado 

First published: 22 November 2021 | <https://doi.org/10.1111/myc.13400>

En este trabajo se llevó a cabo el diseño y desarrollo de una expansión del método de detección descrito previamente que se basa en el uso de placas de cuatro pocillos que contienen agar suplementado con azoles de uso clínico: itraconazol, voriconazol, posaconazol y un pocillo como control de crecimiento. En este nuevo método las concentraciones de voriconazol y posaconazol se modificaron para ajustarse a los últimos puntos de corte establecidos por EUCAST y poder identificar cepas que se encuentren en el nuevo concepto de área de incertidumbre técnica (ATU). Además, se ha incluido una placa adicional de cuatro pocillos con agar suplementado con cuatro DMIs: procloraz, imazalil, metconazol y epoxiconazol. Estos DMIs se seleccionaron en base a los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo, de manera que con los patrones de crecimiento en estos cuatro DMIs se puede identificar presuntivamente el mecanismo de resistencia a azoles (de los descritos hasta la fecha). Este método está pensado para estudios de cribaje de muchas cepas y aquellas que resulten positivas puedan ser estudiadas en profundidad posteriormente. Para la obtención de los valores de CMIs a cada antifúngico es necesario realizar un método de referencia clásico y para la confirmación del mecanismo de resistencia es necesario la posterior secuenciación de *cyp51A*.

Para este trabajo se analizaron un total de 104 cepas de *A. fumigatus* con la siguiente distribución: 50 sensibles a azoles y sin mutaciones en *Cyp51A*, y 54 cepas resistentes a azoles con distintos mecanismos de resistencia, desde mutaciones puntuales en el gen hasta cepas con inserciones en tándem en el promotor en combinación, o no, de mutaciones puntuales en el gen. La evaluación del método con esta amplia colección de cepas mostró una gran correlación entre los resultados obtenidos y los patrones de susceptibilidad a azoles obtenidos usando el método de referencia, así como en la detección de los distintos mecanismos de resistencia subyacentes.

El empleo de este método podría ser de gran utilidad tanto en la clínica, debido a su facilidad a la hora de realizarlo y evaluarlo, como en los estudios epidemiológicos a gran escala empleando muestras de origen clínico y ambiental.

Resultados

4.2. Validación del método con muestras clínicas y ambientales en un estudio prospectivo de 3 años en el Hospital Universitario Severo Ochoa

4.2.1. Cepas de *Aspergillus* spp

Durante los tres años de estudio se aislaron un total de 335 *Aspergillus* spp. De las mismas, 283 se aislaron de muestras clínicas y 52 de muestras ambientales. *Aspergillus fumigatus* fue la especie predominante (174 aislados, 51.94%), seguido de *A. niger* (50 aislados, 14.93%), *A. terreus* (32 aislados, 9.55%) y *A. flavus* (28 aislados, 8.36%). Otras especies de *Aspergillus* se aislaron en menor proporción, incluyendo *A. nidulans* (18 aislados, 5.37%) y *A. lentulus* (11 aislados, 3.28%). Minoritariamente se identificaron otras especies como *A. unguis* (5 aislados, 1.49%), *A. calidoustus* (3 aislados, 0.89%), *A. versicolor* (3 aislados, 0.89%), *Neosartorya udagawae* (3 aislados, 0.89%), *A. ochraceus* (3 aislados, 0.89%), *A. candidus* (2 aislados, 0.6%), *A. carneus* (1 aislados, 0.3%), *A. fumigatiaffinis* (1 aislados, 0.3%) y *A. sydowii* (1 aislados, 0.3%) (Tabla 8).

Tabla 8. Especies de *Aspergillus*, número y porcentajes (%) de cepas aisladas en el periodo de 3 años del estudio.

Especies de <i>Aspergillus</i>	Número de especies aisladas (%)							
	2019		2020		2021		Total	
	C	E	C	E	C	E	C	E
<i>A. fumigatus</i>	39 (41.05)	5 (5.3)	34 (35.8)	5 (5.3)	66 (45.5)	25 (17.2)	139 (41.5)	35 (10.45)
<i>A. niger</i>	13 (13.7)	1 (1.05)	13 (13.7)	0	14 (9.65)	9 (6.2)	40 (11.9)	10 (3)
<i>A. terreus</i>	8 (8.4)	0	13 (13.7)	1 (1.05)	10 (6.9)	0	31 (9.25)	1 (0.3)
<i>A. flavus</i>	12 (12.6)	1 (1.05)	12 (12.6)	0	3 (2.1)	0	27 (8.1)	1 (0.3)
<i>A. nidulans</i>	3 (3.2)	0	5 (5.3)	1 (1.05)	7 (4.8)	2 (1.4)	15 (4.5)	3 (0.9)
<i>A. lentulus</i>	6 (6.3)	0	5 (5.3)	0	0	0	11 (3.3)	0
<i>A. calidoustus</i>	2 (2.1)	0	0	0	1 (0.7)	0	3 (0.9)	0
<i>A. carneus</i>	1 (1.05)	0	0	0	0	0	1 (0.3)	0
<i>A. unguis</i>	1 (1.05)	0	2 (2.1)	0	0	2 (1.4)	3 (0.9)	2 (0.6)
<i>A. candidus</i>	2 (2.1)	0	0	0	0	0	2 (0.6)	0
<i>A. versicolor</i>	1 (1.05)	0	1 (1.05)	0	1 (0.7)	0	3 (0.9)	0
<i>A. fumigatiaffinis</i>	0	0	1 (1.05)	0	0	0	1 (0.3)	0
<i>N. udagawae</i>	0	0	2 (2.1)	0	1 (0.7)	0	3 (0.9)	0
<i>A. ochraceus</i>	0	0	0	0	3 (2.1)	0	3 (0.9)	0
<i>A. sydowii</i>	0	0	0	0	1 (0.7)	0	1 (0.3)	0
Total	88 (92.6)	7 (7.4)	88 (92.6)	7 (7.4)	107 (73.8)	38 (26.2)	283 (84.5)	52 (15.5)

C: Origen clínico, E: Origen ambiental

4.2.2. Placas de cribado

Todas las cepas se analizaron utilizando el método descrito en el capítulo anterior (4.1), y crecieron en el pocillo control que no estaba suplementado con azoles. Únicamente dos cepas de *A. fumigatus* crecieron en todos los pocillos suplementados con azoles de uso clínico (ITC, VCZ y POS) y en los pocillos suplementados con dos de los DMIs, MET y EPZ, mostrando un patrón de crecimiento que identificaría el mecanismo de resistencia a azoles tipo TR₃₄/L98H o como TR₅₃. A pesar de que este método de cribado se diseñó expresamente para detectar *A. fumigatus* resistente a azoles se consideró que sería útil emplearlo en la vigilancia de la resistencia a azoles con el resto de especies no-*fumigatus* aisladas en este estudio. Ninguna de las otras especies (no-*fumigatus*) presentó un patrón de crecimiento compatible con resistencia a los azoles.

4.2.3. Evaluación de susceptibilidad a antifúngicos

Las dos cepas que fueron consideradas resistentes con el método de cribado se evaluaron por el método de sensibilidad de referencia (EUCAST). Ambas cepas de *A. fumigatus* mostraron CMI de >8 mg/L a ITC, 4 mg/L a VCZ, 0.5 mg/L a POS y 8 mg/L a ISV, por lo que se consideraron resistentes a azoles. El resto de las cepas evaluadas fueron sensibles a azoles. La prevalencia de cepas resistentes a azoles en el estudio fue de 0.6% (2 cepas resistentes de 335 cepas totales) y la prevalencia de cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles fue de 1.15% (2 cepas resistentes de 174 cepas de *A. fumigatus*).

4.2.4. Amplificación y secuenciación de *cyp51A*

El mecanismo de resistencia de las dos cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles (H-100 y H-208) se estudió mediante amplificación y secuenciación del gen *cyp51A*. El análisis de las secuencias reveló el mismo mecanismo de resistencia a azoles en ambas cepas, una inserción en el promotor del gen de una repetición en tándem de 34 pares de bases (TR₃₄) en combinación con una sustitución (L98H) en la parte codificante del gen, siendo un mecanismo tipo TR₃₄/L98H.

4.2.5. Variabilidad genotípica en muestras ambientales y clínicas

Los 174 aislados de *A. fumigatus* se genotiparon utilizando el método TRESPERG, aunque 7 de los aislados no se pudieron amplificar en algunas de las dianas de TRESPERG y se excluyeron del análisis de los genotipos. Los genotipos de estos 167 aislados pueden encontrarse en el **anexo V**. De todos los genotipos encontrados en las 167 cepas, 31 se excluyeron del análisis debido a distintas razones: (i) porque compartían el mismo genotipo que otros aislados del mismo paciente o (ii) porque habían sido aislados de muestras ambientales del mismo día de recolección. Por lo tanto, el número final de aislados que se incluyeron en el estudio de variabilidad genotípica fue de 136. En total, se identificaron un total de 99 genotipos que fueron únicos. Estos resultados muestran que se trataba de una población muy heterogénea con un 72.73% de genotipos únicos. El porcentaje de diversidad de genotipos fue menor en las cepas que presentaban un origen clínico que en las cepas de origen ambiental (**Tabla 9**).

Tabla 9. Genotipos de *A. fumigatus* encontrados en las muestras clínicas y ambientales recogidas a lo largo de los 3 años de estudio.

Origen de la muestra	Número de aislados	Número de genotipos únicos	Diversidad (%)
Clínico	102	60	58.82
Ambiental	34	26	76.47

La diversidad genotípica de los aislados de *A. fumigatus* de origen clínico y ambiental se representó gráficamente utilizando un algoritmo de red de conexiones genéticas ("Minimum spanning tree", MST) en el que la red define el camino más corto entre dos nodos, es decir aquel que requiere el menor número de conexiones y por lo tanto representa las distancias genéticas (**Figura 9**) (Kivelä *et al.*, 2015). Las cepas estaban distribuidas en clados que incluían cepas de origen clínico y ambiental.

Entre los 27 genotipos de *A. fumigatus* que no eran únicos, 15 fueron comunes entre cepas de origen clínico y 2 entre cepas de origen ambiental. Algunos genotipos comunes pertenecían a cepas que fueron aisladas con meses de diferencia. Diez de los 27 genotipos eran compartidos

Resultados

entre cepas de origen clínico y ambiental. Además, algunos de estos genotipos eran comunes entre aislados clínicos de diferentes pacientes y captaciones ambientales realizadas en días distintos (**tabla 10**).

Tabla 10. Genotipos compartidos entre aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus*.

Cepa	Fecha de aislamiento*	Origen	Tipado TRESPERG			
			CSP	MP2	CFEM	ERG
H122	06/03/2020	Clínico	t01	m5.3	c08B	e07
H287	21/07/2021	Ambiental	t01	m5.3	c08B	e07
H285	19/07/2021	Ambiental	t03	m1.1	c05A	e07
H293	02/08/2021	Clínico	t03	m1.1	c05A	e07
H296	11/08/2021	Clínico	t03	m1.1	c05A	e07
H33	15/05/2019	Clínico	t03	m1.1	c08A	e07
H76	28/10/2019	Clínico	t03	m1.1	c08A	e07
H203	16/02/2021	Ambiental	t03	m1.1	c08A	e07
H333	13/12/2021	Ambiental	t03	m1.1	c08A	e07
H225	01/04/2021	Ambiental	t03	m1.3	c08A	e09
H232	13/04/2021	Clínico	t03	m1.3	c08A	e09
H213	02/03/2021	Clínico	t03	m2.3	c07	e06
H283	19/07/2021	Ambiental	t03	m2.3	c07	e06
H137	23/06/2020	Ambiental	t04A	m1.1	c12	e15
H140	06/07/2020	Clínico	t04A	m1.1	c12	e15
H20	02/03/2019	Clínico	t04A	m1.3	c08A	e07
H108	12/02/2020	Clínico	t04A	m1.3	c08A	e07
H192	25/01/2021	Ambiental	t04A	m1.3	c08A	e07
H141	15/07/2020	Clínico	t04A	m1.3	c08B	e07
H217	19/03/2021	Clínico	t04A	m1.3	c08B	e07
H230	08/04/2021	Clínico	t04A	m1.3	c08B	e07
H274	09/07/2021	Ambiental	t04A	m1.3	c08B	e07
H96	07/01/2020	Ambiental	t04A	m3.4	c20	e11
H97	03/01/2020	Clínico	t04A	m3.4	c20	e11
H278	12/07/2021	Ambiental	t09	m5.3	c10	e07
H279	24/06/2021	Clínico	t09	m5.3	c10	e07
H282	19/07/2021	Ambiental	t09	m5.3	c10	e07

*: fecha de aislamiento (dd/mm/yyyy)

Las dos cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles no fueron isogénicas, es decir presentaban genotipos diferentes: la cepa de origen ambiental (t04Bm1.2c22be07) y la cepa de origen clínico (t02Am1.1c09e11). Ninguno de los dos genotipos coincidía con los genotipos identificados entre los aislados de *A. fumigatus* de este estudio. Para establecer la relación de estas cepas resistentes con otras cepas aisladas en España, se utilizó una colección de aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles con el mecanismo de resistencia TR₃₄/L98H procedente de distintas localizaciones de España (aislados entre 2012 y 2023). Los resultados de esta comparación se representaron gráficamente usando MST (**Figura 10**). Los genotipos de los dos aislados resistentes identificados en este estudio compartían genotipos con aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles previamente aislados en algunas localizaciones de España. Los aislados sensibles a azoles estaban distribuidos ampliamente en el MST y, en cambio, los aislados

resistentes a azoles presentaban una gran relación y estaban todos agrupados en clados cercanos.

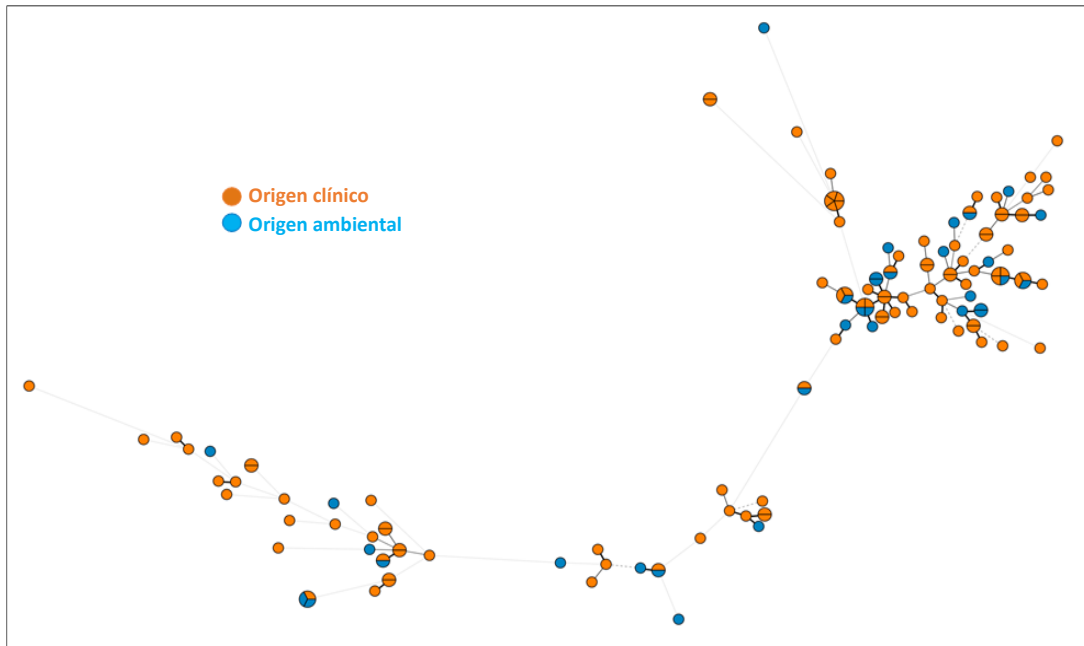


Figura 9. “Minimum spanning tree” (MST) mostrando la diversidad genotípica de los aislados de *A. fumigatus* de origen clínico (en Naranja) y ambiental (en azul). Cada círculo representa un único genotipo y su tamaño refleja el número de cepas que presentan ese único genotipo. Las líneas que conectan los círculos muestran la similitud entre genotipos: las líneas continuas y en negrita indican la diferencia de un solo marcador, una línea continua refleja que se diferencian en dos marcadores y las líneas discontinuas marcan la diferencia en tres o más marcadores.

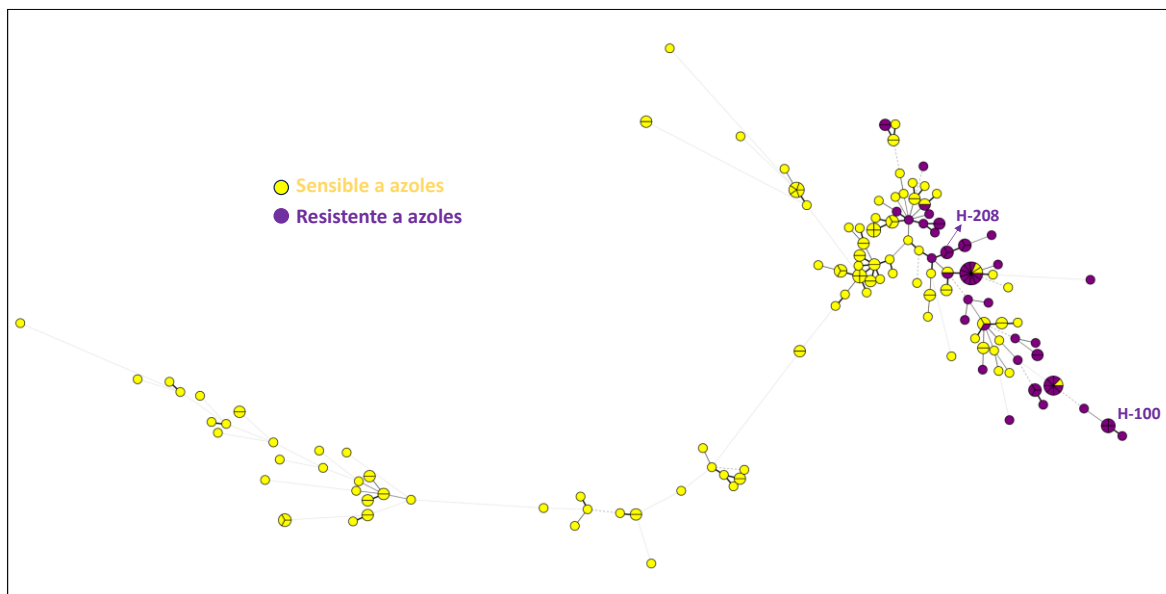


Figura 10. “Minimum spanning tree” (MST) mostrando la diversidad genotípica de los aislados de *A. fumigatus* sensibles a azoles (en amarillo) y resistentes (en morado). Cada círculo representa un único genotipo y su tamaño refleja el número de cepas que presentan ese único genotipo. Las líneas que conectan los círculos muestran la similitud entre genotipos: las líneas continuas y en negrita indican la diferencia de un solo marcador, una línea continua refleja que se diferencian en dos marcadores y las líneas discontinuas marcan la diferencia en tres o más marcadores. Los dos aislados resistentes a azoles obtenidos en este estudio están nombrados en la imagen: H-100 y H-208.

Resultados

4.2.6. Publicación de los resultados

Los resultados de este trabajo han sido enviados y evaluados en la revista *Mycoses*, el manuscrito (**MYC-OR-2023-335**) está aceptado pendiente de cambios menores (**Anexo VI**) y cuyo contenido resumimos a continuación:

En este trabajo se ha realizado un estudio de vigilancia prospectivo de tres años de duración en el Hospital Universitario Severo Ochoa de Leganés. Se recogieron todas las cepas de *Aspergillus* identificadas en el hospital, tanto de origen clínico como de origen ambiental desde principios de 2019 hasta finales de 2021. Se aislaron e identificaron un total de 335 cepas, 283 de origen clínico y 52 de origen ambiental. Más del 50% de las cepas aisladas se identificaron como *A. fumigatus*, seguido de *A. niger*, *A. terreus* y *A. flavus*. Todas las cepas se analizaron con el método de cribaje descrito en el capítulo 4.1 de esta tesis, que consistía en dos pares de placas de cuatro pocillos con agar suplementado con azoles, una placa con azoles de uso clínico, y la otra placa con azoles de uso agrícola o DMIs. Se detectaron dos cepas de *A. fumigatus* resistentes, una de origen clínico y otra de origen ambiental. La resistencia a azoles fue confirmada por el método de microdilución de referencia (EUCAST) y el mecanismo de resistencia a los azoles por amplificación y secuenciación de *cyp51A*. Ambas cepas fueron resistentes a todos los azoles y presentaban un mecanismo de resistencia a azoles de tipo TR₃₄/L98H. Por lo tanto, en este estudio se determinó una prevalencia de resistencia a azoles en *A. fumigatus* de 1.15%.

Un total de 136 cepas de *A. fumigatus* fueron seleccionadas para el análisis genotípico utilizando la técnica TRESPERG. Se estableció que los *A. fumigatus* incluidos en el análisis constituían una población muy heterogénea con un 72.73% de genotipos únicos. De entre los genotipos comunes, 10 eran compartidos entre cepas de origen clínico (entre diferentes pacientes) y de origen ambiental (en captaciones ambientales realizadas en diferentes días). Además, las dos cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles de este estudio se compararon genéticamente con una colección de cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles que presentaban el mismo mecanismo de resistencia (TR₃₄/L98H) con distinto origen geográfico en España, mostrando una estrecha relación entre estas cepas independientemente del origen y de la fecha de aislamiento, lo que sugiere que existen mecanismos genéticos subyacentes que favorecen el desarrollo de la resistencia a azoles.

4.3. Origen y desarrollo de la resistencia a los antifúngicos. Estudio del Sistema de reparación del ADN (MMR) en *A. fumigatus*

4.3.1. Análisis de mutaciones en los genes MMR en una colección de genomas de *A. fumigatus*

En un estudio de secuenciación masiva de genomas de *A. fumigatus* realizado en este laboratorio se llevó a cabo el análisis de una colección de 163 genomas del cual se obtuvo un árbol filogenético (Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021). Esta colección de genomas incluía genomas de cepas sensibles y de cepas resistentes, con representación de todos los mecanismos de resistencia descritos hasta la fecha. En este análisis los genomas se agruparon en cuatro clados diferenciados en los que las cepas resistentes a azoles se localizaban en los clados I y II (**Figura 11**).

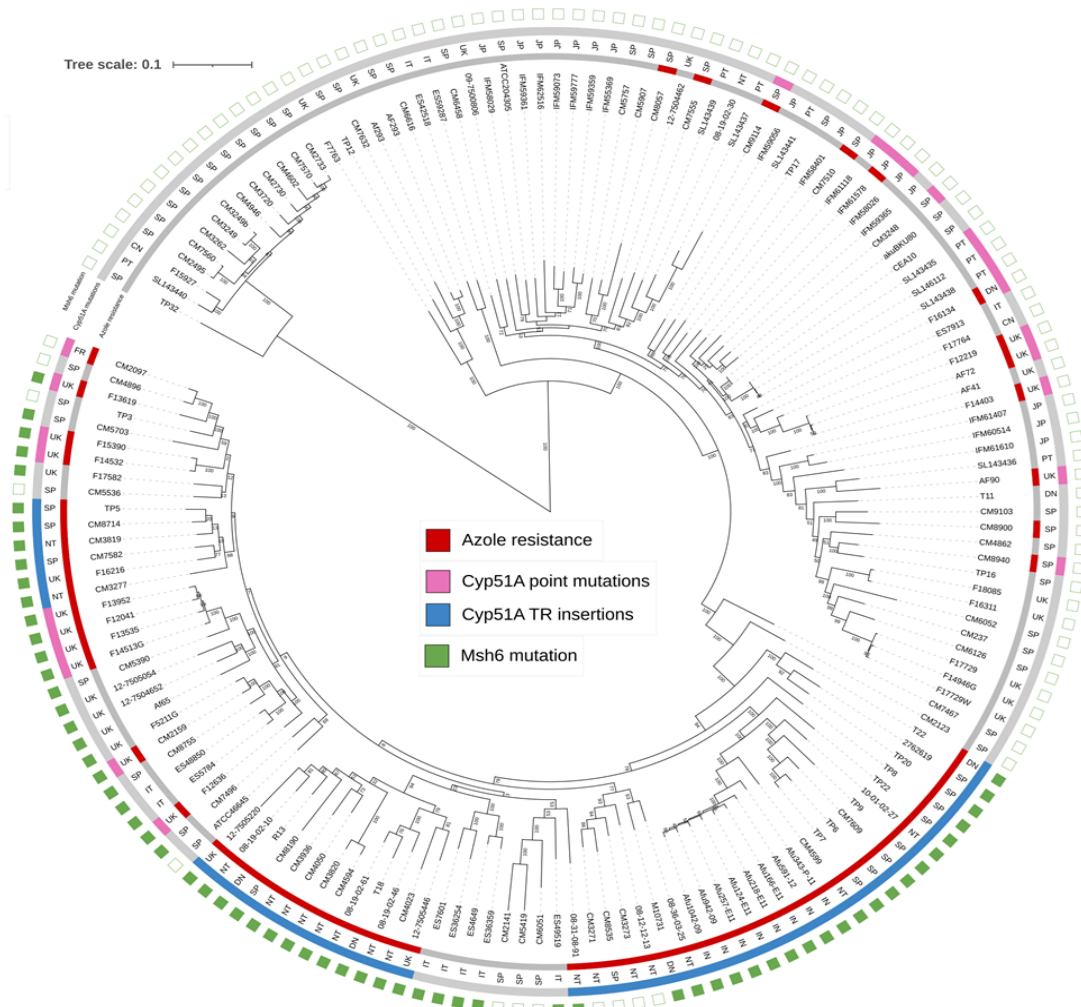


Figura 11. Árbol filogenético representando los resultados obtenidos del análisis de secuenciación masiva incluyendo los genomas de 163 cepas de *A. fumigatus*. En azul, cepas con mutaciones tipo TR₃₄/L98H mutaciones; en verde se muestran la mutación en Msh6, G240A.

Las cepas resistentes a azoles con mutaciones puntuales en Cyp51A se encontraban distribuidas entre los clados I y II, mientras que las cepas con mecanismos de resistencia basados en TR solo se localizaban en tres subclados dentro del clado II que solo contenía cepas con mecanismos TR.

Resultados

En esta colección de genomas, se analizaron las mutaciones en cuatro genes (*msh6*, *msh2*, *pms1* y *mlh1*) pertenecientes a la vía de reparación del ADN (MMR). Las mutaciones identificadas muestran en la **tabla 11** junto con el porcentaje de cepas en las que se encontraron. El análisis muestra que los genes *msh2*, *pms1*, y *mlh1* muestran una baja variabilidad genética. En todos los genes se encontraron múltiples mutaciones puntuales, aunque la mayoría de estas se encontraban asociadas a clados concretos y en ningún caso se encontró relación con la resistencia a los azoles.

Tabla 11. Mutaciones detectadas en el análisis de WGS de los genes *msh6*, *msh2*, *pms1* y *mlh1* y el porcentaje de cepas con estas mutaciones. En negrita se encuentra la mutación más prevalente, G240A en MSH6.

Gen (Código del gen)	Mutaciones	Porcentaje de cepas que la portan (%)
<i>msh6</i> (Afu4g08300)	A55V	0.62
	V118A	0.62
	D121E	0.62
	G178A	1.86
	I183R	10.56
	G240A	42.86
	N289S	2.48
<i>msh2</i> (Afu3g09850)	A45T	3.73
	P329T	3.73
	E467D	0.62
	E812G	1.24
	A889E	0.62
<i>pms1</i> (Afu2g13410)	G286C	0.62
	P401A, V438A, K464R, Q611E, E87K,	4.35
	E760K	4.35
	E444G	2.48
	S758Y	1.24
	D1013Y	0.62
<i>mlh1</i> (Afu5g11700)	K310R	4.35
	S368N	4.35
	I510T	1.86
	A641S	4.35

El hallazgo más relevante fue la presencia de una mutación en *msh6* que se corresponde con la sustitución de una glicina (G) por una alanina (A) en la posición 240 de la proteína Msh6, que se encontró en un 42.8% de los genomas, y únicamente en los genomas del clado II. Además, la mayoría de las cepas con mecanismos de resistencia a azoles tipo TR₃₄/L98H también tenían la mutación G240A en Msh6 (**Figura 11**).

4.3.2. Construcción y caracterización fenotípica de las cepas de *A. fumigatus* Δ *msh6*

La alta proporción (42.8%) de la mutación G240A en Msh6, y su presencia mayoritaria en cepas resistentes a azoles, nos llevó a investigar la posible implicación de Msh6 en el desarrollo de la resistencia a antifúngicos en *A. fumigatus*. Para ello, eliminamos completamente el gen *msh6* de la cepa *akuB*^{KU80}. Para eliminar toda posibilidad de mutaciones secundarias durante la

construcción de las cepas con el gen *msh6* deletado ($\Delta msh6$) se seleccionaron dos mutantes independientes (cepas $\Delta msh6$ -T3 y $\Delta msh6$ -T6). Para comprobar la delección del gen *msh6*, se amplificó y secuenció la región de recombinación, confirmando que el gen *ptrA* había reemplazado correctamente al gen *msh6*. Ambos mutantes $\Delta msh6$ se mostraron indistinguibles de la cepa parental, a nivel de morfología microscópica y macroscópica y al observar el crecimiento radial (resultados no mostrados), por lo que se concluyó que *msh6* no es necesario para un crecimiento normal.

4.3.3. Evaluación de la susceptibilidad a azoles en las cepas de *A. fumigatus* $\Delta msh6$

Inicialmente se evaluó la sensibilidad a los azoles mediante E-tests para ITC, VCZ y POS sin observar ninguna diferencia en los valores de CMI's entre la cepa parental y ninguna de las dos cepas $\Delta msh6$ (Figura 12).

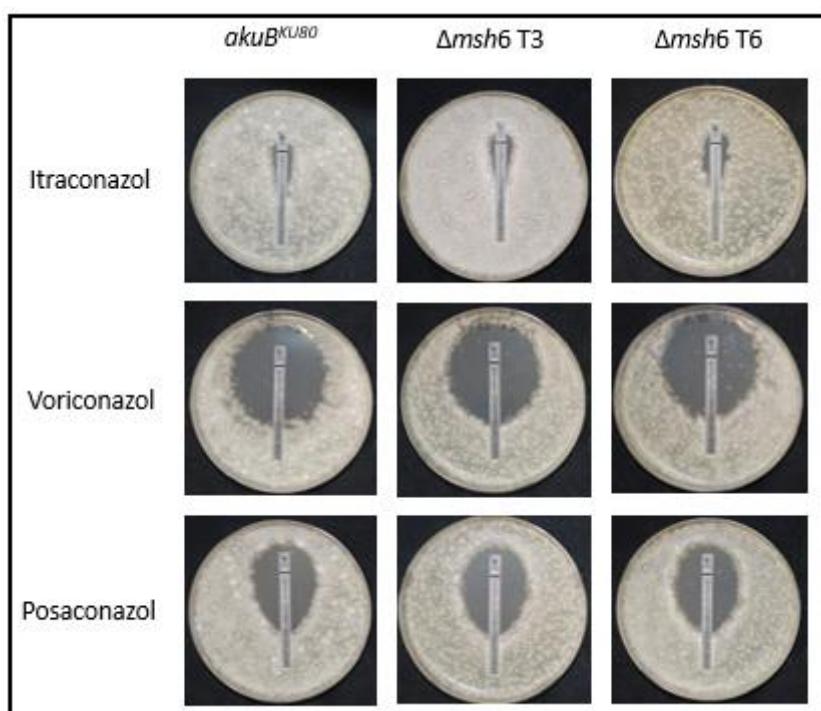


Figura 12. Evaluación de la susceptibilidad a azoles (E-test) realizada en la cepa parental *akuB*^{KU80} y las cepas $\Delta msh6$ de *A. fumigatus*, T3 and T6.

A continuación, se realizaron ensayos de susceptibilidad en microdilución en caldo (EUCAST) frente a ITC, VCZ, POS e ISV. No se encontraron diferencias en los perfiles de CMI's de la cepa parental al compararla con las de las cepas $\Delta msh6$ (tabla 12) por lo que concluimos que la delección del gen *msh6* no tenía ningún impacto directo en la susceptibilidad a azoles.

Tabla 12. Rangos de CMI's a azoles (EUCAST) de las cepas de *A. fumigatus* *akuB*^{KU80} y $\Delta msh6$.

Cepas	Rangos de CMI's (mg/L)			
	ITC	VCZ	POS	ISV
<i>akuB</i> ^{KU80}	1 - 1	0.5 - 0.5	0.125 - 0.25	1 - 1
$\Delta msh6$ T3	0.5 - 1	0.5 - 1	0.125 - 0.25	0.5 - 1
$\Delta msh6$ T6	0.5 - 1	0.5 - 0.5	0.25 - 0.25	1 - 1

Resultados

4.3.4. Evaluación de la virulencia en las cepas de *A. fumigatus* $\Delta msh6$

Para determinar si existían diferencias de virulencia entre la cepa parental y las cepas con el gen *msh6* deletado, se utilizó el modelo alternativo de infección de *Galleria mellonella*. Las cepas de *A. fumigatus* $\Delta msh6$ presentaron una virulencia similar a la cepa parental *akuB*^{KU80}, independientemente del tamaño del inóculo, de 10^3 o 10^4 conidias inoculadas/larva (Figura 13).

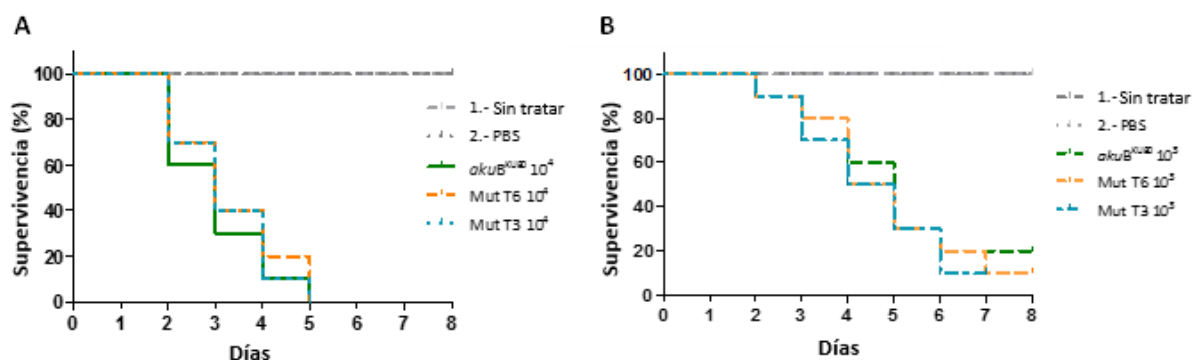


Figura 13. Curvas de supervivencia de las larvas *G. mellonella* inoculadas con la cepa parental *akuB*^{KU80} y las cepas de *A. fumigatus* $\Delta msh6$ (T3 and T6) usando un inóculo de 10^4 (A) y de 10^3 (B) conidias inoculadas/larva. Se emplearon 20 larvas por cepa y grupo del ensayo, los grupos control incluyen tanto a las larvas no tratadas como a las larvas que solo fueron inoculadas con PBS. Este experimento fue repetido en tres ocasiones independientes.

4.3.5. Estudio de la influencia de la delección de *msh6* en el crecimiento de *A. fumigatus* ante distintas condiciones de estrés

Las cepas parentales y $\Delta msh6$ (T3 y T6) se cultivaron a distintas temperaturas (30°C, 37°C, 45°C, y 50°C), y no se encontraron diferencias en ninguna de ellas. Además, las cepas también se cultivaron en distintas condiciones de estrés oxidativo con medios suplementados con menadiona 0.04 mM y 0.05 mM, estrés de pared celular con Rojo Congo (10, 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$) y Calcofluor (10 y 100 $\mu\text{g/ml}$) a distintas concentraciones. En ninguna de estas condiciones se observaron diferencia de crecimiento entre las cepas (resultados no mostrados).

4.3.6. Efectos de la delección de *msh6* en el desarrollo de resistencia a antifúngicos en *A. fumigatus*

4.3.6.1. Desarrollo de resistencia a azoles

Se realizaron experimentos de mutagenesis con distintos azoles. Para ello, se prepararon inóculos de de 10^9 conidias tanto de la cepa parental *akuB*^{KU80} como las cepas $\Delta msh6$ (T3 y T6) que se cultivaron en placas suplementadas con elevadas concentraciones de distintos azoles (VCZ, POS y PRZ) Se encontraron colonias resistentes solo en las placas suplementadas con POS, pero no se observaron diferencias significativas en el número de colonias mutantes obtenidas de las cepas $\Delta msh6$ (T3: 4.8 ± 2.08 ; T6: 2.66 ± 0.58) y la cepa parental (3.75 ± 4.5) en tres experimentos independientes ($p=0.8$, one way ANOVA con Dunnett's multiple comparisons). No crecieron colonias mutantes en las placas que contenían VCZ o PRZ.

4.3.6.2. Desarrollo de resistencia a antifúngicos no azólicos

Al igual que en el experimento anterior, se sembraron placas con 10^9 conidias de cada una de las cepas en agar MM con elevadas concentraciones de tres antifúngicos no-azólicos (diferentes familias de antifúngicos) de uso común en la protección de cultivos en el ámbito agrícola: BCL fue empleado como el antifúngico representante de los SDHIs, BNY como el representante de los MBCs y AZB de los Qols.

Los resultados obtenidos mostraron que la delección de *msh6* en *A. fumigatus* aumentaba significativamente el número de colonias mutantes resistentes en placas suplementadas con BCL (*akuB*^{KU80}: 5.8 + 4.85; T3: 70.1 + 20.48; T6: 56.6 + 7.23) (**Figura 14**) y BNY (*akuB*^{KU80}: 5.3 + 2.31; T3: 12 + 5.65; T6: 25 + 5.29). El estudio reveló que las cepas $\Delta msh6$ generaban 10 y 2 veces más mutantes de BCL y BNY, respectivamente, en comparación con la cepa parental. No se obtuvieron colonias mutantes resistentes a AZB.

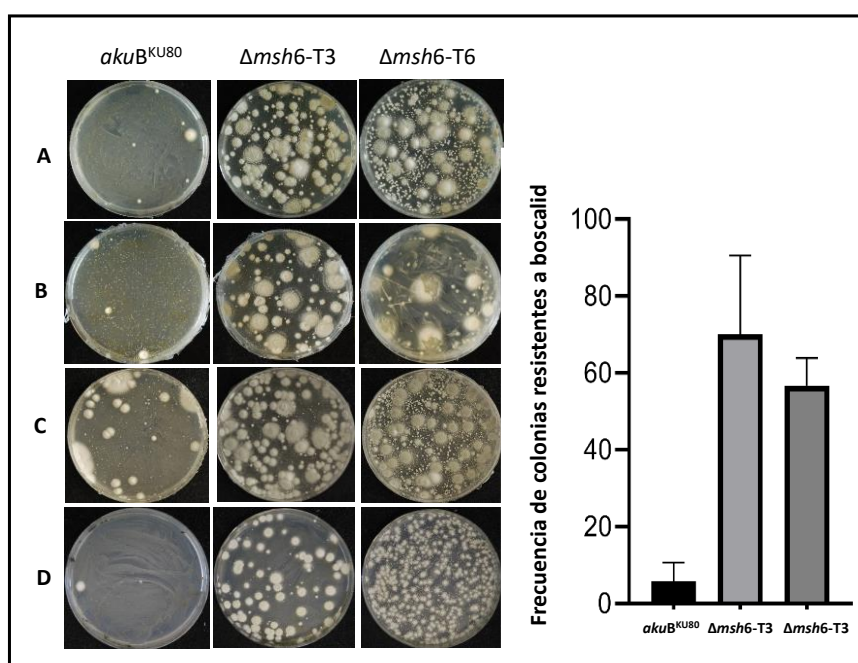


Figura 14. En el panel de la izquierda se observa el crecimiento de las cepas *akuB*^{KU80} y las cepas $\Delta msh6$ (1×10^9 conidias) tras la exposición en placas de MM suplementadas con 32 mg/L de BCL al ser incubadas a 37°C durante 7 días. Cuatro experimentos independientes (A, B, C y D). En el panel de la derecha se representa una figura con la frecuencia de colonias aisladas resistentes a BCL según las unidades formadoras de colonias que crecieron. $p < 0.001$ (one way ANOVA con Dunnett's multiple comparisons).

4.3.7. Análisis de los genes relacionados con los antifúngicos empleados

Al analizar los genes *cyp51A*, *benA* y *shdB* se encontraron polimorfismos y modificaciones de aminoácidos en el análisis de 123 colonias mutantes de *A. fumigatus* aisladas del estudio (**Tabla 13**). Se realizó la amplificación y secuenciación del gen *cyp51A* de todas las colonias mutantes resistentes a POS. El análisis mostró la sustitución de una glicina (G) en la posición 54 por un triptófano (W) en 55 cepas y la sustitución por arginina (R) en una cepa (**Tabla 13**). Las dos mutaciones han sido asociadas directamente con la resistencia a azoles de cadena larga como es el POS (Mann *et al.*, 2003; Espinel-Ingroff *et al.*, 2018).

Resultados

Todos los aislados resistentes a BNY mostraron unas CMI's elevadas a este antifúngico (>32 µg/ml). La amplificación y secuenciación del gen *benA* se realizó en 30 colonias mutantes resistentes a BNY. La secuenciación del gen *benA* detectó la sustitución de un ácido glutámico (E) en la posición 198 por diferentes aminoácidos: alanina (A) en 1 cepa, lisina (K) en 8 cepas, ácido aspártico (D) en 6 cepas, valina (V) en 1 cepa o glicina (G) en 2 cepas. Además, se observó la modificación de una fenilalanina (F) en la posición 200 por una serina (S) en 12 cepas.

Tabla 13. Análisis de los polimorfismos y cambios de aminoácidos obtenidos en los genes *cyp51A*, *benA* y *sdhB* en el compendio de 123 cepas de *A. fumigatus* mutantes obtenidas. Solo los polimorfismos relacionados con mutaciones puntuales fueron mostrados en los resultados. En negrita se remarcan los cambios de aminoácidos que han sido previamente encontrados en cepas resistentes.

Gen	Posición del nucleótido (cDNA)	Codón	Cambio de aminoácido	<i>akuB</i> ^{KU80}	Δ <i>msh6</i> -T3	Δ <i>msh6</i> -T6
<i>cyp51A</i>	g160t	Ggg/Tgg	G54W	16	31	8
	g160a	Ggg/Agg	G54R	0	1	0
<i>benA</i>	a593c	gAg/gCg	E198A	0	0	1
	g592c	Gag/Cag	E198Q	0	0	0
	g592a	Gag/Aag	E198K	0	8	0
	g594c	gag/gaC	E198D	0	3	3
	a593c	gAg/gTg	E198V	0	1	0
	a593g	gAg/gGg	E198G	2	0	0
	t599a	tTc/tCc	F200S	0	10	2
	t599a	tTc/tAc	F200Y	0	0	0
	<i>sdhB</i>	a809t	cAc/cTc	H270L	0	9
c808t		Cac/Tac	H270Y	3	7	7
a809g		cAc/cGc	H270R	0	8	0

Más del 99% de las colonias aisladas resistentes a BCL presentaban unos CMI's muy elevadas a este antifúngico (>32 µg/ml) y el total de estas cepas (37/37) tenían una mutación en el gen *sdhB* (Tabla 13). La amplificación y secuenciación del gen *sdhB* de los 37 aislados resistentes mostraron diferentes mutaciones puntuales implicadas: la sustitución de una histidina (H) en la posición 270 por una leucina (L) en 12 cepas, por tirosina (Y) en 17 cepas y por arginina (R) en 8 cepas.

4.3.8. Publicación de los resultados

Los resultados de este capítulo se han enviado para su publicación en el Journal of Fungi (Manuscript ID: jof-2781556) que se encuentra aceptado pendiente de revisión (15 de febrero de 2024) (Anexo VII).




Type of the Paper (Article.)

Importance of the *Aspergillus fumigatus* mismatch repair protein Msh6 in antifungal resistance development

Lucio J.^{1‡}, Gonzalez-Jimenez I.^{1‡}, Roldan A.¹, Amich J.¹, Alcazar-Fuoli L.^{1,2} and Mellado E.^{1,2*}

En este trabajo de investigación se han evaluado 4 genes del MMR: *msh2*, *msh6*, *pms1* y *mlh1* para estudiar su posible implicación en la resistencia a antifúngicos en *A. fumigatus*. El estudio

de 163 genomas de *A. fumigatus*, incluyendo cepas de origen clínico y ambiental y tanto sensibles como resistentes a azoles, reveló que la mutación G240A en el gen *msh6*, destacaba por su prevalencia entre cepas resistentes a azoles con un mecanismo de resistencia tipo TR₃₄/L98H. Debido a este hallazgo, se generaron cepas deficientes en el gen *msh6*, para evaluar su papel en el desarrollo de resistencia a antifúngicos.

Las cepas $\Delta msh6$ y la cepa parental, *akuB*^{KU80}, fueron estudiadas en distintos experimentos de caracterización fenotípica, incluyendo estrés oxidativo y de pared celular, además de crecimiento a distintas temperaturas y de susceptibilidad a azoles, mostrando que no había diferencias entre las cepas. También se comprobó que no existían diferencias en virulencia utilizando el modelo alternativo de *Galleria mellonella*.

Además, se realizaron experimentos de mutagénesis empleando distintos antifúngicos azólicos (posaconazol, voriconazol y procloraz) y no azólicos (benomil, boscalid y azoxistrobin) para someter a presión selectiva a la cepa parental y a los mutantes $\Delta msh6$.

La selección con azoles derivó en colonias mutantes que crecieron sólo en placas de agar suplementadas con POS. Sin embargo, el número de mutantes obtenidos no difirió significativamente de los obtenidos con la cepa parental. Por el contrario, el análisis de las frecuencias de mutación de las cepas $\Delta msh6$ de *A. fumigatus* mostró un aumento en las tasas de mutación en genes que confieren resistencia a los fungicidas no azólicos BCL y BNY. Las cepas $\Delta msh6$ produjeron 10 veces más mutantes resistentes a BCL y 2 veces más mutantes resistentes a BNY en comparación con la cepa parental.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la adquisición de resistencia antifúngica en *A. fumigatus* podría encontrarse, al menos parcialmente, promovida por la inestabilidad genética causada por alteraciones en los genes implicados en el MMR, y en concreto, en el gen *msh6*. Los resultados confirman que un fenotipo hipermutador en *A. fumigatus*, no solo no parece actuar en detrimento de la eficacia biológica y/o la virulencia del hongo si no que, por el contrario, podría proporcionarle una ventaja en ambientes expuestos a múltiples antifúngicos.

Resultados

4.4. Mecanismos de resistencia a los azoles en *A. flavus*

4.4.1. Evaluación de la susceptibilidad a antifúngicos clínicos

Todas las cepas de *A. flavus* estudiadas, excepto tres, presentaban un perfil de sensibilidad a los azoles, aunque se observaron variaciones en los perfiles de susceptibilidad entre las mismas (**Tabla 14**). Las tres cepas que se consideraron resistentes (CM7668, CM8087 y CM9326) mostraron diferentes perfiles de susceptibilidad a azoles. Solo la cepa CM8087 se consideró resistente a AmB, para el resto no había diferencias considerables en la susceptibilidad a este antifúngico. No se encontraron diferencias en la susceptibilidad a equinocandinas o terbinafina (resultados no mostrados).

Tabla 14. Perfiles de susceptibilidad antifúngica de los aislados de *A. flavus* a diferentes clases de antifúngicos. AmB, anfotericina B; ITC, itraconazol; VCZ, voriconazol; POS, posaconazol; ISV, isavuconazol.

Cepas	Rangos de CMI (mg/L)				
	AmB	ITC	VCZ	POS	ISV
ATCC2004304	1	0.5	2	0.125	1
CM7668	0.5	> 8	0.25	1-2	0.5
CM8087	8->16	8 - 4	8 - 8	0.5 - 0.5	8
CM9165	1	0.25	0.5	0.125	0.25
CM9174	2	0.5-1	1-4	0.125-0.25	2-4
CM9189	1	0.5	1	0.25	1
CM9195	1	0.25	1	0.125	1
CM9228	1	0.5	0.5	0.25	2
CM9267	2	0.5	1	0.25	1
CM9298	1	0.5	1	0.125	1
CM9326	1 - 2	8 - 4	8 - 8	2 - 1	>8
CM9329	2	0.5	1	0.25	1
CM9331	1	0.5	1	0.25	2
CM9684	0.5	1	>8	0.25	2
TP642	1	1	2	0.25	2
TP968	1	1-2	4	0.5-1	4
TP992	1	0.5	2	0.25	1
TP1004	1	1	4	0.5	4
TP1115	1	1	4	0.5	4
TP1179	1	1	4	0.5	4

4.4.2. Evaluación de la susceptibilidad a DMIs

La susceptibilidad de *A. flavus* a cada DMI empleado en el estudio se encuentra en la **tabla 15**. Todas las cepas, excepto las tres cepas que presentaban perfiles de resistencia a azoles clínicos, presentaron CMI similares a las que se observaron para la cepa de referencia (ATCC2004304), por lo que se consideraron sensibles. Dos cepas (CM8087 y CM9326) presentaron elevados valores de CMI a los imidazoles y triazoles empleados en el estudio. Sin embargo, la cepa CM7668 presentó un perfil de mayor susceptibilidad, tanto a imidazoles como a triazoles, con CMI más bajas que la cepa de referencia.

Tabla 15. Perfiles de susceptibilidad a DMI (imidazoles y triazoles) de los aislados de *A. flavus*.

Cepas de <i>A. flavus</i>	Rangos de CMI (mg/L)							
	Imidazoles		Triazoles					
	Imazalil	Prochloraz	Metconazol	Tebuconazol	Epoxiconazol	Bromuconazol	Difenoconazol	Myclobutanil
ATCC2004304	1-2	2-4	4-8	8	8-16	4-16	8->32	>32
CM7668	0.25	1	1	1	0.5-1	0.25-1	0.5-1	4
CM8087	16	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
CM9165	2	1	8	8	8	8	16	>32
CM9174	4	2	16	16	32	8	16	>32
CM9189	2	1	8	8	8	8	16	>32
CM9195	2	1	8	4	8	8	16	>32
CM9228	2	1	8	4	8	8	16	32
CM9267	2	2	8	8	8	16	16	>32
CM9298	2	2	8	4	8	8	16	>32
CM9326	32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
CM9329	1	1	4	4	8	8	16	32
CM9331	2	1	8	8	16	8	32	>32
CM9684	8	2-4	16	16	16->32	32->32	16->16	>32
TP642	8	8	16	16	>32	32	>32	>32
TP968	8	32	16	32	>32	16	32	>32
TP992	2	2	8	4	16	8	>32	>32
TP1004	8	8	16	16	>32	>32	>32	>32
TP1115	8	8	16	16	>32	>32	>32	>32
TP1179	8	8	16	32	>32	>32	>32	>32

Resultados

4.4.3. Análisis de las secuencias de los genes *cyp51A*, *cyp51B* y *cyp51C*

Los tres parálogos de Cyp51 tienen longitud diferente y un número distinto de intrones con diferentes tamaños. El número de acceso en GeneBank de todas las secuencias de Cyp51A, Cyp51B y Cyp51C se muestran en el **anexo VIII**.

4.4.3.1. *Aspergillus flavus* Cyp51A

El gen *cyp51A* tiene una longitud de 1591 pares de bases, con un intrón de 67 pares de bases (de la base 194 a la 260) y se traduce en 507 aminoácidos. Las secuencias de *cyp51A* de *A. flavus* de las cepas ATCC2004304, NRRL3357 (GenBank: XM_002375082.1), AF70, y de *A. oryzae* RIB40, se utilizaron como secuencias de referencia. Las primeras 18 pares de bases (atgatctctcacgcagc) fueron excluidas de la secuencia de la cepa de *A. flavus* NRRL3357 ya que no encajaban con las otras secuencias de AF70 o RIB40. Los cambios en la secuencia codificante de *cyp51A* y los cambios de aminoácidos se muestran en la **tabla 16**. Se encontraron múltiples mutaciones puntuales que se encontraban tanto en cepas sensibles como en resistentes, por lo que se consideraron polimorfismos entre cepas. Sin embargo, en una cepa resistente a itraconazol y posaconazol (CM7668) se detectó el cambio de base c641t responsable de la mutación de la prolina 214 por leucina (P214L). Esta mutación ya fue descrita previamente por nuestro grupo (Rivero-Menendez *et al.*, 2019).

4.4.3.2. *Aspergillus flavus* Cyp51B

El gen *cyp51B* tiene una longitud de 1740 pares de bases, con tres intrones: el primero de ellos de 54 pares de bases (de la base 247 a la 300), el segundo de 58 pares de bases (de la base 499 a la 556) y el último de 53 pares de bases (de la base 1616 a la 1668) que se traduce en un total de 524 aminoácidos. Las secuencias de *cyp51B* de *A. flavus* de las cepas ATCC2004304, NRRL3357, AF70, y de *A. oryzae* RIB40, se utilizaron como secuencias de referencia. Los cambios en la secuencia codificante de *cyp51B* y los cambios de aminoácidos se muestran en la **tabla 17** (solo se indican las cepas que mostraron mutaciones). Este gen, está muy conservado entre cepas, y solo se detectaron 4 mutaciones, que no producían cambios de aminoácido.

Tabla 17. Análisis de Cyp51B de *Aspergillus flavus*. Secuencia de referencia: *A. flavus* NRRL3357.

Cepas	*AZL	Cyp51B			
		c237t C79	c498t I166	t699c N233	a799g K267
CM9165	S	c237t	c498t		a799g
CM9189	S		c498t		
CM9228	S		c498t		
CM9298	S		c498t		
CM9331	S		c498t		
CM9684	S			t699c	
ATCC2004304	S				
<i>A. oryzae</i> RIB40	-				
<i>A. flavus</i> AF70	-		c498t		a799g
Proteína		C79	I166	N233	K267

*AZL, susceptibilidad a los azoles; S, sensible; R, resistente.

4.4.3.3. *Aspergillus flavus* Cyp51C

El gen *cyp51Cp* tiene una longitud de 1612 pares de bases, con un intrón de 70 pares de bases (de la base 197 a la 266) que se traduce en 513 aminoácidos. Las secuencias de *cyp51C* de *A.*

flavus de las cepas ATCC2004304, NRRL3357, AF70, y de *A. oryzae* RIB40, se utilizaron como secuencias de referencia. Los cambios en la secuencia codificante de *cyp51C* y los cambios de aminoácidos se muestran en la **tabla 18**. Se encontraron múltiples mutaciones puntuales tanto en cepas sensibles como resistentes. Únicamente en una cepa resistente (CM9326), se encontró un cambio de bases (a1046g) responsable de la mutación de la histidina 349 por arginina (H349R) que también había sido descrita previamente por nuestro grupo (Rivero-Menendez *et al.*, 2019).

4.4.4. Expresión de los genes Cyp51 de *Aspergillus flavus*

La expresión de los tres genes Cyp51 de *A. flavus* se analizó utilizando RT-PCR. Los tres genes se expresan en condiciones de crecimiento vegetativo (**Figura 15**).

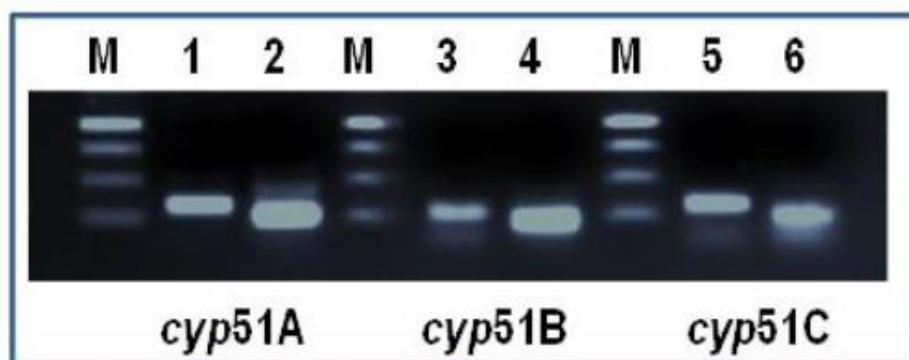


Figura 15. Amplificación por PCR y RT-PCR de los tres genes de *cyp51* de *A. flavus*. Los fragmentos de *cyp51A* de ADN (1) y de cADN (2); fragmentos de *cyp51B* de ADN (3) y cADN (4); y los fragmentos de *cyp51C* de ADN (5) y cADN (6). M; escalera de 1 kB.

Además, se realizó un análisis de PCR cuantitativa para determinar las diferencias en expresión relativa de los tres genes *cyp51* entre las cepas de *A. flavus* resistentes a azoles (CM7668, CM8087 y CM9326) y la cepa de referencia ATCC2004304 (**Figura 16**).

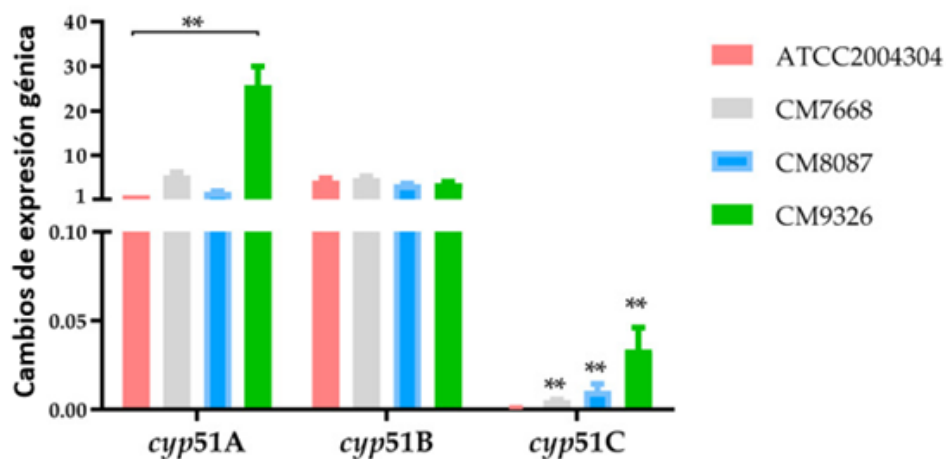


Figura 16. Cambios de expresión génica en *cyp51A*, *cyp51B* y *cyp51C* en las cepas de *A. flavus* ATCC2004304, CM7668, CM8087 y CM9326. Los valores de expresión de los genes se representaron en un diagrama de barras con la media más desviación estándar. Los p-valores se calcularon utilizando la prueba Mann–Whitney U. ** p < 0.001.

Tabla 16. Análisis de Cyp51A de *Aspergillus flavus*. La secuencia de la cepa de *A. flavus* NRRL3357 fue usada como referencia.

Cepas	<i>Aspergillus flavus</i> Cyp51A																	
	*A	c132t	c165t	c342t	g390a	t546c	g595a	c641t	t723c	c738t	t907c	t927c	g966t	a985g	c1065t	t1164c	c1368t	g1371a
		F44	P55	G114	K130	F182	A199T	P214L	Y241	N246N	L303	P309	K322N	T329A	H355	P388	N456	L456
CM7668	R		c165t		g390a	t546c		c641t								t1164c		
CM8087	R		c165t		g390a	t546c								a985g		t1164c		
CM8098	S		c165t		g390a	t546c								a985g		t1164c		
CM9165	S		c165t			t546c		t723c								t1164c		
CM9174	S		c165t		g390a	t546c								a985g		t1164c		
CM9189	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
CM9195	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
CM9228	S					t546c			t907c			g966t				t1164c		
CM9267	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
CM9298	S	c132t	c165t	c342t	g390a	t546c					t927c					t1164c	c1368t	
CM9326	R		c165t		g390a	t546c										t1164c		
CM9329	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
CM9331	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
CM9684	S		c165t		g390a	t546c								a985g		t1164c		
TPH642	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
TPH968	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
TPH992	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
TPH1004	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
TPH1115	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
TPH1179	S		c165t		g390a	t546c										t1164c		
ATCC2004304	S		c165t		g390a	t546c	g595a								c1065t	t1164c	c1368t	g1371a
<i>A. oryzae</i> RIB40	-		c165t		g390a	t546c	g595a								c1065t	t1164c	c1368t	g1371a
<i>A. flavus</i> AF70	-		c165t		g390a	t546c			c738t							t1164c	c1368t	
Proteína		F44	P55	G114	K130	F182	A199T	P214L	Y241	N246	L303	P309	K322N	T329A	H355	P388	N456	L456

*A, susceptibilidad a azoles; S, sensible; R, resistente. En rojo se marcan las cepas de *A. flavus* resistentes a azoles.

Tabla 18. Análisis de Cyp51C de *Aspergillus flavus*. La secuencia de la cepa de *A. flavus* NRRL3357 fue usada como referencia.

		<i>Aspergillus flavus</i> Cyp51C																		
Cepas	*A	t161c	c174g	t718g	c748t	g760a	a761g	c826a	a853g	t876g	t894a	g915a	c978t	a1044g	a1046g	c1158t	g1196t	a1263g	a1267g	a1455g
		M54T	G58G	S240A	R250 _{ST}	D254N	D254G	P276T	I285V	A292A	S298S	M305I	L326L	L348L	H349R	S386S	S399I	E421E	N423D	V485V
CM7668	R	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
CM8087	R	t161c	G58G	t718g																
CM9165	S	t161c	c174g	t718g																
CM9174	S	t161c	G58G	t718g																
CM9189	S	t161c	G58G	t718g			a761g	c826a	a853g	t876g	t894a					c1158t		a1263g	a1267g	
CM9195	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
CM9228	S	t161c	G58G	t718g	c748t												g1196t			
CM9267	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
CM9298	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
CM9326	R	t161c	G58G	t718g											a1046g					
CM9329	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
CM9331	S	t161c	G58G	t718g		g760a		c826a	a853g	t876g	t894a					c1158t		a1263g	a1267g	
CM9684	S	t161c	G58G	t718g																
TPH642	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
TPH968	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
TPH992	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
TPH1004	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
TPH115	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
TPH1179	S	t161c	G58G	t718g			a761g						c978t	a1044g		c1158t		a1263g	a1267g	
ATCC**	S	t161c	G58G	t718g		g760a			a853g	t876g	t894a					c1158t				a1455g
RIB40***	-	t161c	G58G	t718g																
AF70	-	t161c	G58G	t718g		g760a						g915a				c1158t		a1263g	a1267g	
Proteína		M54T	G58G	S240A	R250 _{ST}	D254N	D254G	P276T	I285V	A292A	S298S	M305I	L326L	L348L	H349R	S386S	S399I	E421E	N423D	V485V

Resultados

La expresión del gen *cyp51A* era similar entre la cepa de referencia y las cepas CM7668 y CM8087. Sin embargo, la expresión de este gen era significativamente superior ($p < 0.001$) en la cepa CM9326. No se observaron diferencias de expresión de *cyp51B* entre ninguna de las cepas. El gen *cyp51C*, se encontraba muy poco expresado en todas las cepas en comparación con los otros dos parálogos. Sin embargo, la expresión de *cyp51C* en las cepas resistentes era significativamente superior a la de la cepa de referencia ($p < 0.001$).

4.4.5. Análisis de secuencias: Alineamiento y similitud

La proteína de 507 aminoácidos codificada por los 1521 pares de bases del gen *cyp51A* de *A. flavus* se comparó con las secuencias conocidas de Cyp51 de diferentes especies fúngicas, incluidas especies de *Aspergillus*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. entre otros patógenos de plantas. Los porcentajes de similitud, en orden descendente, con las proteínas Cyp51 fueron los siguientes: Cyp51A de *A. terreus* (80,59%), Cyp51A de *A. fumigatus* (77,60%), Cyp51C de *A. flavus* (77%), Cyp51 de *Penicillium* spp. (70%), Cyp51s de *Fusarium* spp. (68%), y Cyp51B de *A. flavus* (58%). La homología con otros patógenos de plantas, como *N. crassa*, *O. yallundae*, *O. acufiformis*, *E. necátor*, *Venturia inaequalis* y *Venturia nashicola*, estaba alrededor del 58%.

La proteína de 524 aminoácidos codificada por el gen *cyp51B* de *A. flavus* se comparó con las secuencias completas conocidas de Cyp51 de diferentes especies fúngicas. Los porcentajes de similitud, en orden descendente fueron: Cyp51B de *A. terreus* (84%), Cyp51B de *A. fumigatus* (84%), Cyp51 de *P. italicum* (78%), Cyp51s de *Fusarium* spp. (63%), Cyp51A de *A. flavus* (58%) y Cyp51C de *A. flavus* (57%). La homología con otros hongos patógenos de plantas, como *N. crassa*, *O. yallundae*, *O. acufiformis*, *E. necátor*, *V. inaequalis*, y *V. nashicola* se encontraba en torno al 59-61%.

La proteína de 513 aminoácidos codificada por el gen *cyp51C* de *A. flavus* se comparó con las secuencias conocidas de Cyp51 de diferentes especies fúngicas. El análisis mostró una elevada similitud con Cyp51A de *A. fumigatus* (78%), Cyp51A de *A. flavus* (77.56%), Cyp51A de *A. terreus* (74.71%), Cyp51 de *Penicillium* spp. (68%), Cyp51s de *Fusarium* spp. (66%), Cyp51B de *A. flavus* (60%) y Cyp51B de *A. fumigatus* (60%). La homología con el resto de patógenos se encontraba entre el 55-57%.

4.4.6. Análisis filogenético

Con los resultados derivados de la comparación de las distintas secuencias de las proteínas Cyp51 de *A. flavus* con las de otras especies del género *Aspergillus*, además de otros patógenos fúngicos se construyó un árbol filogenético (**Figura 17**). Las proteínas Cyp51A y Cyp51B se agrupan en clados bien diferenciados, mientras que las secuencias de las proteínas de Cyp51C de *A. flavus* se encuentran en un subclado dentro del clado de las proteínas Cyp51A. Por otro lado, la secuencia de la proteína Cyp51C de *Fusarium* spp. forma un clado independiente de Cyp51A y Cyp51B.

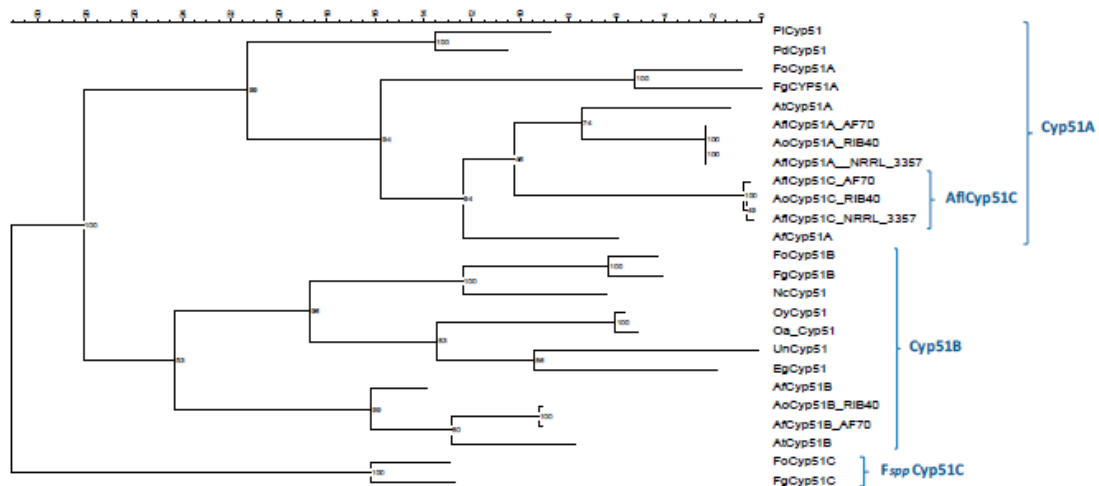
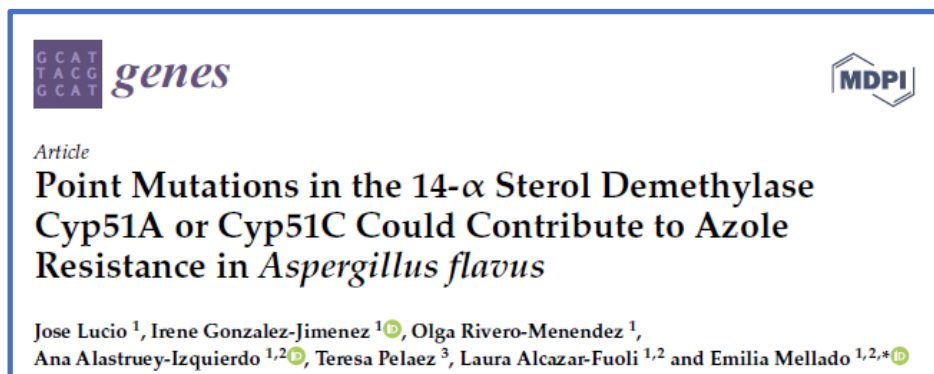


Figura 17. Árbol filogenético obtenido mediante un análisis de máxima verosimilitud. Para representar el árbol se realizaron 2000 réplicas que permitieran representar acordemente la filogenia de las proteínas. Las secuencias empleadas fueron Cyp51A, Cyp51B y Cyp51C de *A. flavus*; Cyp51A, Cyp51B y Cyp51C de *A. oryzae*; AfCyp51A y AfCyp51B de *A. fumigatus*; AtCyp51A y AtCyp51B de *A. terreus*; FgCyp51A, FgCyp51B y FgCyp51C de *F. graminearum*; FoCyp51A, FoCyp51B, FoCyp51C de *F. oxysporum*; PiCyp51 de *P. italicum*; PdCyp51 de *P. digitatum*; OyCyp51 de *O. yallundae*; OaCyp51 de *O. acufiformis*; NcCyp51 de *N. crassa*; EgCyp51 de *E. graminis* y unCyp51 de *U. necator*.

4.4.7. Publicación de los resultados

Los resultados de este capítulo fue objeto de una publicación en la revista Genes en 2020 y el contenido de la publicación se resume a continuación:

Artículo: **Lucio J**, Gonzalez-Jimenez I, Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Pelaez T, Alcazar-Fuoli L, Mellado E. 2020. Point Mutations in the 14- α Sterol Demethylase Cyp51A or Cyp51C Could Contribute to Azole Resistance in *Aspergillus flavus*. *Genes (Basel)*; 11(10):1217. doi: 10.3390/genes11101217. IF:3.7 Genetics&Hereditiy 54/178 (Q2). **(Anexo IX)**.



En este trabajo se estudiaron los mecanismos de resistencia a azoles en *A. flavus*. Se estudiaron los tres genes (Cyp51A, Cyp51B y Cyp51C) que codifican la enzima diana de los azoles, la 14 esterol demetilasa. Se estudiaron 20 cepas de *A. flavus* de origen clínico, entre las cuales, se encontraron tres cepas consideradas como resistentes a azoles. Además, por su relación con una vía de desarrollo de resistencia a azoles y uso en el ámbito agrícola, también se evaluó la susceptibilidad antifúngica a los DMIs, encontrando resistencia cruzada en dos de las cepas consideradas resistentes a azoles clínicos. Posteriormente se amplificaron y secuenciaron

Resultados

cyp51A, *cyp51B* y *cyp51C*, y al realizar un análisis filogenético comprobamos que Cyp51C es considerablemente similar a Cyp51A. Se encontraron diferentes mutaciones puntuales en Cyp51A y Cyp51C, mientras que en Cyp51B no se encontró ninguna. Entre las múltiples mutaciones puntuales encontradas en Cyp51A, la mutación P214L se encontró únicamente en la cepa resistente (CM7668), con un patrón de sensibilidad semejante a cepas de *A. fumigatus* con la mutación P216L en Cyp51A. En el caso de Cyp51C, otra cepa resistente (CM9326) a azoles tenía una mutación puntual H349R, cuya implicación en la resistencia a azoles es aún desconocida. Sin embargo, para poder tener una imagen más completa de las implicaciones de las diferentes isoenzimas de Cyp51 en la resistencia a azoles en *A. flavus*, se realizó un análisis de expresión génica de manera que se pudiera evaluar una posible relación de la expresión de estos genes en la resistencia a azoles de las cepas consideradas como resistentes. Un hallazgo interesante es el elevado nivel de expresión de *cyp51A* en la cepa CM9326, que podría ser una explicación a su perfil de resistencia.

La tercera cepa resistente a azoles (CM8087) no presentaba ninguna mutación puntual en ninguno de los tres enzimas que pudiera estar relacionada con su patrón de resistencia. Este resultado parece lógico ya que esta cepa presentaba un perfil de multiresistencia a los azoles, a todos los DMIs estudiados y también a la AmB. Es necesario realizar otros estudios para comprender de una manera efectiva los mecanismos de resistencia que subyacen en cepas de *A. flavus* consideradas como multiresistentes a los antifúngicos.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la salud pública a nivel global es el considerable aumento de los aislados de microorganismos infecciosos resistentes a los distintos antimicrobianos. Dentro de las distintas clasificaciones de patógenos infecciosos se encuentran los hongos, entre los cuales destaca el género *Aspergillus*, y más en concreto, *A. fumigatus* por su mayor aislamiento en la clínica y el aumento en la detección de aislados resistentes a los azoles (Brown *et al.*, 2012; Chowdhary *et al.*, 2017; Van De Veerdonk *et al.*, 2017). Actualmente las opciones de tratamiento para las infecciones por *Aspergillus* spp. se encuentran limitadas a tres familias de antifúngicos: los polienos, las equinocandinas y los azoles (Latgé y Chamilos, 2019). La tendencia ascendente al desarrollo de resistencia a azoles en *A. fumigatus* reduce las opciones terapéuticas puesto que los azoles son el tratamiento de elección para prevenir y curar las infecciones causadas por el mismo. Sin embargo, los azoles no son únicamente empleados en el campo médico, sino que también presentan una utilidad como fungicidas en el ámbito agrícola. Los denominados DMIs, se utilizan para eliminar patógenos fúngicos de plantas, que provocan destrozos en los cultivos y ocasionan pérdidas económicas considerables (Doughty *et al.*, 2021). El empleo habitual de los azoles en ambos ámbitos ha favorecido la selección de aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles, tanto por la vía clínica, en los tratamientos de largo duración, como la vía ambiental, donde *A. fumigatus* coexiste con los patógenos de plantas (García-Rubio *et al.*, 2021; Ratnadass y Sester, 2023).

En la vía clínica, el desarrollo de resistencia a los azoles está relacionado con el uso de azoles en tratamientos de larga duración. La presión selectiva sobre cepas inicialmente sensibles a azoles, lleva a la selección de cepas con mecanismos de resistencia basados en mutaciones puntuales del gen *cyp51A*, diana de los azoles. Estas cepas presentan diferentes perfiles de susceptibilidad a azoles en función de la mutación, como G54, G138, P216, M220 y G448S (Mellado *et al.*, 2004; Snelders *et al.*, 2010; Camps, Van Der Linden, *et al.*, 2012; Pelaez *et al.*, 2012b; Jeanvoine *et al.*, 2020). Por otro lado, el empleo masivo de DMIs en el ámbito agrario se relaciona directamente con una presión selectiva en *A. fumigatus*, presente de manera ubicua en el ambiente. Esta resistencia a DMIs provoca resistencia cruzada con los azoles utilizados en clínica debido a la gran similitud en cuanto a estructuras químicas y a un común mecanismo de acción y diana (Snelders *et al.*, 2012; Meis *et al.*, 2016; Verweij *et al.*, 2020; García-Rubio *et al.*, 2021). La resistencia desarrollada por esta vía, presenta un patrón de multiresistencia a todos los azoles y se asocia con mecanismos de resistencia basados en la inserción en el promotor del gen *cyp51A* de un TR normalmente acompañado de mutaciones puntuales en la región codificante del gen (TR₃₄/L98H, TR₃₄/L98H/S297T/F495I, TR₄₆/Y121F/T289A, TR₅₃ y TR₁₂₀) (Mellado *et al.*, 2007; Hodiamont *et al.*, 2009; van der Linden *et al.*, 2015; García-Rubio *et al.*, 2017; Hare *et al.*, 2019; Pérez-Cantero *et al.*, 2020; Pontes *et al.*, 2020). Independientemente de la vía de desarrollo de resistencia, los pacientes que se encuentran infectados con cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles presentan una mayor probabilidad de fallo terapéutico que se ve influenciado a su vez por diferentes variables que agravan las tasas de mortalidad (Chowdhary *et al.*, 2017; Latgé y Chamilos, 2019; Guegan *et al.*, 2021).

Los primeros aislados resistentes a azoles de *A. fumigatus* se describen en California en el año 1997 a partir de muestras de pacientes que presentaban AI (Denning *et al.*, 1997). Desde entonces el aumento de la detección de estos aislados ha ido progresivamente aumentando

hasta la actualidad, detectándose cepas resistentes en todos los continentes aunque con mayor presencia en ciertas zonas geográficas (Meis *et al.*, 2016; Jeanvoine *et al.*, 2020; Nywening *et al.*, 2020; Zea y Toyotome, 2022). Estos aislados resistentes a azoles no se encuentran solamente en muestras de origen clínico, también se encuentran en muestras de origen ambiental. Esta situación de aumento de resistencias se ve reflejada en España, ya que podemos observar el aumento en la detección de aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles de origen clínico a lo largo de los últimos 20 años (**Figura 18**). Hasta el año 2000 todos los aislados de *A. fumigatus*, de distintos hospitales de España, que se recibían en el laboratorio de Referencia eran sensibles a azoles. En el año 2001 se detectó el primer aislado resistente a azoles, y este aislamiento ocasional se mantuvo hasta 2013. Sin embargo, partir de 2014, se comienza a observar un aumento considerable que se ha hecho muy manifiesto en 2023. En relación con el origen geográfico, las cepas recibidas en el Laboratorio se encuentran ampliamente distribuidas por las comunidades autónomas del país, independientemente del mecanismo de resistencia que subyace, aunque es remarcable el hecho de que el mayor número de cepas resistentes del año 2023 provienen de Barcelona (**Figura 19**).

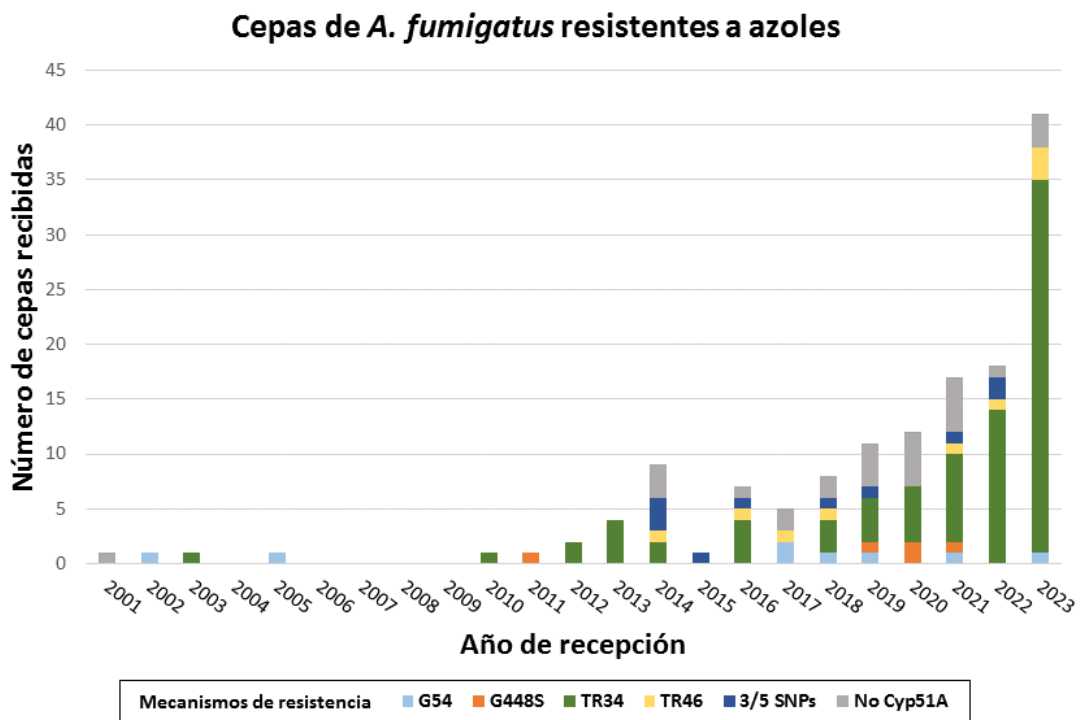


Figura 18: Número de cepas de *A. fumigatus* resistentes a azoles (agrupadas por mecanismo de resistencia) recibidas en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología desde el año 2001 hasta el año 2023.

Numerosos trabajos analizan muestras clínicas y ambientales de *A. fumigatus*, y en aquellos que se detectan aislados resistentes cuyo origen es ambiental casi siempre aparece el mecanismo TR₃₄/L98H, que es actualmente el mecanismo mayoritario por todo el mundo (Verweij *et al.*, 2020; Burks *et al.*, 2021), aunque está aumentando la detección de todos los mecanismos de resistencia a azoles basados en inserciones tipo TR (Rivero-Menendez *et al.*, 2016; Garcia-Rubio *et al.*, 2017). El mecanismo de resistencia TR₃₄/L98H es mayoritario en países como Países Bajos (Snelders *et al.*, 2009; Van Der Linden *et al.*, 2013; Abdolrasouli *et al.*, 2015), Reino Unido

Discusión

(Bromley *et al.*, 2014; Sewell *et al.*, 2019; Fraaije *et al.*, 2020), o Francia (Rocchi *et al.*, 2014; Jeanvoine *et al.*, 2017; Lavergne *et al.*, 2017; Godeau *et al.*, 2020). Por otro lado, los mecanismos de resistencia a azoles más frecuentes en otras partes del mundo son TR₃₄/L98H/S297T/F495I en China (Cao *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2020) o TR₄₆/Y121F/T289A en países de América del Sur (Le Pape *et al.*, 2016; Alvarez-Moreno *et al.*, 2019; Resendiz-Sharpe *et al.*, 2021). Cada mecanismo de resistencia a azoles basados en TR posee un perfil de susceptibilidad distinto a los DMIs, lo que sugiere que las distintas prevalencias mayoritarias de un mecanismo u otro en zonas concretas puede deberse al DMI que se emplea a nivel local (Garcia-Rubio *et al.*, 2021).

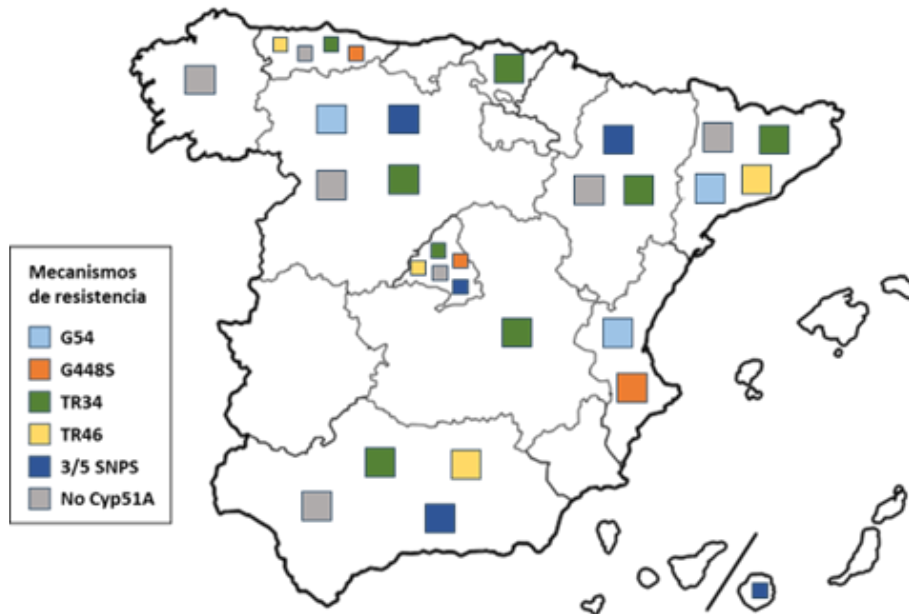


Figura 19. Aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles detectados según el mecanismo de resistencia a azoles por provincias.

El hecho de que este mecanismo de resistencia se encuentre tan presente de forma universal parece estar relacionado con una diseminación a nivel global partiendo de un origen común, ya que se ha observado una cercana relación genética entre aislados resistentes a azoles con un mecanismo de resistencia del tipo TR₃₄/L98H (Garcia-Rubio *et al.*, 2018).

En 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la primera lista de patógenos fúngicos prioritarios, entre los que figura *A. fumigatus* como patógeno de prioridad crítica por diferentes criterios definidos por la OMS, como son el ratio de mortalidad, la incidencia, la distribución a nivel global o los niveles de resistencia a antifúngicos (WHO, 2022). En los últimos años, el foco de atención de la OMS respecto a la resistencia antimicrobiana estaba puesto en la resistencia en bacterias, pero recientemente se consideró que los patógenos fúngicos presentaban un elevado riesgo a nivel de salud pública. Esto vino fomentado por el concepto de Salud Global, o “One Health”, introducido a principios del siglo XXI. La base de esta perspectiva se sustenta en la concepción en conjunto de distintos componentes de la salud, aunando la salud de las plantas, del medio ambiente, de los animales y de los humanos que confluyen en una sola, interrelacionándose entre sí al coexistir en un mismo plano (**Figura 20**).

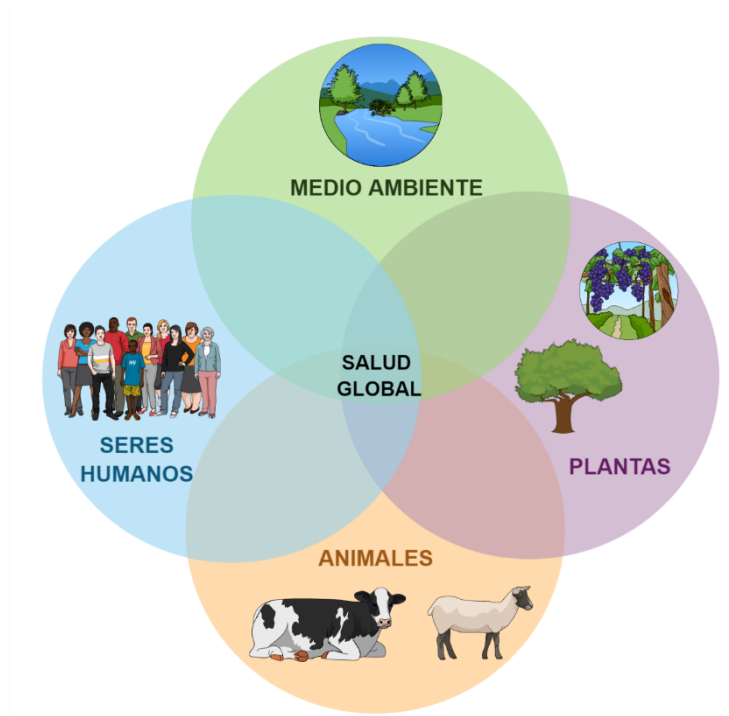


Figura 20: Esquema del concepto integrador Salud Global que relaciona en un mismo marco multidisciplinar la salud ambiental, la salud animal, la salud vegetal y la salud humana.

De esta manera, la comprensión de diferentes problemas, como la resistencia a los antifúngicos, debe darse desde un marco mixto en el que colaboren profesionales de distintas áreas para poder entender, analizar y resolver problemas comunes. Así, la resistencia a antifúngicos se podría estudiar desde distintos enfoques interrelacionados como, las infecciones fúngicas en plantas, el control sanitario de los alimentos, las posibles zoonosis fúngicas, el cambio climático o el impacto de ciertos antifúngicos en los ecosistemas (Mackenzie y Jeggo, 2019; Simões *et al.*, 2023). Siguiendo esta perspectiva, en relación con la resistencia a azoles en *A. fumigatus*, se puede extrapolar la importancia de profundizar en el impacto en la salud pública, no solo por los aislados resistentes de origen clínico, sino también de los aislados ambientales resistentes a azoles, puesto que *A. fumigatus* es una especie fúngica que se encuentra en cualquier entorno.

Los estudios de vigilancia epidemiológica han aumentado en los últimos años como consecuencia del aumento de la detección de aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles. Esto resalta su importancia puesto que para comprender mejor las dinámicas de las poblaciones y las tendencias en cuanto a la resistencia de azoles es importante vigilar que ocurre epidemiológicamente a nivel local, como recomienda el ECDC desde el año 2013 (Ecdc *et al.*, 2013). Según el concepto de “One Health”, es primordial aumentar el número de cepas de origen ambiental en los estudios de prevalencia de la resistencia de *A. fumigatus* a los azoles. Concretamente en España se han realizado estos estudios de prevalencia, pero los resultados varían entre el 1% y el 15% en función del estudio (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013, 2018; Rivero-Menendez, Soto-Debran, *et al.*, 2019; Vidal-Acuña *et al.*, 2019). Además, la mayoría de estudios carecen de aislados ambientales, exceptuando dos estudios en los que se captaron cepas de origen ambiental que se incluyeron en los estudios de vigilancia (Escribano *et al.*, 2020; Peláez *et al.*, 2022).

Discusión

Entre los distintos métodos empleados para poder evaluar la susceptibilidad antifúngica y confirmar la resistencia a azoles destaca la microdilución en caldo, como son CLSI y EUCAST, ambas técnicas completamente validadas a nivel mundial. Estos métodos estandarizados no están disponibles en todos los centros debido a su nivel de especialización técnica, ya que requieren profesionales cualificados para llevar a cabo estas metodologías y para poder interpretar los resultados. En base a esta limitación, uno de los objetivos iniciales de esta Tesis fue desarrollar un método que pudiera ser empleado para cribar de manera rápida y sencilla aquellos aislados de *A. fumigatus* que son resistentes a los azoles partiendo de un método de cribado previo basado en el uso de placas de 4 pocillos para evaluar la susceptibilidad a tres azoles de uso clínico (Linden *et al.*, 2009).

El método desarrollado en este trabajo incluye varias mejoras, la primera es una modificación de las concentraciones de VCZ y POS en las placas considerando los puntos de corte actuales establecidos por EUCAST y la introducción del concepto de ATU. El cambio consiste en la disminución de las concentraciones empleadas de VCZ y POS a 1 mg/L y 0.25 mg/L respectivamente (Guinea, 2020). Esta adaptación permite disminuir los errores que ya se han descrito (Espinel-Ingroff *et al.*, 2018; Serrano-Lobo *et al.*, 2021) con aquellas cepas que presentaban unas CMIs que eran consideradas en el pasado como sensibles para VCZ y POS pero que en la actualidad coinciden con la introducción del concepto ATU y los nuevos puntos de corte, aumentando así la detección de posibles cepas resistentes a azoles y evitando los falsos negativos. Como segunda modificación, se amplió el método empleando una segunda batería de placas de 4 pocillos en este caso suplementadas con DMIs. La selección de los DMIs empleados se basó en un estudio previo en base a los distintos perfiles de sensibilidad/resistencia de los aislados en función del mecanismo de resistencia (García-Rubio *et al.*, 2021).

Con el perfil de resistencia cruzada entre azoles de uso clínico y DMIs, se puede identificar presuntamente el mecanismo de resistencia, principalmente en cepas con mecanismos de resistencia tipo TR. En el caso de los azoles de uso clínico, todas las cepas con mecanismos de resistencia tipo TR presentan un perfil de multiresistencia común (Vermeulen *et al.*, 2012; Lescar *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018; Pontes *et al.*, 2020). Sin embargo, los perfiles de susceptibilidad a DMIs varían en función del mecanismo: así las cepas que presentan mecanismos de resistencia TR₃₄/L98H y TR₅₃ son sensibles a los DMIs del grupo de los imidazoles y resistentes a los del grupo de los triazoles (Hodiamont *et al.*, 2009; Howard *et al.*, 2009). Si el mecanismo implicado era de tipo TR₃₄/L98H/S297T/F495I eran resistentes a todos los DMIs usados excepto a IMZ. Por último, en aquellas cepas con mecanismos de resistencia a azoles TR₄₆/Y121F/T289A presentan resistencia frente a todos los DMIs empleados. En el caso de las cepas que poseen mutaciones tipo G54 presentan resistencia a ITC y POS pero no a VCZ (Díaz-Guerra *et al.*, 2003; Mann *et al.*, 2003). Las posibles variaciones de la mutación M220 genera resistencia a ITC y una disminución variable de la susceptibilidad a VCZ y POS (Mellado *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). La mutación G448S disminuye la susceptibilidad a ITC y POS pero confiere resistencia a VCZ (Howard *et al.*, 2009; Pelaez *et al.*, 2012b) y son muy resistentes a MET. De esta manera al observar un patrón de crecimiento determinado en base a los distintos perfiles de susceptibilidad a azoles clínicos y DMIs se aporta una información necesaria para identificar presuntamente el mecanismo de resistencia involucrado.

A pesar de que es necesaria una confirmación de la posible resistencia a azoles de la cepa evaluada al usar el método de cribaje descrito, esta metodología permite reducir considerablemente el tiempo requerido para poder proporcionar una respuesta temprana como un procedimiento de diagnóstico rápido de resistencia a azoles en *A. fumigatus*. Además, el método tiene una utilidad directa en estudios de vigilancia epidemiológica, como recomienda el ECDC (ECDC *et al.*, 2013).

El siguiente objetivo fue validar el método de cribado desarrollado en un estudio prospectivo de vigilancia epidemiológica en el Hospital Universitario Severo Ochoa. Para tener una imagen completa de las poblaciones de *Aspergillus* que se encuentran en el ecosistema hospitalario se realizó el aislamiento y análisis de todos los aislados, tanto de origen clínico como del ambiente hospitalario, durante tres años (2019-2021). En relación con las especies de *Aspergillus*, más de la mitad (51,94%) de las cepas fueron identificadas como *A. fumigatus* como sucede en otras partes del mundo (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013, 2018; van der Linden *et al.*, 2015; Escribano *et al.*, 2021; Ragozzino *et al.*, 2022). Este resultado está en consonancia con otros estudios de vigilancia españoles, aunque el orden de prevalencia del resto de especies de *Aspergillus* difiere (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013, 2018; Castro *et al.*, 2019) ya que en nuestro estudio al número de aislamientos de *A. fumigatus* le siguieron *A. niger*, *A. terreus* y *A. flavus*.

El cribado de toda la colección de cepas durante los tres años del estudio detectó dos cepas de *A. fumigatus* resistentes a los azoles, una de origen clínico y otra de origen ambiental. En ambas se identificó la presencia de mecanismos de resistencia a azoles tipo TR₃₄/L98H confirmando la presunción inicial de los resultados del método de cribaje en función del patrón de crecimiento que se había observado. Ambas cepas eran resistentes a todos los azoles y en ambas se identificó el mecanismo de resistencia a azoles TR₃₄/L98H, que es el mecanismo de resistencia a azoles más frecuente descrito en *A. fumigatus* (Mellado *et al.*, 2007; Rivero-Menendez *et al.*, 2016; Garcia-Rubio *et al.*, 2017). La prevalencia de *A. fumigatus* resistente a los azoles en este estudio fue del 1,15%, un nivel bajo en comparación con otros países de Europa (Morio *et al.*, 2012; van der Linden *et al.*, 2015; Buil *et al.*, 2019; Lavergne *et al.*, 2019) aunque encaja con estudios previos en España que van desde tasa de resistencia inferior al 1 % entre 2010 y 2011 (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013), del 1,2 % en 2016 (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2018) al 5,5 % en el estudio más reciente en 2021 (Escribano *et al.*, 2021).

El vínculo entre las infecciones de los pacientes y su posible adquisición de fuentes ambientales hospitalarias sigue en debate. En este trabajo se han empleado dos metodologías que por su simplicidad permiten una fácil integración en cualquier laboratorio de microbiología clínica, satisfaciendo todas las necesidades de vigilancia de la resistencia a los azoles, combinadas con un adecuado método de tipificación. La tipificación molecular, es una gran herramienta para complementar los estudios de vigilancia epidemiológica de *A. fumigatus* en los que se evalúa la resistencia a los azoles de una población concreta de aislados, ya que permite obtener una visión general de las poblaciones, así como establecer la relación entre aislados de distinta procedencia, clínica y ambiental. Para ello se utilizó una metodología estandarizada de tipificación molecular como es TRESPERG, que presenta un poder de discriminación similar al STRAf, el método que normalmente se utiliza como referencia (De Valk *et al.*, 2005; Garcia-Rubio *et al.*, 2016; Garcia-Rubio, Escribano, *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos mostraron que había una considerable diversidad genotípica en la población de *A. fumigatus* del estudio, al

Discusión

identificarse más del 72% de genotipos únicos. A pesar de que la diversidad genotípica era elevada en ambos entornos, tanto clínico como ambiental, las cepas de origen ambiental presentaban una mayor diversidad genotípica que las cepas de origen clínico, lo cual se encuentra en consonancia con los resultados obtenidos en otros estudios (Chazalet *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 2010; Guinea *et al.*, 2011). Además de encontrar que los genotipos de *A. fumigatus* eran muy diversos en ambos entornos, se encontraron genotipos idénticos tanto en los aislados clínicos como en el muestreo ambiental, lo que sugiere que los pacientes hospitalizados en diferentes partes del mismo hospital pueden infectarse con la misma cepa, e incluso plantea la posibilidad de que los pacientes puedan contaminar el ambiente con las cepas resistentes mediante la emisión de aerosoles (Lemaire *et al.*, 2018; Engel *et al.*, 2019).

El aislamiento de cepas resistentes a los azoles de un paciente y del entorno hospitalario es un hallazgo interesante que indica la necesidad de un mayor análisis de ambos ámbitos para detectar *A. fumigatus* resistentes a los azoles. Las dos cepas resistentes fueron genotípicamente diferentes y no presentaban ninguna vinculación genética con el resto de las cepas sensibles a los azoles incluidas en el estudio. Sin embargo, la comparación con los genotipos de una colección de cepas de *A. fumigatus* resistentes a los azoles de diferentes localizaciones de España mostró que todas las cepas resistentes a los azoles se asocian en grupos muy cercanos, como ya se ha descrito con anterioridad (Camps, Rijs, *et al.*, 2012; Chowdhary *et al.*, 2012; Garcia-Rubio, Monzon, *et al.*, 2018). En la actualidad se desconoce por qué estas cepas que presentan mecanismos de resistencia tipo TR₃₄/L98H presentan una estrecha relación genética, aunque existen diferentes hipótesis, como una posible mayor adaptación para persistir en el medio o una relación con mecanismos implicados en la inestabilidad genética de *A. fumigatus* (dos Reis *et al.*, 2018, 2019).

Los resultados obtenidos del genotipado de este estudio y el conocimiento de la cercanía entre cepas que poseen mecanismos de resistencia a azoles tipo TR₃₄/L98H se complementan con otros estudios empleando técnicas de secuenciación masiva (WGS) que muestran las diferentes relaciones a nivel filogenético entre una colección de diferentes aislados de *A. fumigatus* sensibles y resistentes a azoles (Garcia-Rubio *et al.*, 2018). Al añadir a los datos de la colección de aislados los conocimientos sobre susceptibilidad a antifúngicos no azólicos (Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021) se puede observar una imagen incluso más precisa de las relaciones filogenéticas entre las cepas ya que se forman tres subclados en los que coinciden las cepas resistentes a los antifúngicos no azólicos con las que tienen mecanismos de resistencia TR₃₄/L98H (**Figura 21, Anexo II**). Esta agrupación, a pesar de ser diferentes en cuanto a origen geográfico y año de aislamiento (más de 20 años de diferencia), sugiere la existencia de un nexo común, un punto de origen evolutivo según el cual las cepas se han desarrollado bajo unas circunstancias similares que confluyen en una combinación de mecanismos de multirresistencia antifúngica.

Se ha sugerido que estas cepas comparten ciertos mecanismos genéticos que contribuyen a una mejor adaptación al medio, proporcionándoles ventajas que les permiten persistir en condiciones de estrés durante años. Una de las posibles vías implicadas en este complejo proceso sería la inestabilidad genética debida a alteraciones en la vía de reparación del ADN (MMR), un mecanismo que está considerado como una posible causa de desarrollo de resistencias a azoles en *A. fumigatus* y otros patógenos fúngicos (Boyce *et al.*, 2017; Byun *et al.*, 2018; dos Reis *et al.*, 2018, 2019). Existen diferentes vías implicadas en la reparación del ADN, y

una de ellas es MMR, cuya función principal es el reconocimiento y reparación de los errores que tienen lugar durante la replicación del ADN (Iyer *et al.*, 2006; Li, 2008; Gupta y Heinen, 2019).

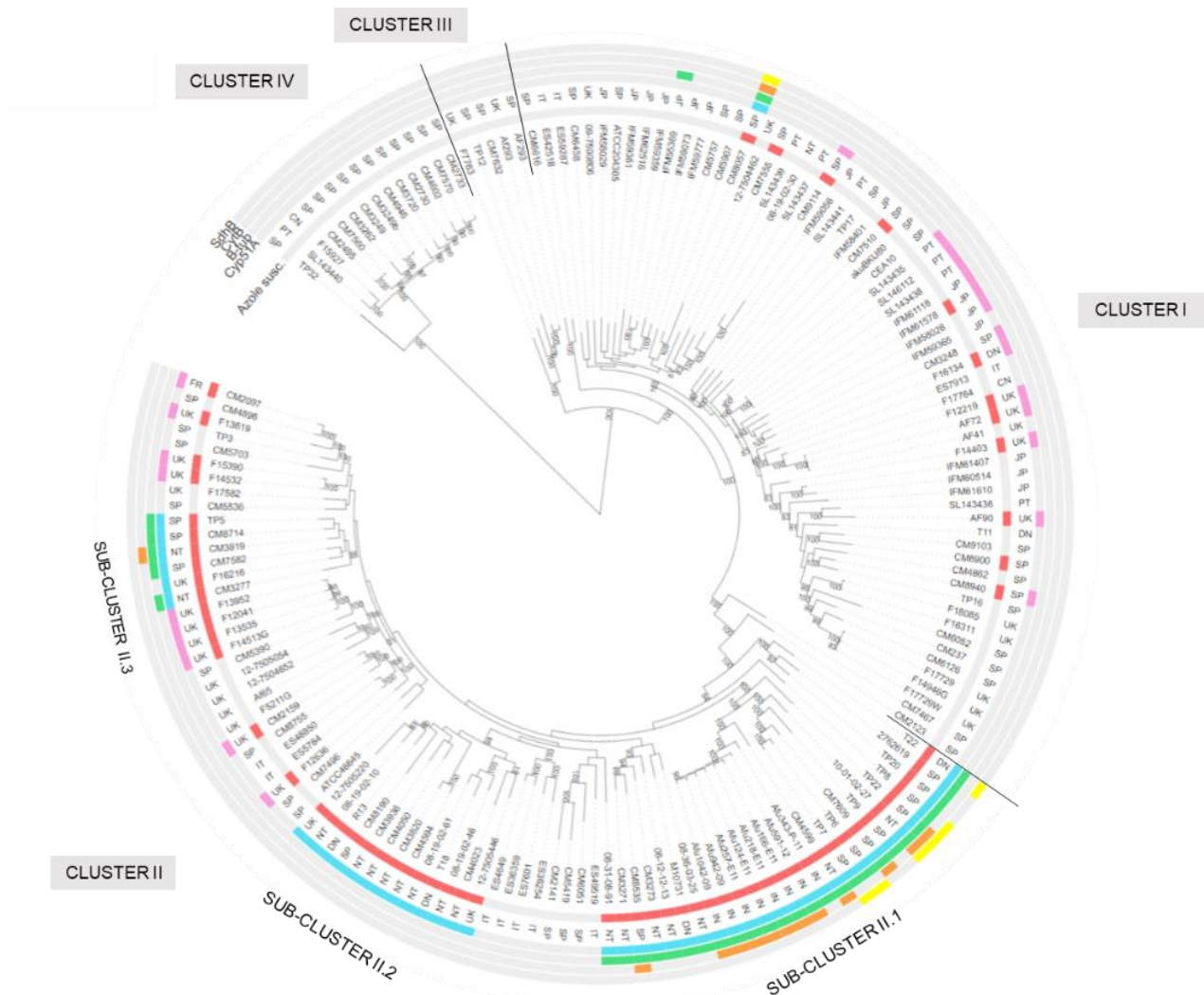


Figura 21: Árbol filogenético de una colección de 163 cepas de *A. fumigatus* analizadas por secuenciación masiva. En rojo las cepas resistentes a azoles clínicos, en rosa las cepas con mutaciones puntuales en Cyp51A, en azul las cepas con mecanismos de resistencia tipo TR, en verde las cepas resistentes a los MBCs, en naranja las cepas resistentes a los QoIs y en amarillo las cepas resistentes a los SDHIs (Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021).

Los genes que se encuentran implicados en esta vía de reparación del ADN son *mh1*, *msh1*, *msh2*, *msh3*, *msh4* o *msh6*, con una función muy conservada entre los hongos pertenecientes al filo *Ascomycota* (Phillips *et al.*, 2021). Las alteraciones de las funciones principales de reconocimiento y reparación de este mecanismo pueden estar directamente relacionadas con mutaciones en estos genes que alterarían sus funciones, favoreciendo la aparición de cepas con una capacidad limitada para corregir errores del ADN, pudiendo conferir un fenotipo hipermutador (Boyce KJ, 2022; Gambhir *et al.*, 2022).

Nuestro tercer objetivo fue el estudio de la implicación de los genes del MMR en el desarrollo de la resistencia a antifúngicos en *A. fumigatus*. Investigamos cuatro genes: *msh2*, *msh6*, *pms1*

Discusión

y *mlh1* para evaluar su posible implicación en la inestabilidad genética, y, por tanto, su posible contribución al desarrollo de resistencia a los antifúngicos. Entre los genes MMR seleccionados, *msh6* presentaba una mutación muy prevalente, G240A, presente en el 42.8 % de las cepas analizadas. Observamos variantes de *msh6* en aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus*, lo que contrasta con el 18.2% de variantes de *msh2* descritos previamente (dos Reis *et al.*, 2019). Curiosamente, observamos que todas las variantes de *msh6* se agruparon dentro del clado II, la mayoría de estas cepas también tenían un mecanismo de resistencia a los azoles TR₃₄/L98H y a la vez, muchas de ellas mutaciones que conducen a la resistencia a fungicidas no azólicos (Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021). En base a estos datos, especulamos si las mutaciones en *msh6* podrían contribuir, en cierta medida, al desarrollo de multiresistencia a los antifúngicos. Para evaluar esta hipótesis procedimos a eliminar el gen *msh6*. Al caracterizar fenotípicamente las cepas mutantes $\Delta msh6$ se observó que eran morfológicamente iguales a la cepa parental, *akuB*^{KU80}, no presentaban diferencias a nivel de susceptibilidad a azoles, no había diferencias en el crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés (oxidativo, de temperatura y de pared celular), y por último tampoco había diferencias entre las cepas en cuanto a la virulencia en el modelo alternativo de infección de *Galleria mellonella* (Gomez-Lopez *et al.*, 2014). Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente para los mutantes $\Delta msh2$ de *A. fumigatus*, que mostraron una reducción de la virulencia (dos Reis *et al.*, 2019). Sin embargo, nuestros resultados están en consonancia con estudios en *Candida glabrata* y *Cryptococcus neoformans*, que demostraron niveles de colonización e infección de mutantes $\Delta msh2$ similares a las cepas parentales (Healey *et al.*, 2016; Boyce *et al.*, 2017; Bordallo-Cardona *et al.*, 2019).

La ausencia de coste biológico de los mutantes $\Delta msh6$ junto con la abundancia de cepas con mutaciones G240A en *msh6* en los genomas de las cepas resistentes a múltiples antifúngicos sugiere que estos cambios podrían proporcionar algunos beneficios. Uno de ellos podría ser un aumento de la capacidad de adaptación a diferentes situaciones de estrés como la exposición a antifúngicos (Billmyre *et al.*, 2017; Boyce KJ, 2022). Así, decidimos investigar si una alteración de las funciones de la vía MMR, como es la eliminación del gen *msh6*, podría derivar en un fenotipo “hipermutador”, con una mayor tasa de mutación en comparación con su cepa parental (Gambhir *et al.*, 2022). Para evaluar las implicaciones de la eliminación de *msh6* en el desarrollo de resistencia a los antifúngicos, cultivamos aislados de $\Delta msh6$ y su cepa parental bajo la presión de antifúngicos azólicos y no azólicos.

La selección con azoles derivó en colonias mutantes que crecieron sólo en placas de agar suplementadas con POS. Sin embargo, el número de mutantes obtenidos no difirió significativamente de los obtenidos con la cepa parental, al contrario que se ha descrito con mutantes $\Delta msh2$ de *A. fumigatus*, en los que si encuentran una relación directa con el desarrollo de mutantes resistentes tras la exposición a POS (dos Reis *et al.*, 2019). En el caso de otros patógenos fúngicos como *C. glabrata*, *C. neoformans* o *C. deuterogattii*, se encuentran estudios en los que los resultados son contradictorios, algunos de estos estudios sugieren que no hay asociación entre las alteraciones en ciertos genes del MMR con un aumento de la frecuencia de resistencia a antifúngicos, mientras que otros estudios afirman que existe una vinculación entre las modificaciones en estos genes y la resistencia a antifúngicos (Dellière *et al.*, 2016; Healey *et al.*, 2016; Billmyre *et al.*, 2017; Boyce *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2018). Sin embargo, no encontramos mutantes resistentes a fármacos azólicos distintos a POS, lo que nos hace preguntarnos si este hallazgo podría estar relacionado con las condiciones del ensayo de

mutagénesis, muy diferentes de las que se dan en la naturaleza, o con mecanismos genéticos adicionales que sean necesarios para desarrollar otras mutaciones relacionadas con la resistencia a los azoles. Además, las alteraciones combinadas que aparecen en promotor y secuencia codificante de *cyp51A* responsables de la resistencia a múltiple a los azoles (TR₃₄/L98H o TR₄₆/Y121F/T289A) probablemente ocurren en ambientes naturales en un proceso secuencial de 2 o 3 pasos. Ya ha sido demostrado que las mutaciones individuales (TR₃₄ o L98H por separado y TR₄₆ o Y121F por separado) aumentan ligeramente las CMI a los azoles pero no confieren una resistencia completa (Mellado *et al.*, 2007; Snelders *et al.*, 2015). Por lo tanto, no sería posible aislar estos mutantes en un solo paso, sobre todo por las altas concentraciones de fármaco utilizadas en el estudio.

Por el contrario, el análisis de las frecuencias de mutación de las cepas $\Delta msh6$ de *A. fumigatus* mostró un aumento en las tasas de mutación en genes que confieren resistencia a los fungicidas no azólicos BCL y BNY. Las cepas $\Delta msh6$ produjeron 10 veces más mutantes resistentes a BCL y 2 veces más mutantes resistentes a BNY que la cepa parental. Aparte de las mayores tasas de mutación obtenidas con estos fungicidas no azólicos, se comprobó una mayor variedad de sustituciones de aminoácidos. Bajo la presión de BNY se identificaron las mutaciones más comunes en el gen *benA* para *A. fumigatus* E198A/Q y F200Y en los mutantes seleccionados, así como otras mutaciones como E198K/D/V/G y F200S que nunca se han descrito en aislados ambientales de *A. fumigatus* (Fraaije *et al.*, 2020; Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2022). De manera similar, bajo presión de BCL, se identificaron mutaciones comunes H270Y/R en *sdhB* previamente descritas, pero también cepas con la mutación H270L que nunca se han descrito en aislados ambientales de *A. fumigatus* (Fraaije *et al.*, 2020; Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2022). Este hallazgo está en consonancia con estudios previos que concluyen que la mutagénesis de laboratorio genera una amplia variedad de mutaciones, de las cuales sólo un subconjunto se encuentra de forma natural en cepas aisladas en el ambiente (Hawkins y Fraaije, 2016).

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que la adquisición de resistencia antifúngica en *A. fumigatus* podría encontrarse, como mínimo, parcialmente promovida por la inestabilidad genética causada por alteraciones en los genes implicados en el MMR, y en concreto, en el gen *msh6*. Esta hipótesis también está respaldada por hallazgos similares en otras especies de hongos, incluido *A. fumigatus* (Legrand *et al.*, 2007; Healey *et al.*, 2016; Boyce *et al.*, 2017; dos Reis *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos en este estudio aluden a que un fenotipo hipermutador en *A. fumigatus*, no solo no actúa en detrimento de la eficacia biológica y/o la virulencia del hongo, si no que, además podría proporcionarle una ventaja en ambientes expuestos a antifúngicos.

Como se ha mencionado con anterioridad en esta Tesis, *A. fumigatus* es la especie más frecuentemente aislada de su género y ocasiona la mayoría de los casos de AI en pacientes inmunocomprometidos (Brown *et al.*, 2012; Arastehfar *et al.*, 2021). Con menor frecuencia se han comenzado a describir casos de resistencia a los azoles en *A. flavus*, generando una preocupación similar ya que *A. flavus* es la segunda especie más comúnmente aislada, causando infecciones invasivas en pacientes inmunocomprometidos y la especie aislada con mayor frecuencia en algunas regiones del mundo (Rudramurthy *et al.*, 2019). Tanto el uso clínico de antifúngicos para tratar infecciones humanas por *A. flavus* como el uso de azoles en la agricultura

Discusión

plantean la preocupación sobre la aparición de resistencia a los azoles en este hongo. De hecho, ya se han empezado a detectar cepas resistentes, aunque la prevalencia de la resistencia a azoles de *A. flavus*, varía en función de los estudios. Este hecho podría ser consecuencia de las diferencias en los criterios para detectar la resistencia a azoles (Rudramurthy *et al.*, 2019). Los únicos puntos de corte clínicos establecidos para *A. flavus* son a ITC ($R > 1$ mg/L) y a ISV ($R > 2$ mg/L) (EUCAST 2020). Los puntos de corte epidemiológicos (ECOFFs) se utilizan para el resto de antifúngicos, y en general se consideran una dilución superior que para *A. fumigatus*: 0.5 mg/L para POS y 4 mg/L para VCZ. En este trabajo, se consideró resistencia a los azoles en las cepas de *A. flavus* sólo si estaba presente resistencia al ITC.

Bajo esta premisa, detectamos tres cepas (CM7668, CM8087 y CM9326) resistentes a ITC. Las cepas mostraron diferentes perfiles de susceptibilidad al resto de azoles, las cepas CM8087 y CM9326 presentaban elevadas CMIs frente a todos los azoles evaluados, pero CM7668 mostraba resistencia a ITC, susceptibilidad reducida a POS y sensibilidad a VCZ e ISV. Además, se evaluó la susceptibilidad a DMIs, encontrando que la cepa CM7668 era muy sensible a todos los DMIs empleados en el estudio, en contraposición a las cepas CM8087 y CM9326 que mostraban valores de CMIs muy elevados tanto para los imidazoles como para los triazoles incluidos.

Siguiendo lo establecido para *A. fumigatus*, una de las especies más estudiadas en cuanto a sustituciones de aminoácidos en las proteínas Cyp51, estudiamos las proteínas Cyp51 en *A. flavus*. Una particularidad de *A. flavus* es la existencia de un tercer parálogo de *cyp51*, denominado *cyp51C* (Liu *et al.*, 2012). Por norma general, la mayoría de las especies del género *Aspergillus*, entre otros hongos filamentosos, poseen dos proteínas, Cyp51A y Cyp51B, aunque algunas especies solo tienen una (Hawkins *et al.*, 2014). El análisis filogenético muestra que las proteínas Cyp51B y todos los Cyp51 de las especies con una sola enzima forman un subclado propio. Otro subclado contiene todos los Cyp51A e incluye la isoenzima Cyp51C de *A. flavus*. Este Cyp51C es relativamente similar al Cyp51A de *A. flavus* (77%), y de hecho, se ha descrito previamente en estudios filogenéticos como un segundo Cyp51A (Hawkins *et al.*, 2014). La existencia de Cyp51C en *A. flavus* podría explicar por qué *A. flavus* presenta CMIs más altas a todos los azoles que *A. fumigatus*, ya que sería necesaria la inhibición de las tres enzimas Cyp51. La peculiaridad de poseer tres parálogos de Cyp51 también se ha descrito en *Fusarium* spp. (Fan *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2019), aunque su isoenzima Cyp51C representa un subclado completamente aparte en el análisis filogenético (Hawkins *et al.*, 2014), además en *Fusarium graminearum* se ha demostrado que la proteína Cyp51C no codifica la 14- α esterol demetilasa (Fan *et al.*, 2013).

Tras llevar a cabo la secuenciación de *cyp51A*, *cyp51B* y *cyp51C*, empleando la secuencia de la cepa NRRL3357 de *A. flavus* como referencia (primera cepa con el genoma completo secuenciado) (Payne *et al.*, 2006), se puede afirmar que tanto *cyp51A* como *cyp51C* son genes muy polimórficos al encontrarse múltiples mutaciones puntuales, la mayoría compartidas entre cepas sensibles y resistentes a azoles. Sin embargo, si se encontraron dos mutaciones únicamente en cepas resistentes a ITC que podían estar implicadas en la resistencia a azoles en *A. flavus*.

La mutación P214L en Cyp51A, se encontró únicamente en la cepa CM7668 y con un patrón de resistencia cruzada a ITC y POS. La posición de esta mutación es equivalente a la mutación P216L en Cyp51A de *A. fumigatus*, mutación relacionada directamente con resistencia a azoles y con el

mismo patrón de resistencia (Camps *et al.*, 2012; Ballard *et al.*, 2018). En trabajos de modelos de homología de proteínas, se ha determinado que la mutación P216L en *A. fumigatus* afecta a la interacción de la enzima y el antifúngico, concretamente con POS pero no con VCZ (Xiao *et al.*, 2004). Tanto la similitud de la localización de la mutación como en los patrones de susceptibilidad entre la mutación P216L en *A. fumigatus* y la mutación P214L en *A. flavus* parecen indicar que esta mutación en Cyp51A sea la razón de la resistencia a azoles observada en la cepa CM7668. Esta mutación P216L en *A. fumigatus* ha sido vinculada con pacientes que tuvieron tratamientos previos con azoles (Camps *et al.*, 2012). Aunque desconocemos datos sobre el tratamiento que recibió el paciente del que procede la cepa CM7668, cabe destacar que esta cepa presenta un perfil de hipersusceptibilidad a DMIs por lo que se puede interpretar que esta mutación no ha sido seleccionada en el ambiente.

En Cyp51C solo se encontró una mutación (H349R) que estuviera exclusivamente en una cepa resistente (CM9326), aunque no hemos podido constatar cómo influye en la resistencia a azoles. Aunque hay otro ejemplo de una mutación en Cyp51C de *A. flavus* que está relacionada con la resistencia a azoles, la mutación Y319H (Paul *et al.*, 2015), es poco probable que esté relacionada con la resistencia, ya que según modelos de homología y dinámicas moleculares la posición en la que se encuentra esta mutación se aleja estructuralmente de zonas que están implicadas en la unión y acoplamiento de los azoles (Rudramurthy *et al.*, 2017).

En Cyp51B no se detectó ninguna mutación que generara un cambio de aminoácido, esto difiere con los resultados de otros trabajos en los que tras una exposición a voriconazol se obtuvieron colonias que presentaban mutaciones tanto en Cyp51A como en Cyp51B (Krishnan-Natesan *et al.*, 2008), a pesar de que posteriormente las mutaciones se detectaron tanto en cepas sensibles como resistentes a azoles, por lo que su implicación en la resistencia a azoles es poco probable.

Para poder tener una imagen más completa de las implicaciones de las diferentes isoenzimas de Cyp51 en la resistencia a azoles en *A. flavus*, se realizó un análisis de expresión génica de manera que se pudiera evaluar una posible relación de la expresión de estos genes en la resistencia a azoles de las cepas consideradas como resistentes. Los resultados obtenidos están en sintonía con un estudio previo (Rudramurthy *et al.*, 2017), confirmando que la expresión de *cyp51C* es minoritaria respecto a las otras dos isoenzimas de *cyp51*, por lo que se asume que la actividad de la diana de los azoles en *A. flavus* se debe prioritariamente a Cyp51A y Cyp51B. Un hallazgo interesante es el elevado nivel de expresión de *cyp51A* en la cepa CM9326, que podría ser una explicación a su perfil de resistencia.

La cepa CM8087 con un perfil de resistencia a todos los azoles no mostró mutaciones en ninguna de las tres enzimas, ni cambios en su expresión, que pudieran explicar o sugerir un mecanismo de resistencia a los azoles. Se están comenzando a explorar otros mecanismos, como la activación de los transportadores de la familia ABC o de la familia MFS que podrían ser responsables de una disminución de las concentraciones de los antifúngicos a nivel intracelular (Paul *et al.*, 2018). Los niveles de expresión de *cyp51A*, *cyp51B* o *cyp51C* en *A. flavus* no parecen estar relacionados con la resistencia a VCZ. De hecho, la expresión de estos genes no presenta variaciones entre las cepas WT y las cepas no WT, incluso al ser expuestas a azoles (Paul *et al.*, 2018). Además, la cepa CM8087 también era resistente a AmB y, por lo tanto, se esperaría un mecanismo de resistencia diferente, o una combinación de mecanismos. La existencia de

Discusión

resistencia cruzada entre azoles y AmB se ha analizado mejor en levaduras. Por ejemplo, en *Candida tropicalis*, las mutaciones en la esterol $\Delta 5,6$ -desaturasa (ERG3) junto con mutaciones en Erg11/Cyp51 generan un perfil de resistencia cruzada a azoles y AmB (Forastiero *et al.*, 2013). De forma genérica, la vía de síntesis de ergosterol es más compleja en hongos filamentosos y, particularmente aún no se ha estudiado en *A. flavus*. A pesar de la complejidad asociada al estudio de los mecanismos de resistencia a azoles en *A. flavus*, esta posibilidad merece consideración en futuras investigaciones.

APLICABILIDAD Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En el trabajo realizado en esta Tesis se estudian en profundidad diferentes aspectos relacionados con la resistencia de *Aspergillus* spp. a los antifúngicos, bajo una de las líneas de investigación del Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

El método de cribado desarrollado para detectar cepas de *A. fumigatus* resistentes a los azoles es fácil y rápido de realizar e interpretar, e incluso permite identificar presuntivamente el mecanismo de resistencia implicado. Por estas características tiene una fácil aplicación en estudios de vigilancia, incluso en estudios epidemiológicos a nivel local con gran cantidad de cepas. Hemos podido constatar que en España el número de cepas de *A. fumigatus* resistentes está creciendo de forma alarmante y este es un hecho muy preocupante, por lo que hay que seguir profundizando en cómo y dónde se están generando estas cepas resistentes.

El empleo de WGS ha permitido determinar que la población de cepas estudiadas de *A. fumigatus* se distribuyen en cuatro clados bien diferenciados. Los aislados que presentan multirresistencia a azoles se agrupan en el clado II, observándose la presencia de tres subclados que únicamente contienen cepas con los mecanismos de resistencia tipo TR, y con distancias genéticas muy reducidas. Además, sabemos que estas cepas no sólo presentan multirresistencia a los azoles clínicos, sino que también son resistentes a los DMIs y otros antifúngicos no azólicos de uso ambiental (Gonzalez-Jimenez *et al.*, 2021), lo que sugiere que su evolución sucede en ambientes tratados con todo tipo de antifúngicos ambientales. Por el contrario, las cepas con mutaciones puntuales en Cyp51A se distribuyen en todos los clados indistintamente, y al igual que los aislados salvajes.

Durante el desarrollo de este trabajo hemos aumentado el número de genomas de *A. fumigatus* incluidos en el WGS a 300, incluyendo cepas de diferentes orígenes geográficos, así como más cepas resistentes aisladas en España hasta el año 2022. En el análisis filogenético podemos observar que el patrón de agrupamiento continúa manteniéndose con todas las cepas multirresistente a los azoles con mecanismo TR (TR₃₄/L98H, TR₄₆/Y121F/T298A, TR₅₃ y TR₃₄/L98H/S297T/F495I) concentradas en el mismo clado II. Además, el patrón de mutaciones en *msh6* también se mantiene en Clado II, lo que refuerza las hipótesis desarrolladas en este trabajo (**Figura 22**).

En el futuro sería de gran importancia incluir los genomas de nuevas cepas clínicas resistentes a azoles que se han recibido en nuestro laboratorio, así como tratar de obtener muestras

ambientales que completasen el análisis de secuenciación masiva y nos permitieran obtener una imagen mucho más completa y realista de la agrupación de las cepas. El primero de estos pasos ya ha sido llevado a cabo, con el trabajo realizado en el entorno hospitalario, sin embargo, la toma de muestras ambientales es más complicada de llevar a cabo, puesto que sería necesario aislar cepas en grandes superficies y tomar muestras en invernaderos, compost y demás explotaciones agrícolas.

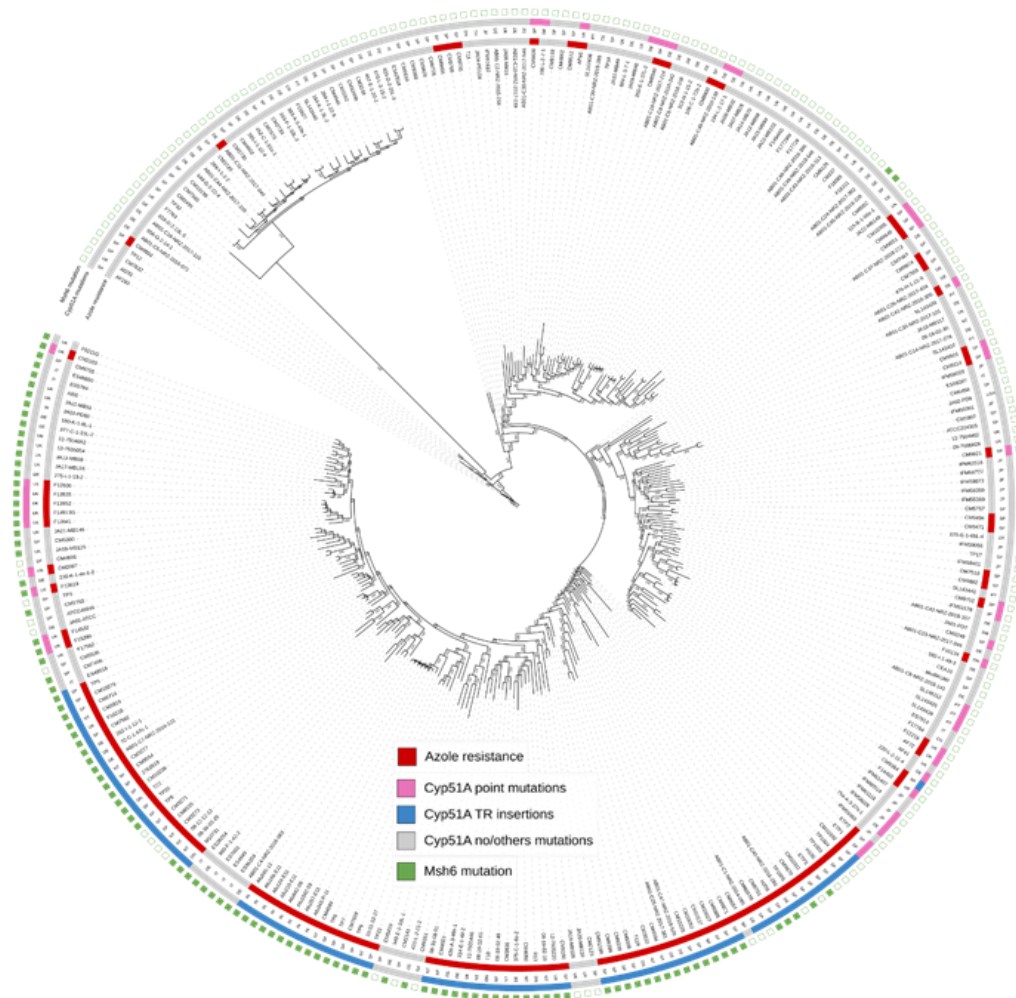


Figura 22: Árbol filogenético de una colección de 300 cepas de *A. fumigatus* analizadas por secuenciación masiva. En rojo las cepas resistentes a azoles clínicos, en rosa las cepas con mutaciones puntuales en Cyp51A, en azul las cepas con mecanismos de resistencia tipo TR, en verde las cepas resistentes con la mutación *msh6* (G240A).

Hemos empezado a investigar el fondo genético de las cepas con TRs, con el estudio de los genes del sistema de reparación del ADN, y hemos podido constatar que el desarrollo de la resistencia antifúngica en *A. fumigatus* podría estar favorecida, al menos parcialmente, por la inestabilidad genética causada por alteraciones en el mismo. El siguiente paso en esta línea de trabajo vendría por reproducir en el laboratorio las condiciones de exposición a fungicidas a las que se ve expuesto *A. fumigatus* en el campo. Recrear este ambiente de microevolución es un paso crucial para poder confirmar la ruta ambiental de aparición de resistencias y estudiar con exactitud qué moléculas en concreto son las que se ven más involucradas en producir este fenómeno. Recientemente varios estudios se han centrado en analizar los fenómenos de microevolución

Discusión

mediante los cuales se van acumulando mutaciones en las cepas que desembocan en fenotipos de resistencia (Ballard *et al.*, 2018, 2019). Algunos estudios, incluidos experimentos llevados a cabo en nuestro grupo, ya han intentado exponer a *A. fumigatus* a la presión selectiva de DMIs con el fin de generar mutantes resistentes aunque sin mucho éxito (Ren *et al.*, 2017; Cui *et al.*, 2019; Toyotome *et al.*, 2021). Este es un aspecto en el que la línea de investigación necesita profundizar para intentar conseguir las condiciones que simulen lo que está sucediendo en la naturaleza.

Por último, se empieza a detectar resistencia a los azoles en otras especies de *Aspergillus*, como en *A. flavus*, pero estos estudios son preliminares y sería necesario investigar más a fondo el papel de estas variaciones genéticas y su contribución a la resistencia a los antifúngicos.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado y validado un método de cribado fácil y rápido para detectar cepas de *A. fumigatus* resistentes a los azoles e identificar presuntivamente el mecanismo de resistencia subyacente. El método diseñado en este estudio puede implementarse en cualquier laboratorio de micología.

2. El método diseñado tiene un doble uso: (i) en laboratorios hospitalarios como indicador rápido de la susceptibilidad a los azoles de los aislados de *A. fumigatus*, y (ii) en estudios de vigilancia para incrementar el conocimiento de la epidemiología local de la resistencia de *A. fumigatus* a los azoles.

3. La utilidad del método se ha probado en un estudio prospectivo de vigilancia epidemiológica de tres años de duración, en el que se han detectado dos cepas de *A. fumigatus* resistentes a los azoles, con el mecanismo de resistencia TR₃₄/L98H. Este resultado confirma la utilidad del método y la importancia de estos estudios a gran escala.

4. El estudio de los genes del sistema de reparación del ADN de *A. fumigatus* apoya la hipótesis de que la adquisición de resistencia antifúngica en este hongo podría estar favorecida, al menos parcialmente, por la inestabilidad genética causada por las alteraciones presentes en el mismo.

5. Los resultados obtenidos con los mutantes delecionados en *msh6* sugieren que un fenotipo "hipermutador" de *A. fumigatus* podría proporcionar una ventaja en ambientes expuestos a múltiples antifúngicos, sin coste biológico aparente ni cambios en la virulencia fúngica.

6. El estudio de los mecanismos de resistencia a los azoles de los aislados clínicos de *A. flavus* sugiere que estos mecanismos parecen estar asociados a mutaciones en dos dianas de los azoles, Cyp51A y Cyp51C. El aumento de la expresión del gen *cyp51A*, se contempla como posible mecanismo de resistencia, aunque los estudios son preliminares y sería necesario investigar más a fondo el papel de estas variaciones genéticas y su contribución a la resistencia a los antifúngicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Abad, A., Victoria Fernández-Molina, J., Bikandi, J., Ramírez, A., Margareto, J., Sendino, J., Luis Hernando, F., Pontón, J., Garaizar, J. y Rementeria, A. (2010) "¿Qué hace que *Aspergillus fumigatus* sea un patógeno de éxito? Genes y moléculas involucrados en la aspergilosis invasora", *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(4), pp. 155-182. doi:10.1016/j.riam.2010.10.003.

Abdolrasouli, A., Rhodes, J., Beale, M. A., Hagen, F., Rogers, T. R., Chowdhary, A., Meis, J. F., Armstrong-James, D. y Fisher, M. C. (2015) "Genomic Context of Azole Resistance Mutations in *Aspergillus fumigatus* Determined Using Whole-Genome Sequencing.", *mBio*. United States, 6(3), p. e00536. doi:10.1128/mBio.00536-15.

Agarwal, R., Chakrabarti, A., Shah, A., Gupta, D., Meis, J. F., Guleria, R., Moss, R., Denning, D. W. y group, A. complicating asthma I. working (2013) "Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria", *Clinical & Experimental Allergy*. John Wiley & Sons, Ltd, 43(8), pp. 850-873. doi:https://doi.org/10.1111/cea.12141.

Ahangarkani, F., Puts, Y., Nabili, M., Khodavaisy, S., Moazeni, M., Salehi, Z., Laal Kargar, M., Badali, H. y Meis, J. F. (2020) "First azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in Iran", *Mycoses*, 63(5), pp. 430-436. doi:10.1111/myc.13064.

Aigner, M. y Lass-Flörl, C. (2020) "Encochleated amphotericin B: Is the oral availability of amphotericin B finally reached?", *Journal of Fungi*, 6(2). doi:10.3390/jof6020066.

Alanio, A., Desnos-Ollivier, M., Garcia-Hermoso, D. y Bretagne, S. (2017) "Investigating Clinical Issues by Genotyping of Medically Important Fungi: Why and How?", *Clinical microbiology reviews*. United States, 30(3), pp. 671-707. doi:10.1128/CMR.00043-16.

Alastruey-Izquierdo, A., Alcazar-Fuoli, L., Rivero-Menéndez, O., Ayats, J., Castro, C., García-Rodríguez, J., Gotteris-Bonet, L., Ibáñez-Martínez, E., Linares-Sicilia, M. J., Teresa Martín-Gomez, M., Martín-Mazuelos, E., Peláez, T., Peman, J., Rezusta, A., Rojo, S., Tejero, R., Anza, D. V., Viñuelas, J., Zapico, M. S. y Cuenca-Estrella, M. (2018) "Molecular identification and susceptibility testing of molds isolated in a prospective surveillance of triazole resistance in Spain (FILPOP2 Study)", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(9), pp. 1-11. doi:10.1128/AAC.00358-18.

Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E. y Cuenca-Estrella, M. (2012) "Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: Recommendations for routine daily practice", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1273(1), pp. 18-24. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06822.x.

Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E., Peláez, T., Pemán, J., Zapico, S., Alvarez, M., Rodríguez-Tudela, J. L. y Cuenca-Estrella, M. (2013) "Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study)", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), pp. 3380-3387. doi:10.1128/AAC.00383-13.

Albehajjani, S. H. I., MacReadie, I., Morrissey, C. O. y Boyce, K. J. (2022) "Molecular mechanisms underlying the emergence of polygenetic antifungal drug resistance in *msh2* mismatch repair mutants of *Cryptococcus*", *JAC-Antimicrobial Resistance*, 4(2), pp. 7-10. doi:10.1093/jacamr/dlac033.

Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M. y Rodríguez-Tudela, J. L. (2008) "*Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), pp. 1244-1251.

doi:10.1128/AAC.00942-07.

Alexandre, A., Odile, C., Emilie, S., Jean-Marc, C., Sylvain, B., Catherine, C. y Stéphane, B. (2012) "Azole Preexposure Affects the *Aspergillus fumigatus* Population in Patients", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, 56(9), pp. 4948-4950. doi:10.1128/aac.05990-11.

Alvarez-Moreno, C., Lavergne, R.-A., Hagen, F., Morio, F., Meis, J. F. y Le Pape, P. (2019) "Fungicide-driven alterations in azole-resistant *Aspergillus fumigatus* are related to vegetable crops in Colombia, South America.", *Mycologia*. England, 111(2), pp. 217-224. doi:10.1080/00275514.2018.1557796.

Amaiike, S. y Keller, N. P. (2011) " *Aspergillus flavus* ", *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), pp. 107-133. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095221.

Amona, F. M., Oladele, R. O., Resendiz-Sharp, A., Denning, D. W., Kosmidis, C., Lagrou, K., Zhong, H. y Han, L. (2022) "Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates in Africa: a systematic review", *Medical Mycology*, 60(8), p. myac059. doi:10.1093/mmy/myac059.

Anderson, J. B. (2005) "Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness.", *Nature reviews. Microbiology*. England, 3(7), pp. 547-556. doi:10.1038/nrmicro1179.

Angulo, D. A., Alexander, B., Rautemaa-Richardson, R., Alastruey-Izquierdo, A., Hoenigl, M., Ibrahim, A. S., Ghannoum, M. A., King, T. R., Azie, N. E. y Walsh, T. J. (2022) "Ibrexafungerp, a Novel Triterpenoid Antifungal in Development for the Treatment of Mold Infections", *Journal of Fungi*, 8(11). doi:10.3390/jof8111121.

Arastehfar, A., Carvalho, A., Houbraken, J., Lombardi, L., Garcia-Rubio, R., Jenks, J. D., Rivero-Menendez, O., Aljohani, R., Jacobsen, I. D., Berman, J., Oshero, N., Hedayati, M. T., Ilkit, M., James-Armstrong, D., Gabaldón, T., Meletiadis, J., Kostrzewa, M., Pan, W., Lass-Flörl, C., Perlin, D. S. y Hoenigl, M. (2021) " *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics", *Studies in Mycology*, 100(2021). doi:10.1016/j.simyco.2021.100115.

Araujo, R., Amorim, A. y Gusmão, L. (2010) "Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor hospital environments", *Medical Mycology*, 48(6), pp. 832-838. doi:10.3109/13693780903575360.

Arendrup, M. C., Friberg, N., Mares, M., Kahlmeter, G., Meletiadis, J., Guinea, J., Andersen, C. T., Arikian-Akdagli, S., Barchiesi, F., Chryssanthou, E., Hamal, P., Järv, H., Klimko, N., Kurzai, O., Lagrou, K., Lass-Flörl, C., Matos, T., Muehlethaler, K., Rogers, T. R. y Velegriaki, A. (2020) "How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST)", *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 26(11), pp. 1464-1472. doi:10.1016/j.cmi.2020.06.007.

Arendrup, M. C., Verweij, P. E., Mouton, J. W., Lagrou, K. y Meletiadis, J. (2017) "Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), pp. 3325-3333. doi:10.1093/jac/dkx319.

Aruanno, M., Glampedakis, E. y Lamoth, F. (2019) "Echinocandins for the treatment of invasive aspergillosis: From laboratory to bedside", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(8), pp. 1-13. doi:10.1128/AAC.00399-19.

Asadzadeh, M., Alobaid, K. y Ahmad, S. (2023) "First Report of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* with TR 46 / Y121F / T289A Mutations in Kuwait and an Update on Their Occurrence

Bibliografía

in the Middle East".

Bader, O., Tünnermann, J., Dudakova, A., Tangwattanachuleeporn, M., Weig, M. y Groß, U. (2015) "Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 59(7), pp. 4356-4359. doi:10.1128/AAC.00100-15.

Bain, J. M., Tavanti, A., Davidson, A. D., Jacobsen, M. D., Shaw, D., Gow, N. A. R. y Odds, F. C. (2007) "Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*.", *Journal of clinical microbiology*. United States, 45(5), pp. 1469-1477. doi:10.1128/JCM.00064-07.

Balajee, S. A., Gribskov, J. L., Hanley, E., Nickle, D. y Marr, K. A. (2005) "*Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*", *Eukaryotic Cell*, 4(3), pp. 625-632. doi:10.1128/EC.4.3.625-632.2005.

Balba, H. (2007) "Review of strobilurin fungicide chemicals", *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 42(4), pp. 441-451. doi:10.1080/03601230701316465.

Ballard, E., Melchers, W. J. G., Zoll, J., Brown, A. J. P., Verweij, P. E. y Warris, A. (2018) "In-host microevolution of *Aspergillus fumigatus*: A phenotypic and genotypic analysis.", *Fungal genetics and biology : FG & B*. United States, 113, pp. 1-13. doi:10.1016/j.fgb.2018.02.003.

Ballard, E., Weber, J., Melchers, W. J. G., Tammireddy, S., Whitfield, P. D., Brakhage, A. A., Brown, A. J. P., Verweij, P. E. y Warris, A. (2019) "Recreation of in-host acquired single nucleotide polymorphisms by CRISPR-Cas9 reveals an uncharacterised gene playing a role in *Aspergillus fumigatus* azole resistance via a non-cyp51A mediated resistance mechanism.", *Fungal genetics and biology : FG & B*. United States, 130, pp. 98-106. doi:10.1016/j.fgb.2019.05.005.

Balloy, V. y Chignard, M. (2009) "The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*", *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS, 11(12), pp. 919-927. doi:10.1016/j.micinf.2009.07.002.

Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E. y Melchers, W. J. G. (2020) "Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp.", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(1), pp. 1-31. doi:10.1128/membr.00049-19.

Banerjee, Sabyasachi, Mukherjee, Sougata, Nath, P., Mukherjee, A., Mukherjee, Souvik, Ashok Kumar, S. K., De, S. y Banerjee, Subhasis (2023) "A critical review of benzimidazole: Sky-high objectives towards the lead molecule to predict the future in medicinal chemistry", *Results in Chemistry*, 6(April), p. 101013. doi:10.1016/j.rechem.2023.101013.

Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M. y Parr-Dobrzanski, B. (2002) "The strobilurin fungicides", *Pest Management Science*, 58(7), pp. 649-662. doi:10.1002/ps.520.

Bassetti, M., Azoulay, E., Kullberg, B. J., Ruhnke, M., Shoham, S., Vazquez, J., Giacobbe, D. R. y Calandra, T. (2021) "EORTC/MSGERC Definitions of Invasive Fungal Diseases: Summary of Activities of the Intensive Care Unit Working Group", *Clinical Infectious Diseases*, 72(Suppl 2), pp. S121-S127. doi:10.1093/cid/ciaa1751.

Billmyre, R. B., Clancey, S. A. y Heitman, J. (2017) "Natural mismatch repair mutations mediate phenotypic diversity and drug resistance in *Cryptococcus deuterogattii*", *eLife*, 6, pp. 1-23. doi:10.7554/eLife.28802.

Boiteux, S. y Jinks-Robertson, S. (2013) "DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*", *Genetics*, 193(4), pp. 1025-1064. doi:10.1534/genetics.112.145219.

- Bordallo-Cardona, M. Á., Agnelli, C., Gómez-Nuñez, A., Sánchez-Carrillo, C., Bouza, E., Muñoz, P., Escribano, P. y Guinea, J. (2019) "MSH2 Gene Point Mutations Are Not Antifungal Resistance Markers in *Candida glabrata*.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(1). doi:10.1128/AAC.01876-18.
- Bosch, F. Van Den, Oliver, R., Berg, F. Van Den y Paveley, N. (2014) "Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics", *Annual Review of Phytopathology*, 52, pp. 175-195. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-050158.
- Bosetti, D. y Neofytos, D. (2023) "Invasive Aspergillosis and the Impact of Azole-resistance", *Current Fungal Infection Reports*. Springer US, 17(2), pp. 77-86. doi:10.1007/s12281-023-00459-z.
- Bossche, H. Vanden, Koymans, L. y Moereels, H. (1995) "P450 inhibitors of use in medical treatment: Focus on mechanisms of action", *Pharmacology and Therapeutics*, 67(1), pp. 79-100. doi:10.1016/0163-7258(95)00011-5.
- Bouillaud, F. (2023) "Inhibition of Succinate Dehydrogenase by Pesticides (SDHIs) and Energy Metabolism", *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4). doi:10.3390/ijms24044045.
- Boyce, K. J. (2022) "Mutators Enhance Adaptive Micro-Evolution in Pathogenic Microbes", *Microorganisms*, 10(2). doi:10.3390/microorganisms10020442.
- Boyce, K. J., Wang, Y., Verma, S., Shakya, V. P. S., Xue, C. y Idnurm, A. (2017) "Mismatch repair of DNA replication errors contributes to microevolution in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*", *mBio*, 8(3). doi:10.1128/mBio.00595-17.
- Boyer, J., Feys, S., Zsifkovits, I., Hoenigl, M. y Egger, M. (2023) "Treatment of Invasive Aspergillosis: How It's Going, Where It's Heading", *Mycopathologia*. Springer Netherlands, 0123456789. doi:10.1007/s11046-023-00727-z.
- Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S. y Medoff, G. (1990) "Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 34(2), pp. 183-188. doi:10.1128/AAC.34.2.183.
- Brauer, V. S., Rezende, C. P., Pessoni, A. M., De Paula, R. G., Rangappa, K. S., Nayaka, S. C., Gupta, V. K. y Almeida, F. (2019) "Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health", *Biomolecules*, 9(10), pp. 1-21. doi:10.3390/biom9100521.
- Bromley, M. J., van Muijlwijk, G., Fraczek, M. G., Robson, G., Verweij, P. E., Denning, D. W. y Bowyer, P. (2014) "Occurrence of azole-resistant species of *Aspergillus* in the UK environment.", *Journal of global antimicrobial resistance*. Netherlands, 2(4), pp. 276-279. doi:10.1016/j.jgar.2014.05.004.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G. y White, T. C. (2012) "Hidden killers: Human fungal infections", *Science Translational Medicine*, 4(165). doi:10.1126/scitranslmed.3004404.
- Bueid, A., Howard, S. J., Moore, C. B., Richardson, M. D., Harrison, E., Bowyer, P. y Denning, D. W. (2010) "Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(10), pp. 2116-2118. doi:10.1093/jac/dkq279.
- Bueid, A., Moore, C. B., Denning, D. W. y Bowyer, P. (2013) "High-level expression of *cyp51B* in azole-resistant clinical *aspergillus fumigatus* isolates", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), pp. 512-514. doi:10.1093/jac/dks451.
- Buil, J. B., van der Lee, H. A. L., Rijs, A. J. M. M., Zoll, J., Hovestadt, J. A. M. F., Melchers, W. J. G.

Bibliografía

- y Verweij, P. E. (2017) "Single-Center Evaluation of an Agar-Based Screening for Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* by Using VIPcheck.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(12). doi:10.1128/AAC.01250-17.
- Buil, J. B., Snelders, E., Denardi, L. B., Melchers, W. J. G. y Verweij, P. E. (2019) "Trends in Azole Resistance in the Netherlands 1994-2016", *Emerging Infectious Diseases*, 25(1), pp. 176-178.
- Burks, C., Darby, A., Gómez Londoño, L., Momany, M. y Brewer, M. T. (2021) "Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment: Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance.", *PLoS pathogens*. United States, 17(7), p. e1009711. doi:10.1371/journal.ppat.1009711.
- Bus, V. G. (1992) "ED50 levels of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* with reduced sensitivity to thiabendazole, benomyl and imazalil", *Postharvest Biology and Technology*, 1(4), pp. 305-315. doi:10.1016/0925-5214(92)90033-L.
- Byun, S. A., Won, E. J., Kim, M. N., Lee, W. G., Lee, K., Lee, H. S., Uh, Y., Healey, K. R., Perlin, D. S., Choi, M. J., Kim, S. H. y Shin, J. H. (2018) "Multilocus sequence typing (MLST) genotypes of *Candida glabrata* bloodstream isolates in Korea: Association with antifungal resistance, mutations in mismatch repair gene (*Msh2*), and clinical outcomes", *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), pp. 1-10. doi:10.3389/fmicb.2018.01523.
- Cairns, T. C., Nai, C. y Meyer, V. (2018) "How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research", *Fungal Biology and Biotechnology*. BioMed Central, 5(1), pp. 1-14. doi:10.1186/s40694-018-0054-5.
- Camps, S. M. T., Van Der Linden, J. W. M., Li, Y., Kuijper, E. J., Van Dissel, J. T., Verweij, P. E. y Melchers, W. J. G. (2012) "Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: A case study and review of the literature", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), pp. 10-16. doi:10.1128/AAC.05088-11.
- Camps, S. M. T., Rijs, A. J. M. M., Klaassen, C. H. W., Meis, J. F., O'Gorman, C. M., Dyer, P. S., Melchers, W. J. G. y Verweij, P. E. (2012) "Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates harboring the TR34/L98H azole resistance mechanism", *Journal of Clinical Microbiology*, 50(8), pp. 2674-2680. doi:10.1128/JCM.00335-12.
- Cao, D., Wu, R., Dong, S., Wang, F., Ju, C., Yu, S., Xu, S., Fang, H. y Yu, Y. (2020) "Five-Year Survey (2014 to 2018) of Azole Resistance in Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates from China.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 64(10). doi:10.1128/AAC.00904-20.
- Carmona, E. M. y Limper, A. H. (2017) "Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections", *Clinics in Chest Medicine*, 38(3), pp. 393-402. doi:10.1016/j.ccm.2017.04.003.
- Castro, C., Galán-Sánchez, F., Linares, M. J., Tejero, R., Ruiz, M., Serrano, M. L., Rodríguez-Iglesias, M. y Martín-Mazuelos, E. (2019) "A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: Species identification and susceptibility patterns", *Medical Mycology*, 57(4), pp. 412-420. doi:10.1093/mmy/myy080.
- Chakraborty, R. K. y Baradhi, K. M. (2023) "Aspergilloma.", en. Treasure Island (FL).
- Chazalet, V., Debeauvais, J. P., Sarfati, J., Lortholary, J., Ribaud, P., Shah, P., Cornet, M., Vu Thien, H., Gluckman, E., Brücker, G. y Latgé, J. P. (1998) "Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings", *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), pp. 1494-1500. doi:10.1128/jcm.36.6.1494-1500.1998.
- Chen, J., Li, H., Li, R., Bu, D. y Wan, Z. (2005) "Mutations in the *cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma",

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 55(1), pp. 31-37. doi:10.1093/jac/dkh507.

Chen, S., Wang, Y., Schnabel, G., Peng, C. A., Lagishetty, S., Smith, K., Luo, C. y Yuan, H. (2018) "Inherent resistance to 14a-demethylation inhibitor fungicides in *Colletotrichum truncatum* is likely linked to CYP51A and/or CYP51B gene variants", *Phytopathology*, 108(11), pp. 1263-1275. doi:10.1094/PHYTO-02-18-0054-R.

Chen, Y., Dong, F., Zhao, J., Fan, H., Qin, C., Li, R., Verweij, P. E., Zheng, Y. y Han, L. (2020) "High azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from Strawberry Fields, China, 2018", *Emerging Infectious Diseases*, 26(1), pp. 81-89. doi:10.3201/eid2601.190885.

Chen, Y., Lu, Z., Zhao, Jingjun, Zou, Z., Gong, Y., Qu, F., Bao, Z., Qiu, G., Song, M., Zhang, Q., Liu, L., Hu, M., Han, X., Tian, S., Zhao, Jingya, Chen, F., Zhang, C., Sun, Y., Verweij, P. E., Huang, L. y Han, L. (2016) "Epidemiology and Molecular Characterizations of Azole Resistance in Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates from China.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 60(10), pp. 5878-5884. doi:10.1128/AAC.01005-16.

Chowdhary, A., Kathuria, S., Xu, J., Sharma, C., Sundar, G., Singh, P. K., Gaur, S. N., Hagen, F., Klaassen, C. H. y Meis, J. F. (2012) "Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR₃₄/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India.", *PLoS one*. United States, 7(12), p. e52871. doi:10.1371/journal.pone.0052871.

Chowdhary, A., Sharma, C., Hagen, F. y Meis, J. F. (2014) "Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms", *Future Microbiology*, 9(5), pp. 697-711. doi:10.2217/fmb.14.27.

Chowdhary, A., Sharma, C. y Meis, J. F. (2017) "Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment", *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_3), pp. S436-S444. doi:10.1093/infdis/jix210.

Cowen, L. E., Kohn, L. M. y Anderson, J. B. (2001) "Divergence in fitness and evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*", *Journal of Bacteriology*, 183(10), pp. 2971-2978. doi:10.1128/JB.183.10.2971-2978.2001.

Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D. y Perlin, D. S. (2015) "Mechanisms of antifungal drug resistance", *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), pp. 1-22. doi:10.1101/cshperspect.a019752.

Cui, N., He, Y., Yao, S., Zhang, H., Ren, J., Fang, H. y Yu, Y. (2019) "Tebuconazole induces triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* in liquid medium and soil.", *The Science of the total environment*. Netherlands, 648, pp. 1237-1243. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.247.

Dabas, Y., Xess, I., Bakshi, S., Mahapatra, M. y Seth, R. (2018) "Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* from Immunocompromised Hosts in India.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 62(8). doi:10.1128/AAC.02264-17.

Dahal, B. K., Kadyrova, L. Y., Delfino, K. R., Rogozin, I. B., Gujar, V., Lobachev, K. S. y Kadyrov, F. A. (2017) "Involvement of DNA mismatch repair in the maintenance of heterochromatic DNA stability in *Saccharomyces cerevisiae*", *PLOS Genetics*. Public Library of Science, 13(10), p. e1007074. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007074>.

Dannaoui, E., Meletiadiis, J., Tortorano, A. M., Symoens, F., Nolard, N., Viviani, M. A., Piens, M. A., Lebeau, B., Verweij, P. E. y Grillot, R. (2004) "Susceptibility testing of sequential isolates of *Aspergillus fumigatus* recovered from treated patients", *Journal of Medical Microbiology*, 53(2), pp. 129-134. doi:10.1099/jmm.0.05326-0.

Dellière, S., Healey, K., Gits-Muselli, M., Carrara, B., Barbaro, A., Guigue, N., Lecefel, C., Touratier,

Bibliografía

S., Desnos-Ollivier, M., Perlin, D. S., Bretagne, S. y Alanio, A. (2016) "Fluconazole and echinocandin resistance of *Candida glabrata* correlates better with antifungal drug exposure rather than with MSH2 mutator genotype in a french cohort of patients harboring low rates of resistance", *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC), pp. 1-9. doi:10.3389/fmicb.2016.02038.

Denning, D. W. (2022) "Antifungal drug resistance: an update", *European Journal of Hospital Pharmacy*, 29(2), pp. 109-112. doi:10.1136/ejhpharm-2020-002604.

Denning, D. W., Cadranel, J., Beigelman-Aubry, C., Ader, F., Chakrabarti, A., Blot, S., Ullmann, A. J., Dimopoulos, G. y Lange, C. (2016) "Chronic pulmonary aspergillosis: Rationale and clinical guidelines for diagnosis and management", *European Respiratory Journal*, 47(1), pp. 45-68. doi:10.1183/13993003.00583-2015.

Denning, D. W. y Chakrabarti, A. (2017) "Pulmonary and sinus fungal diseases in non-immunocompromised patients", *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 17(11), pp. e357-e366. doi:10.1016/S1473-3099(17)30309-2.

Denning, D. W., Page, I. D., Chakaya, J., Jabeen, K., Jude, C. M., Cornet, M., Alastruey-Izquierdo, A., Bongomin, F., Bowyer, P., Chakrabarti, A., Gago, S., Guto, J., Hochhegger, B., Hoenigl, M., Irfan, M., Irurhe, N., Izumikawa, K., Kirenga, B., Manduku, V., Moazam, S., Oladele, R. O., Richardson, M. D., Rodriguez Tudela, J. L., Rozaliyani, A., Salzer, H. J. F., Sawyer, R., Simukulwa, N. F., Skrahina, A., Sriruttan, C., Setianingrum, F., Wilopo, B. A. P., Cole, D. C. y Getahun, H. (2018) "Case definition of chronic pulmonary aspergillosis in resource-constrained settings", *Emerging Infectious Diseases*, 24(8), pp. e1-e13. doi:10.3201/eid2408.171312.

Denning, D. W., Venkateswarlu, K., Oakley, K. L., Anderson, M. J., Manning, N. J., Stevens, D. A., Warnock, D. W. y Kelly, S. L. (1997) "Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 41(6), pp. 1364-1368. doi:10.1128/AAC.41.6.1364.

Diaz-Guerra, T. M., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M. y Rodriguez-Tudela, J. L. (2003) "A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(3), pp. 1120-1124. doi:10.1128/aac.47.3.1120-1124.2003.

Doughty, K. J., Sierotzki, H., Semar, M. y Goertz, A. (2021) "Selection and amplification of fungicide resistance in *aspergillus fumigatus* in relation to DMI fungicide use in agronomic settings: Hotspots versus coldspots", *Microorganisms*, 9(12). doi:10.3390/microorganisms9122439.

Ecdc, W., Europa, Eu, Kleinkauf, N., Verweij, P., Arendrup, M. C., Donnelly, P., Cuenca-Estrella, M., Fraaije, B., Melchers, W., Adriaenssens, N., Kema, G., Ullmann, A., Bowyer, P. y Denning, D. (2013) "Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. ECDC, Stockholm, Sweden (2013)", *European Centre for Disease Control Technical Report*. doi:10.2900/76274.

El-Baba, F., Gao, Y. y Soubani, A. O. (2020) "Pulmonary Aspergillosis: What the Generalist Needs to Know", *American Journal of Medicine*. Elsevier Inc., 133(6), pp. 668-674. doi:10.1016/j.amjmed.2020.02.025.

Engel, T. G. P., Erren, E., Vanden Driessche, K. S. J., Melchers, W. J. G., Reijers, M. H., Merkus, P. y Verweij, P. E. (2019) "Aerosol Transmission of *Aspergillus fumigatus* in Cystic Fibrosis Patients in the Netherlands.", *Emerging infectious diseases*. United States, 25(4), pp. 797-799. doi:10.3201/eid2504.181110.

Ermiler, S., Scholze, M. y Kortenkamp, A. (2013) "Seven benzimidazole pesticides combined at

sub-threshold levels induce micronuclei in vitro", *Mutagenesis*, 28(4), pp. 417-426. doi:10.1093/mutage/get019.

Escribano, P., Peláez, T., Munoz, P., Bouza, E. y Guinea, J. (2013) "Is azole resistance in aspergillus fumigatus a problem in Spain?", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), pp. 2815-2820. doi:10.1128/AAC.02487-12.

Escribano, P., Rodríguez-Sánchez, B., Díaz-García, J., Martín-Gómez, M. T., Ibáñez-Martínez, E., Rodríguez-Mayo, M., Peláez, T., García-Gómez de la Pedrosa, E., Tejero-García, R., Marimón, J. M., Reigadas, E., Rezusta, A., Labayru-Echeverría, C., Pérez-Ayala, A., Ayats, J., Cobo, F., Pazos, C., López-Soria, L., Alastruey-Izquierdo, A., Muñoz, P. y Guinea, J. (2021) "Azole resistance survey on clinical Aspergillus fumigatus isolates in Spain.", *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. England, 27(8), pp. 1170.e1-1170.e7. doi:10.1016/j.cmi.2020.09.042.

Escribano, P., Rodríguez-Sánchez, B., Díaz-García, J., Martín-Gómez, M. T., Ibáñez, E., Rodríguez-Mayo, M., Peláez, T., García-Gómez de la Pedrosa, E., Tejero-García, R., Marimón, J. M., Reigadas, E., Rezusta, A., Labayru-Echeverría, C., Pérez-Ayala, A., Ayats, J., Cobo, F., Pazos, C., López-Soria, L., Alastruey-Izquierdo, A., Muñoz, P., Guinea, J., Sánchez-Yebra, W., Sánchez-Gómez, J., Lozano, I., Marfil, E., Muñoz de la Rosa, M., García, R. T., Castro, C., López, C., Castelló-Abietar, C., Costales, I., Serra, J. L., Jiménez, R., Echeverría, C. L., Pérez, C. L., Megías-Lobón, G., Lorenzo, B., Sánchez-Reus, F., Martín, M. T., Vidal, I., Sánchez-Hellín, V., Pemán, J., Fajardo, M., Gómez, E., Serrano, J., Rodríguez, B., Zvezdanova, E., Gómez-Núñez, A., Leiva, J. G., Machado, M., Sánchez-Romero, I., García-Rodríguez, J., Luis del Pozo, J., Vallejo, M. R., Ruiz de Alegría-Puig, C., Vicente, D., Fernández-Torres, M. y Hernáez-Crespo, S. (2020) "Azole resistance survey on clinical Aspergillus fumigatus isolates in Spain", *Clinical Microbiology and Infection*, (xxxx). doi:10.1016/j.cmi.2020.09.042.

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S. y Krska, R. (2020) "Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis, 60(16), pp. 2773-2789. doi:10.1080/10408398.2019.1658570.

Espinel-Ingroff, A., Turnidge, J., Alastruey-Izquierdo, A., Dannaoui, E., Garcia-Effron, G., Guinea, J., Kidd, S., Pelaez, T., Sanguinetti, M., Meletiadis, J., Botterel, F., Bustamante, B., Chen, Y. C., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., Chryssanthou, E., Córdoba, S., Gonzalez, G. M., Guarro, J., Johnson, E. M., Kus, J. V., Lass-Flörl, C., Linares-Sicilia, M. J., Martín-Mazuelos, E., Negri, C. E., Pfaller, M. A. y Tortorano, A. M. (2018) "Posaconazole MIC distributions for aspergillus fumigatus species complex by four methods: Impact of cyp51a mutations on estimation of epidemiological cutoff values", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4). doi:10.1128/AAC.01916-17.

Etienne, K. A., Berkow, E. L., Gade, L., Nunnally, N., Lockhart, S. R., Beer, K., Jordan, I. K., Rishishwar, L. y Litvintseva, A. P. (2021) "Genomic Diversity of Azole-Resistant Aspergillus fumigatus in the United States.", *mBio*. United States, 12(4), p. e0180321. doi:10.1128/mBio.01803-21.

Fan, H., Chen, Y., Duan, L., Zhao, J., Qin, C., Li, H., Sun, J. y Han, L. (2020) "Comparison of two typing methods for characterization of azole resistance in aspergillus fumigatus from potting soil samples in a Chinese Hospital", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(2), pp. 1-8. doi:10.1128/AAC.01578-19.

Fan, J., Urban, M., Parker, J. E., Brewer, H. C., Kelly, S. L., Hammond-Kosack, K. E., Fraaije, B. A., Liu, X. y Cools, H. J. (2013) "Characterization of the sterol 14 α -demethylases of Fusarium graminearum identifies a novel genus-specific CYP51 function", *New Phytologist*, 198(3), pp. 821-835. doi:10.1111/nph.12193.

Bibliografía

- Fang, W. y Latgé, J. P. (2018) "Microbe profile: *Aspergillus fumigatus*: A saprotrophic and opportunistic fungal pathogen", *Microbiology (United Kingdom)*, 164(8), pp. 1009-1011. doi:10.1099/mic.0.000651.
- Fang, W., Wu, J., Cheng, M., Zhu, X., Du, M., Chen, C., Liao, W., Zhi, K. y Pan, W. (2023) "Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments", *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central, 30(1), pp. 1-35. doi:10.1186/s12929-023-00926-2.
- Feng, Y., Huang, Y., Zhan, H., Bhatt, P. y Chen, S. (2020) "An Overview of Strobilurin Fungicide Degradation: Current Status and Future Perspective", *Frontiers in Microbiology*, 11(March), pp. 1-11. doi:10.3389/fmicb.2020.00389.
- Fernanda, dos R. T., Pereira, S. L., Alves, de C. P., Andrade, do C. R., Mendes, M. M., Franco, da S. J., Henriques, F. B., Fernando, R., Lee, L. A., Antonis, R. y H., G. G. (2019) "The *Aspergillus fumigatus* Mismatch Repair MSH2 Homolog Is Important for Virulence and Azole Resistance", *mSphere*. American Society for Microbiology, 4(4), pp. e00416-19. doi:10.1128/mSphere.00416-19.
- Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., De Vicente, A. y Pérez-García, A. (2008) "Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi", *International Microbiology*, 11(1), pp. 1-9. doi:10.2436/20.1501.01.38.
- Fernandez-Pittol, M., Alejo-Cancho, I., Rubio-García, E., Cardozo, C., Puerta-Alcalde, P., Moreno-García, E., Garcia-Pouton, N., Garrido, M., Villanueva, M., Alastruey-Izquierdo, A., Pitart, C., Garcia-Vidal, C. y Marco, F. (2022) "Aspergillosis by cryptic *Aspergillus* species: A case series and review of the literature", *Revista Iberoamericana de Micología*, 39(2), pp. 44-49. doi:10.1016/j.riam.2022.04.002.
- Ferrari, S., Ischer, F., Calabrese, D., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Fadda, G., Rohde, B., Bauser, C., Bader, O. y Sanglard, D. (2009) "Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence", *PLoS Pathogens*, 5(1). doi:10.1371/journal.ppat.1000268.
- Fillinger, S., Ajouz, S., Nicot, P. C., Leroux, P. y Bardin, M. (2012) "Functional and structural comparison of Pyrrolnitrin- and Iprodione-induced modifications in the class III histidine-kinase Bos1 of *Botrytis cinerea*", *PLoS ONE*, 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0042520.
- Fisher, M. C., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J., Bicanic, T., Bignell, E. M., Bowyer, P., Bromley, M., Brüggemann, R., Garber, G., Cornely, O. A., Gurr, S. J., Harrison, T. S., Kuijper, E., Rhodes, J., Sheppard, D. C., Warris, A., White, P. L., Xu, J., Zwaan, B. y Verweij, P. E. (2022) "Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health", *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 20(9), pp. 557-571. doi:10.1038/s41579-022-00720-1.
- Forastiero, A., Mesa-Arango, A. C., Alastruey-Izquierdo, A., Alcazar-Fuoli, L., Bernal-Martinez, L., Pelaez, T., Lopez, J. F., Grimalt, J. O., Gomez-Lopez, A., Cuesta, I., Zaragoza, O. y Mellado, E. (2013) "Candida tropicalis antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(10), pp. 4769-4781. doi:10.1128/AAC.00477-13.
- Fortún, J., Meije, Y., Fresco, G. y Moreno, S. (2012) "Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(4), pp. 201-208. doi:10.1016/j.eimc.2011.12.005.
- Fraaije, B., Atkins, S., Hanley, S., Macdonald, A. y Lucas, J. (2020) "The Multi-Fungicide Resistance Status of *Aspergillus fumigatus* Populations in Arable Soils and the Wider European Environment", *Frontiers in Microbiology*, 11(December), pp. 1-17.

doi:10.3389/fmicb.2020.599233.

Fuhren, J., Voskuil, W. S., Boel, C. H. E., Haas, P. J. A., Hagen, F., Meis, J. F. y Kusters, J. G. (2015) "High prevalence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from high-risk patients.", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. England, 70(10), pp. 2894-2898. doi:10.1093/jac/dkv177.

Gambhir, N., Harris, S. D. y Everhart, S. E. (2022) "Evolutionary Significance of Fungal Hypermutators: Lessons Learned from Clinical Strains and Implications for Fungal Plant Pathogens", *mSphere*. American Society for Microbiology, 7(3), pp. 1-10. doi:10.1128/msphere.00087-22.

Garcia-Effron, G. (2020) "Rezafungin—mechanisms of action, susceptibility and resistance: Similarities and differences with the other echinocandins", *Journal of Fungi*, 6(4), pp. 1-23. doi:10.3390/jof6040262.

Garcia-Rubio, R., Alcazar-Fuoli, L., Monteiro, M. C., Monzon, S., Cuesta, I., Pelaez, T. y Mellado, E. (2018) "Insight into the significance of *aspergillus fumigatus* cyp51A polymorphisms", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), pp. 1-15. doi:10.1128/AAC.00241-18.

Garcia-Rubio, R., Cuenca-Estrella, M. y Mellado, E. (2017) "Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem", *Drugs*. Springer International Publishing, 77(6), pp. 599-613. doi:10.1007/s40265-017-0714-4.

Garcia-Rubio, R., Escribano, P., Gomez, A., Guinea, J. y Mellado, E. (2018) "Comparison of two highly discriminatory typing methods to analyze *Aspergillus fumigatus* azole resistance", *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), pp. 1-9. doi:10.3389/fmicb.2018.01626.

Garcia-Rubio, R., Gil, H., Monteiro, M. C., Pelaez, T. y Mellado, E. (2016) "A new *Aspergillus fumigatus* typing method based on hypervariable tandem repeats located within exons of surface protein coding genes (TRESP)", *PLoS ONE*, 11(10), pp. 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0163869.

Garcia-Rubio, R., Gonzalez-Jimenez, I., Lucio, J. y Mellado, E. (2021) "Aspergillus fumigatus Cross-Resistance between Clinical and Demethylase Inhibitor Azole Drugs", *Applied and Environmental Microbiology*. Editado por C. A. Elkins. American Society for Microbiology Journals, 87(5). doi:10.1128/AEM.02539-20.

Garcia-Rubio, R., Monzon, S., Alcazar-Fuoli, L., Cuesta, I. y Mellado, E. (2018) "Genome-wide comparative analysis of *Aspergillus fumigatus* strains: The reference genome as a matter of concern", *Genes*, 9(7). doi:10.3390/genes9070363.

Georgiadou, S. P. y Kontoyiannis, D. P. (2012) "The impact of azole resistance on aspergillosis guidelines.", *Annals of the New York Academy of Sciences*. United States, 1272, pp. 15-22. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06795.x.

Godeau, C., Reboux, G., Scherer, E., Laboissiere, A., Lechenault-Bergerot, C., Millon, L. y Rocchi, S. (2020) "Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the hospital: Surveillance from flower beds to corridors", *American Journal of Infection Control*, 48(6), pp. 702-704. doi:10.1016/j.ajic.2019.10.003.

Gomez-Lopez, A., Forastiero, A., Cendejas-Bueno, E., Gregson, L., Mellado, E., Howard, S. J., Livermore, J. L., Hope, W. W. y Cuenca-Estrella, M. (2014) "An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: the role of azole resistance.", *Medical mycology*. England, 52(3), pp. 311-319. doi:10.1093/mmy/myt022.

Gómez Londoño, L. F. y Brewer, M. T. (2023) "Detection of azole-resistant *Aspergillus fumigatus*

Bibliografía

in the environment from air, plant debris, compost, and soil", *PLOS ONE*. Public Library of Science, 18(3), p. e0282499. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282499>.

Gonçalves, P., Melo, A., Dias, M., Almeida, B., Caetano, L. A., Veríssimo, C., Viegas, C. y Sabino, R. (2020) "Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Harboring the TR(34)/L98H Mutation: First Report in Portugal in Environmental Samples.", *Microorganisms*. Switzerland, 9(1). doi:10.3390/microorganisms9010057.

Gonçalves, P., Melo, A., Dias, M., Almeida, B., Caetano, L. A., Veríssimo, C., Viegas, C. y Sabino, R. (2021) "Azole-resistant *aspergillus fumigatus* harboring the tr34/l98h mutation: First report in portugal in environmental samples", *Microorganisms*, 9(1), pp. 1-10. doi:10.3390/microorganisms9010057.

Gonzalez-Jimenez, I., Garcia-Rubio, R., Monzon, S., Lucio, J., Cuesta, I. y Mellado, E. (2021) "Multiresistance to nonazole fungicides in *aspergillus fumigatus* TR34/L98H Azole-resistant isolates", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(9). doi:10.1128/AAC.00642-21.

Gonzalez-Jimenez, I., Lucio, J., Amich, J., Cuesta, I., Arroyo, R. S., Alcazar-Fuoli, L. y Mellado, E. (2020) "A *cyp51b* mutation contributes to azole resistance in *aspergillus fumigatus*", *Journal of Fungi*, 6(4), pp. 1-16. doi:10.3390/jof6040315.

Gonzalez-Jimenez, Irene, Lucio, J., Menéndez-Fraga, M. D., Mellado, E. y Peláez, T. (2021) "Hospital environment as a source of azole-resistant *aspergillus fumigatus* strains with TR34/L98H and *g448s cyp51a* mutations", *Journal of Fungi*, 7(1), pp. 1-9. doi:10.3390/jof7010022.

Gonzalez-Jimenez, Irene, Lucio, J., Roldan, A., Alcazar-Fuoli, L. y Mellado, E. (2021) "Are point mutations in HMG-CoA reductases (*Hmg1* and *Hmg2*) a step towards azole resistance in *aspergillus fumigatus*?", *Molecules*, 26(19), pp. 1-15. doi:10.3390/molecules26195975.

Gonzalez-Lara, M. F., Roman-Montes, C. M., Diaz-Lomeli, P., Rangel-Cordero, A., Valenzuela, M. O., Ponce-de-Leon, A., Sifuentes-Osornio, J., Ostrosky-Zeichner, L. y Martinez-Gamboa, A. (2019) "Azole resistance and *cyp51A* mutation screening in *Aspergillus fumigatus* in Mexico.", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. England, 74(7), pp. 2047-2050. doi:10.1093/jac/dkz121.

Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C. y Burke, M. D. (2012) "Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), pp. 2234-2239. doi:10.1073/pnas.1117280109.

Grover, N. (2010) "Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy", *Indian Journal of Pharmacology*, 42(1), pp. 9-11. doi:10.4103/0253-7613.62396.

Guan, X., Zhao, Y., Liu, X., Shang, B., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Zhang, C., Bhatnagar, D. y Liu, Y. (2019) "The bZIP transcription factor *Afap1* mediates the oxidative stress response and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*", *Revista Argentina de Microbiología*. Elsevier España, S.L.U., (xx), pp. 1-10. doi:10.1016/j.ram.2018.07.003.

Guegan, H., Prat, E., Robert-Gangneux, F. y Gangneux, J. P. (2021) "Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Five-Year Follow Up Experience in a Tertiary Hospital With a Special Focus on Cystic Fibrosis", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(February), pp. 1-9. doi:10.3389/fcimb.2020.613774.

Guinea, J. (2020) "Updated eucast clinical breakpoints against *aspergillus*, implications for the clinical microbiology laboratory", *Journal of Fungi*, 6(4), pp. 1-11. doi:10.3390/jof6040343.

Guinea, J., Meletiadis, J., Arikian-Akdagli, S., Kahlmeter, G., Arendrup, M. C. y (EUCAST), S. on A. S. T. (AFST) of the E. E. C. for A. S. T. (2022) *EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.4 Method*

for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_EDef_9.4_method_for_susceptibility_testing_of_moulds.pdf.

Guinea, J., Verweij, P. E., Meletiadis, J., Mouton, J. W., Barchiesi, F., Arendrup, M. C., Arikian-Akdagli, S., Castanheira, M., Chryssanthou, E., Friberg, N., Järv, H., Klimko, N., Kurzai, O., Lagrou, K., Lass-Flörl, C., Mares, M., Matos, T., Moore, C. B., Muehlethaler, K., Rogers, T. R., Andersen, C. T. y Velegraki, A. (2019) "How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates", *Clinical Microbiology and Infection*, 25(6), pp. 681-687. doi:10.1016/j.cmi.2018.09.008.

Guinea, J., De Viedma, D. G., Peláez, T., Escribano, P., Muñoz, P., Meis, J. F., Klaassen, C. H. W. y Bouza, E. (2011) "Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus*: An in-depth genotypic analysis of isolates involved in an outbreak of invasive aspergillosis", *Journal of Clinical Microbiology*, 49(10), pp. 3498-3503. doi:10.1128/JCM.01159-11.

Gupta, D. y Heinen, C. D. (2019) "The mismatch repair-dependent DNA damage response: Mechanisms and implications", *DNA Repair*, 78, pp. 60-69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.03.009>.

Hagiwara, D., Arai, T., Takahashi, H., Kusuya, Y., Watanabe, A. y Kamei, K. (2018) "Non-cyp51A azole-resistant *aspergillus fumigatus* isolates with mutation in HMG-CoA reductase", *Emerging Infectious Diseases*, 24(10), pp. 1889-1897. doi:10.3201/eid2410.180730.

Hamill, R. J. (2013) "Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity", *Drugs*, 73(9), pp. 919-934. doi:10.1007/s40265-013-0069-4.

Hare, R. K., Gertsen, J. B., Astvad, K. M. T., Degn, K. B., Løkke, A., Stegger, M., Andersen, P. S., Kristensen, L. y Arendrup, M. C. (2019) "In vivo selection of a unique tandem repeat mediated azole resistance mechanism (TR 120) in *aspergillus fumigatus* cyp51A, Denmark", *Emerging Infectious Diseases*, 25(3), pp. 577-580. doi:10.3201/eid2503.180297.

Harfe, B. D. y Jinks-Robertson, S. (2000) "DNA MISMATCH REPAIR AND GENETIC INSTABILITY", *Annual Review of Genetics*. Annual Reviews, 34(1), pp. 359-399. doi:10.1146/annurev.genet.34.1.359.

Hata, K., Horii, T., Miyazaki, M., Watanabe, N. A., Okubo, M., Sonoda, J., Nakamoto, K., Tanaka, K., Shirotori, S., Murai, N., Inoue, S., Matsukura, M., Abe, S., Yoshimatsu, K. y Asada, M. (2011) "Efficacy of oral E1210, a new broad-spectrum antifungal with a novel mechanism of action, in murine models of candidiasis, aspergillosis, and fusariosis", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), pp. 4543-4551. doi:10.1128/AAC.00366-11.

Hawkins, N. J., Cools, H. J., Sierotzki, H., Shaw, M. W., Knogge, W., Kelly, S. L., Kelly, D. E. y Fraaije, B. A. (2014) "Paralog Re-Emergence: A Novel, Historically Contingent Mechanism in the Evolution of Antimicrobial Resistance", *Molecular Biology and Evolution*, 31(7), pp. 1793-1802. doi:10.1093/molbev/msu134.

Hawkins, N. J. y Fraaije, B. A. (2016) "Predicting Resistance by Mutagenesis: Lessons from 45 Years of MBC Resistance ", *Frontiers in Microbiology* . Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01814>.

Hawkins, N. J. y Fraaije, B. A. (2018) "Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance", *Annual Review of Phytopathology*, 56(June), pp. 339-360. doi:10.1146/annurev-phyto-080417-050012.

Bibliografía

- Healey, K. R., Zhao, Y., Perez, W. B., Lockhart, S. R., Sobel, J. D., Farmakiotis, D., Kontoyiannis, D. P., Sanglard, D., Taj-Aldeen, S. J., Alexander, B. D., Jimenez-Ortigosa, C., Shor, E. y Perlin, D. S. (2016) "Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, pp. 1-10. doi:10.1038/ncomms11128.
- Hess, J. y Goldman, N. (2011) "Addressing inter-gene heterogeneity in maximum likelihood phylogenomic analysis: yeasts revisited.", *PLoS one*. United States, 6(8), p. e22783. doi:10.1371/journal.pone.0022783.
- Hodiamont, C. J., Dolman, K. M., Ten Berge, I. J. M., Melchers, W. J. G., Verweij, P. E. y Pajkrt, D. (2009) "Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery.", *Medical mycology*. England, 47(2), pp. 217-220. doi:10.1080/13693780802545600.
- Hoenigl, M., Sprute, R., Egger, M., Arastehfar, A., Cornely, O. A., Krause, R., Lass-Flörl, C., Prattes, J., Spec, A., Thompson, G. R., Wiederhold, N. y Jenks, J. D. (2021) "The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin", *Drugs*. Springer International Publishing, 81(15), pp. 1703-1729. doi:10.1007/s40265-021-01611-0.
- Hollomon, D. (2017) "Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*?", *Pest Management Science*, 73(10), pp. 1987-1993. doi:10.1002/ps.4607.
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A. y Frisvad, J. C. (2020) "Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species", *Studies in Mycology*, 95, pp. 5-169. doi:10.1016/j.simyco.2020.05.002.
- Howard, S. J., Cerar, D., Anderson, M. J., Albarrag, A., Fisher, M. C., Pasqualotto, A. C., Laverdiere, M., Arendrup, M. C., Perlin, D. S. y Denning, D. W. (2009) "Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure.", *Emerging infectious diseases*, 15(7), pp. 1068-1076. doi:10.3201/eid1507.090043.
- Humphries, R. M., Ambler, J., Mitchell, S. L., Castanheira, M., Dingle, T., Hindler, J. A., Koeth, L. y Sei, K. (2018) "CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests.", *Journal of clinical microbiology*. United States, 56(4). doi:10.1128/JCM.01934-17.
- Hurst, S. F., Berkow, E. L., Stevenson, K. L., Litvintseva, A. P. y Lockhart, S. R. (2017) "Isolation of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* from the environment in the south-eastern USA", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(9), pp. 2443-2446. doi:10.1093/jac/dkx168.
- Husain, S. y Camargo, J. F. (2019) "Invasive Aspergillosis in solid-organ transplant recipients: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice", *Clinical Transplantation*, 33(9), pp. 1-24. doi:10.1111/ctr.13544.
- van Ingen, J., van der Lee, H. A., Rijs, T. A. J., Zoll, J., Leenstra, T., Melchers, W. J. G. y Verweij, P. E. (2015) "Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type, TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands.", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. England, 70(1), pp. 178-181. doi:10.1093/jac/dku364.
- Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V. y Modrich, P. L. (2006) "DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms", *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 106(2), pp. 302-323. doi:10.1021/cr0404794.

- Jeanvoine, A., Rocchi, S., Bellanger, A. P., Reboux, G. y Millon, L. (2020) "Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: A global phenomenon originating in the environment?", *Medecine et Maladies Infectieuses*. Elsevier Masson SAS, 50(5), pp. 389-395. doi:10.1016/j.medmal.2019.07.014.
- Jeanvoine, A., Rocchi, S., Reboux, G., Crini, N., Crini, G. y Millon, L. (2017) "Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in sawmills of Eastern France", *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 123(1), pp. 172-184. doi:https://doi.org/10.1111/jam.13488.
- Jenks, J. D. y Hoenigl, M. (2018) "Treatment of aspergillosis", *Journal of Fungi*, 4(3), pp. 1-17. doi:10.3390/jof4030098.
- Johanson, A. y Blazquez, B. (1992) "Fungi associated with banana crown rot on field-packed fruit from the Windward Islands and assessment of their sensitivity to the fungicides thiabendazole, prochloraz and imazalil", *Crop Protection*, 11(1), pp. 79-83. doi:10.1016/0261-2194(92)90084-I.
- Jørgensen, K. M., Astvad, K. M. T., Hare, R. K. y Arendrup, M. C. (2018) "EUCAST Determination of Olorofim (F901318) Susceptibility of Mold Species, Method Validation, and MICs.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 62(8). doi:10.1128/AAC.00487-18.
- Jørgensen, L. N. y Heick, T. M. (2021) "Azole Use in Agriculture, Horticulture, and Wood Preservation – Is It Indispensable?", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(September), pp. 1-16. doi:10.3389/fcimb.2021.730297.
- Julia, S.-L., Ana, G., Belén, R.-S., Patricia, M., Pilar, E. y Jesús, G. (2021) "Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolate Screening in Azole-Containing Agar Plates (EUCAST E.Def 10.1): Low Impact of Plastic Trays Used and Poor Performance in Cryptic Species", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, 65(8), pp. 10.1128/aac.00482-21. doi:10.1128/aac.00482-21.
- Kanafani, Z. A. y Perfect, J. R. (2008) "Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact", *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), pp. 120-128. doi:10.1086/524071.
- Kanaujia, R., Singh, S. y Rudramurthy, S. M. (2023) "Aspergillosis: an Update on Clinical Spectrum, Diagnostic Schemes, and Management", *Current Fungal Infection Reports*. Springer US, 17(2), pp. 144-155. doi:10.1007/s12281-023-00461-5.
- Kang, S. E., Sumabat, L. G., Melie, T., Mangum, B., Momany, M. y Brewer, M. T. (2022) "Evidence for the agricultural origin of resistance to multiple antimicrobials in *Aspergillus fumigatus*, a fungal pathogen of humans", *G3 (Bethesda, Md.)*, 12(2). doi:10.1093/g3journal/jkab427.
- Kanj, A., Abdallah, N. y Soubani, A. O. (2018) "The spectrum of pulmonary aspergillosis", *Respiratory Medicine*. Elsevier, 141(July), pp. 121-131. doi:10.1016/j.rmed.2018.06.029.
- Kibathi, L., Kumar, P., Lionakis, M., Urban, A., Ferre, E., McManus, M., Colton, B., Lambros, C., Lu, R., Mannino, R., Tramont, E. y Freeman, A. F. (2018) "1413. A Phase IIa Efficacy, Safety, Tolerability and Pharmacokinetic (PK) Study of Encocleated Amphotericin B in Patients with Mucocutaneous (Esophageal, Oropharyngeal, Vulvovaginal) Candidiasis Who are Refractory or Intolerant to Standard Non-Intravenous", *Open Forum Infectious Diseases*, 5(suppl_1), pp. S435-S435. doi:10.1093/ofid/ofy210.1244.
- Kidd, S. E., Goeman, E., Meis, J. F., Slavin, M. A. y Verweij, P. E. (2015) "Multi-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* infections in Australia", *Mycoses*. John Wiley & Sons, Ltd, 58(6), pp. 350-355. doi:https://doi.org/10.1111/myc.12324.
- Kilani, J. y Fillinger, S. (2016) "Phenylpyrroles: 30 years, two molecules and (nearly) no resistance", *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC), pp. 1-10. doi:10.3389/fmicb.2016.02014.

Bibliografía

Kivelä, M., Arnaud-Haond, S. y Saramäki, J. (2015) "EDENetworks: A user-friendly software to build and analyse networks in biogeography, ecology and population genetics", *Molecular Ecology Resources*. John Wiley & Sons, Ltd, 15(1), pp. 117-122. doi:<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12290>.

Klaassen, C. H. W. (2009) "MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates.", *Medical mycology*. England, 47 Suppl 1, pp. S27-33. doi:[10.1080/13693780802382244](https://doi.org/10.1080/13693780802382244).

Klich, M. A. (2007) "*Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin", *Molecular Plant Pathology*, 8(6), pp. 713-722. doi:[10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x).

Kosmidis, C. y Denning, D. W. (2015) "The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis", *Thorax*, 70(3), pp. 270-277. doi:[10.1136/thoraxjnl-2014-206291](https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206291).

Krishnan-Natesan, S., Chandrasekar, P. H., Alangaden, G. J. y Manavathu, E. K. (2008) "Molecular characterisation of cyp51A and cyp51B genes coding for P450 14 α -lanosterol demethylases A (CYP51Ap) and B (CYP51Bp) from voriconazole-resistant laboratory isolates of *Aspergillus flavus*", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(6), pp. 519-524. doi:[10.1016/j.ijantimicag.2008.06.018](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.06.018).

Krishnan, S., Manavathu, E. K. y Chandrasekar, P. H. (2009) "*Aspergillus flavus*: An emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance", *Mycoses*, 52(3), pp. 206-222. doi:[10.1111/j.1439-0507.2008.01642.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01642.x).

Larrea, A. A., Lujan, S. A. y Kunkel, T. A. (2010) "SnapShot: DNA Mismatch Repair", *Cell*, 141(4). doi:[10.1016/j.cell.2010.05.002](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.002).

Lass-Flörl, C., Dietl, A. M., Kontoyiannis, D. P. y Brock, M. (2021) "*Aspergillus terreus* Species Complex", *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4), pp. 1-27. doi:[10.1128/CMR.00311-20](https://doi.org/10.1128/CMR.00311-20).

Latgé, J.-P. y Chamilos, G. (2019) "*Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019.", *Clinical microbiology reviews*, 33(1). doi:[10.1128/CMR.00140-18](https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18).

Latgé, J. P. (1999) "*Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis", *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), pp. 310-350. doi:[10.1128/cmr.12.2.310](https://doi.org/10.1128/cmr.12.2.310).

Lavergne, R. A., Chouaki, T., Hagen, F., Toublanc, B., Dupont, H., Jounieaux, V., Meis, J. F., Morio, F. y Le Pape, P. (2017) "Home environment as a source of life-threatening azole-resistant *aspergillus fumigatus* in immunocompromised patients", *Clinical Infectious Diseases*, 64(1), pp. 76-78. doi:[10.1093/cid/ciw664](https://doi.org/10.1093/cid/ciw664).

Lavergne, R. A., Morio, F., Danner-Boucher, I., Horeau-Langlard, D., David, V., Hagen, F., Meis, J. F. y Le Pape, P. (2019) "One year prospective survey of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* at a French cystic fibrosis reference centre: Prevalence and mechanisms of resistance", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(7), pp. 1884-1889. doi:[10.1093/jac/dkz144](https://doi.org/10.1093/jac/dkz144).

Lee, H.-J., Cho, S.-Y., Lee, D.-G., Park, C., Chun, H.-S. y Park, Y.-J. (2018) "TR34/L98H Mutation in CYP51A Gene in *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates During Posaconazole Prophylaxis: First Case in Korea.", *Mycopathologia*. Netherlands, 183(4), pp. 731-736. doi:[10.1007/s11046-018-0271-8](https://doi.org/10.1007/s11046-018-0271-8).

Legrand, M., Chan, C. L., Jauert, P. A. y Kirkpatrick, D. T. (2007) "Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in *Candida albicans*", *Eukaryotic Cell*, 6(12), pp. 2194-2205. doi:[10.1128/EC.00299-07](https://doi.org/10.1128/EC.00299-07).

Lemaire, B., Normand, A.-C., Forel, J.-M., Cassir, N., Piarroux, R. y Ranque, S. (2018) "Hospitalized Patient as Source of *Aspergillus fumigatus*, 2015.", *Emerging infectious diseases*. United States,

24(8), pp. 1524-1527. doi:10.3201/eid2408.171865.

Lescar, J., Meyer, I., Akshita, K., Srinivasaraghavan, K., Verma, C., Palous, M., Mazier, D., Datry, A. y Fekkar, A. (2014) "Aspergillus fumigatus harbouring the sole Y121F mutation shows decreased susceptibility to voriconazole but maintained susceptibility to itraconazole and posaconazole.", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. England, 69(12), pp. 3244-3247. doi:10.1093/jac/dku316.

Li, G. M. (2008) "Mechanisms and functions of DNA mismatch repair", *Cell Research*, 18(1), pp. 85-98. doi:10.1038/cr.2007.115.

von Lilienfeld-Toal, M., Wagener, J., Einsele, H., Cornely, O. A. y Kurzai, O. (2019) "Invasive Fungal Infection.", *Deutsches Arzteblatt international*. Germany, 116(16), pp. 271-278. doi:10.3238/arztebl.2019.0271.

Linden, J., Arendrup, M. C., Lee, H., Melchers, W. y Verweij, P. (2009) "Azole containing agar plates as a screening tool for azole resistance of Aspergillus fumigatus", *Mycoses*, 52, p. 19.

van der Linden, J. W. M., Arendrup, M. C., Warris, A., Lagrou, K., Pelloux, H., Hauser, P. M., Chrissanthou, E., Mellado, E., Kidd, S. E., Tortorano, A. M., Dannaoui, E., Gaustad, P., Baddley, J. W., Uekötter, A., Lass-Flörl, C., Klimko, N., Moore, C. B., Denning, D. W., Pasqualotto, A. C., Kibbler, C., Arkan-Akdagli, S., Andes, D., Meletiadis, J., Naumiuk, L., Nucci, M., Melchers, W. J. G. y Verweij, P. E. (2015) "Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in Aspergillus fumigatus", *Emerging Infectious Diseases*, 21(6), pp. 1041-1044. doi:10.3201/eid2106.140717.

Van Der Linden, J. W. M., Camps, S. M. T., Kampinga, G. A., Arends, J. P. A., Debets-Ossenkopp, Y. J., Haas, P. J. A., Rijnders, B. J. A., Kuijper, E. J., Van Tiel, F. H., Varga, J., Karawajczyk, A., Zoll, J., Melchers, W. J. G. y Verweij, P. E. (2013) "Aspergillois due to voriconazole highly resistant Aspergillus fumigatus and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles", *Clinical Infectious Diseases*, 57(4), pp. 513-520. doi:10.1093/cid/cit320.

van der Linden, J. W. M., Snelders, E., Kampinga, G. A., Rijnders, B. J. A., Mattsson, E., Debets-Ossenkopp, Y. J., Kuijper, E. J., van Tiel, F. H., Melchers, W. J. G. y Verweij, P. E. (2011) "Clinical implications of azole resistance in Aspergillus fumigatus, The Netherlands, 2007-2009", *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), pp. 1846-1854. doi:10.3201/eid1710.110226.

Liu, M., Zheng, N., Li, D., Zheng, H., Zhang, L., Ge, H. y Liu, W. (2016) "cyp51A -based mechanism of azole resistance in Aspergillus fumigatus : Illustration by a new 3D Structural Model of Aspergillus fumigatus CYP51A protein ", *Medical Mycology*, 54(4), pp. 400-408. doi:10.1093/mmy/myv102.

Liu, Wei, Sun, Y., Chen, W., Liu, Weixia, Wan, Z., Bu, D. y Li, R. (2012) "The T788G mutation in the cyp51C gene confers voriconazole resistance in Aspergillus flavus causing aspergillois", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), pp. 2598-2603. doi:10.1128/AAC.05477-11.

Logan, A., Wolfe, A. y Williamson, J. C. (2022) "Antifungal Resistance and the Role of New Therapeutic Agents", *Current Infectious Disease Reports*. Springer US, 24(9), pp. 105-116. doi:10.1007/s11908-022-00782-5.

Loussert, C., Schmitt, C., Prevost, M. C., Balloy, V., Fadel, E., Philippe, B., Kauffmann-Lacroix, C., Latgé, J. P. y Beauvais, A. (2010) "In vivo biofilm composition of Aspergillus fumigatus", *Cellular Microbiology*, 12(3), pp. 405-410. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01409.x.

Macedo, D., Leonardelli, F., Gamarra, S. y Garcia-Effron, G. (2021) "Emergence of Triazole Resistance in Aspergillus spp. in Latin America.", *Current fungal infection reports*. United States,

Bibliografía

15(3), pp. 93-103. doi:10.1007/s12281-021-00418-6.

Mackenzie, J. S. y Jeggo, M. (2019) "The one health approach-why is it so important?", *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(2), pp. 5-8. doi:10.3390/tropicalmed4020088.

Mann, P. A., Parmegiani, R. M., Wei, S.-Q., Mendrick, C. A., Li, X., Loebenberg, D., DiDomenico, B., Hare, R. S., Walker, S. S. y McNicholas, P. M. (2003) "Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14 α -demethylase.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(2), pp. 577-581. doi:10.1128/aac.47.2.577-581.2003.

Margalit, A. y Kavanagh, K. (2015) "The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface", *FEMS Microbiology Reviews*, 39(5), pp. 670-687. doi:10.1093/femsre/fuv018.

Mavridou, E., Brüggemann, R. J. M., Melchers, W. J. G., Mouton, J. W. y Verweij, P. E. (2010) "Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the *cyp51A* gene", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), pp. 860-865. doi:10.1128/AAC.00931-09.

McKinney, W. P., Vesty, A., Sood, J., Bhally, H. y Morris, A. J. (2021) "The emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* complex in New Zealand", *New Zealand Medical Journal*, 134(1536), pp. 41-51.

Meis, J. F., Chowdhary, A., Rhodes, J. L., Fisher, M. C. y Verweij, P. E. (2016) "Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709). doi:10.1098/rstb.2015.0460.

Mellado, E., Diaz-Guerra, T. M., Cuenca-Estrella, M. y Rodriguez-Tudela, J. L. (2001) "Identification of two different 14- α sterol demethylase- related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species", *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), pp. 2431-2438. doi:10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001.

Mellado, E., Garcia-Effron, G., Alcazar-Fuoli, L., Cuenca-Estrella, M. y Rodriguez-Tudela, J. L. (2004) "Substitutions at methionine 220 in the 14 α -sterol demethylase (*Cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(7), pp. 2747-2750. doi:10.1128/AAC.48.7.2747-2750.2004.

Mellado, E., Garcia-Effron, G., Alcázar-Fuoli, L., Melchers, W. J. G., Verweij, P. E., Cuenca-Estrella, M. y Rodríguez-Tudela, J. L. (2007) "A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), p. 1897–1904. doi:10.1128/aac.01092-06.

Mendillo, M. L., Mazur, D. J. y Kolodner, R. D. (2005) "Analysis of the interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 complexes with DNA using a reversible DNA end-blocking system.", *The Journal of biological chemistry*. United States, 280(23), pp. 22245-22257. doi:10.1074/jbc.M407545200.

Meneau, I. y Sanglard, D. (2005) "Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates", *Medical Mycology*, 43(Supplement_1), pp. S307-S311. doi:10.1080/13693780500090826.

Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L. y Zaragoza, O. (2012) "It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug", *Frontiers in Microbiology*, 3(AUG), pp. 1-10. doi:10.3389/fmicb.2012.00286.

- Mesa-Arango, A. C., Trevijano-Contador, N., Román, E., Sánchez-Fresneda, R., Casas, C., Herrero, E., Argüelles, J. C., Pla, J., Cuenca-Estrella, M. y Zaragoza, O. (2014) "The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11), pp. 6627-6638. doi:10.1128/AAC.03570-14.
- Monpierre, L., Desbois-Nogard, N., Valsecchi, I., Bajal, M., Angebault, C., Miossec, C., Botterel, F. y Dannaoui, É. (2021) "Azole Resistance in Clinical and Environmental *Aspergillus* Isolates from the French West Indies (Martinique).", *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*. Switzerland, 7(5). doi:10.3390/jof7050355.
- Morio, F., Aubin, G. G., Danner-Boucher, I., Haloun, A., Sacchetto, E., Garcia-Hermoso, D., Bretagne, S., Miegeville, M. y Le Pape, P. (2012) "High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(8), pp. 1870-1873. doi:10.1093/jac/dks160.
- Mortensen, K. L., Jensen, R. H., Johansen, H. K., Skov, M., Pressler, T., Howard, S. J., Leatherbarrow, H., Mellado, E. y Arendrup, M. C. (2011) "Aspergillus species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: A laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance", *Journal of Clinical Microbiology*, 49(6), pp. 2243-2251. doi:10.1128/JCM.00213-11.
- Mounier, A., Agard, E., Douma, I., Chehab, H. El, Vie, A. L., Dot, J. M. y Dot, C. (2018) "Macular toxicity and blind spot enlargement during a treatment by voriconazole: A case report", *European Journal of Ophthalmology*, 28(4), pp. NP11-NP14. doi:10.1177/1120672117750051.
- Moye-Rowley, W. S. (2015) "Multiple mechanisms contribute to the development of clinically significant azole resistance in *Aspergillus fumigatus*", *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), pp. 1-6. doi:10.3389/fmicb.2015.00070.
- Nakano, Y., Tashiro, M., Urano, R., Kikuchi, M., Ito, N., Moriya, E., Shirahige, T., Mishima, M., Takazono, T., Miyazaki, T. y Izumikawa, K. (2020) "Characteristics of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* attached to agricultural products imported to Japan.", *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. Netherlands, 26(10), pp. 1021-1025. doi:10.1016/j.jiac.2020.05.008.
- Nascimento, A. M., Goldman, G. H., Park, S., Marras, S. A. E., Delmas, G., Oza, U., Lolans, K., Dudley, M. N., Mann, P. A. y Perlin, D. S. (2003) "Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 47(5), pp. 1719-1726. doi:10.1128/AAC.47.5.1719-1726.2003.
- Nett, J. E. y Andes, D. R. (2016) "Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications", *Infectious Disease Clinics of North America*. Elsevier Inc, 30(1), pp. 51-83. doi:10.1016/j.idc.2015.10.012.
- Nji, Q. N., Babalola, O. O. y Mwanza, M. (2023) "Soil *Aspergillus* Species, Pathogenicity and Control Perspectives", *Journal of Fungi*, 9(7), pp. 1-16. doi:10.3390/jof9070766.
- Nocua-Báez, L. C., Uribe-Jerez, P., Tarazona-Guaranga, L., Robles, R. y Cortés, J. A. (2020) "Azoles de antes y ahora: una revisión", *Revista chilena de infectología*, 37(3), pp. 219-230. doi:10.4067/s0716-10182020000300219.
- Nywening, A. V., Rybak, J. M., Rogers, P. D. y Fortwendel, J. R. (2020) "Mechanisms of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*", *Environmental Microbiology*, 22(12), pp. 4934-4952. doi:10.1111/1462-2920.15274.

Bibliografía

O’Gorman, C. M., Fuller, H. T. y Dyer, P. S. (2009) "Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*", *Nature*, 457(7228), pp. 471-474. doi:10.1038/nature07528.

Oakley, B. R., Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N. y Osmani, S. A. (2006) "Fusion pcr and gene targeting in *aspergillus nidulans*", *Nature Protocols*, 1(6), pp. 3111-3120. doi:10.1038/nprot.2006.405.

Odds, F. C., Brown, A. J. P. y Gow, N. A. R. (2003) "Antifungal agents: Mechanisms of action", *Trends in Microbiology*, 11(6), pp. 272-279. doi:10.1016/S0966-842X(03)00117-3.

Oiki, S., Yaguchi, T., Urayama, S. I. y Hagiwara, D. (2022) "Wide distribution of resistance to the fungicides fludioxonil and iprodione in *Penicillium* species", *PLoS ONE*, 17(1 January), pp. 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0262521.

Oliveira, T. Y. K., Silva, T. C., Moreira, S. I., Christiano, F. S., Gasparoto, M. C. G., Fraaije, B. A. y Ceresini, P. C. (2022) "Evidence of Resistance to QoI Fungicides in Contemporary Populations of *Mycosphaerella fijiensis*, *M. musicola* and *M. thailandica* from Banana Plantations in Southeastern Brazil", *Agronomy*, 12(12). doi:10.3390/agronomy12122952.

Oliver, B., Michael, W., Utz, R., Raimond, L., Martin, K., Martin, C., Jürgen, H., Silke, P., Ulrike, S., Dieter, B., Kathrin, T. y Uwe, G. (2013) "cyp51A-Based Mechanisms of *Aspergillus fumigatus* Azole Drug Resistance Present in Clinical Samples from Germany", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, 57(8), pp. 3513-3517. doi:10.1128/aac.00167-13.

Oliver, J. D., Sibley, G. E. M., Beckmann, N., Dobb, K. S., Slater, M. J., McEntee, L., Du Pré, S., Livermore, J., Bromley, M. J., Wiederhold, N. P., Hope, W. W., Kennedy, A. J., Law, D. y Birch, M. (2016) "F901318 represents a novel class of antifungal drug that inhibits dihydroorotate dehydrogenase", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(45), pp. 12809-12814. doi:10.1073/pnas.1608304113.

Onishi, K., Muhammad Sarumoh, B., Hagiwara, D., Watanabe, A., Kamei, K. y Toyotome, T. (2017) "Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* Containing a 34-bp Tandem Repeat in *cyp51A* Promoter is Isolated from the Environment in Japan.", *Medical mycology journal*. Japan, 58(2), pp. E67-E70. doi:10.3314/mmj.17-00002.

Panackal, A. A. (2016) "Combination Antifungal Therapy for Invasive Aspergillosis Revisited of 108) in the HHS Public Access", *Med Mycol Open Access*, 2(2).

Le Pape, P., Lavergne, R.-A., Morio, F. y Alvarez-Moreno, C. (2016) "Multiple Fungicide-Driven Alterations in Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Colombia, 2015.", *Emerging infectious diseases*. United States, pp. 156-157. doi:10.3201/eid2201.150978.

Pathakumari, B., Liang, G. y Liu, W. (2020) "Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review", *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier, 130(June), p. 110550. doi:10.1016/j.biopha.2020.110550.

Pathare, B. y Bansode, T. (2021) "Review- biological active benzimidazole derivatives", *Results in Chemistry*. Elsevier B.V., 3, p. 100200. doi:10.1016/j.rechem.2021.100200.

Patil, A. y Majumdar, S. (2017) "Echinocandins in antifungal pharmacotherapy", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(12), pp. 1635-1660. doi:10.1111/jphp.12780.

Patterson, T. F., Thompson, G. R., Denning, D. W., Fishman, J. A., Hadley, S., Herbrecht, R., Kontoyannis, D. P., Marr, K. A., Morrison, V. A., Nguyen, M. H., Segal, B. H., Steinbach, W. J., Stevens, D. A., Walsh, T. J., Wingard, J. R., Young, J. A. H. y Bennett, J. E. (2016) "Practice

guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America", *Clinical Infectious Diseases*, 63(4), pp. e1-e60. doi:10.1093/cid/ciw326.

Paul, R. A., Rudramurthy, S. M., Dhaliwal, M., Singh, P., Ghosh, A. K., Kaur, H., Varma, S., Agarwal, R. y Chakrabarti, A. (2018) "Magnitude of Voriconazole Resistance in Clinical and Environmental Isolates of *Aspergillus flavus* and Investigation into the Role of Multidrug Efflux Pumps", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(11), pp. 1-8. doi:10.1128/AAC.01022-18.

Paul, R. A., Rudramurthy, S. M., Meis, J. F., Mouton, J. W. y Chakrabarti, A. (2015) "A novel Y319H substitution in CYP51C associated with azole resistance in *Aspergillus flavus*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), pp. 6615-6619. doi:10.1128/AAC.00637-15.

Paulussen, C., Hallsworth, J. E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W. C., Hamill, P. G., Blain, D., Rediers, H. y Lievens, B. (2017) "Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species", *Microbial Biotechnology*, 10(2), pp. 296-322. doi:10.1111/1751-7915.12367.

Payne, G. A., Nierman, W. C., Wortman, J. R., Pritchard, B. L., Brown, D., Dean, R. A., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Machida, M. y Yu, J. (2006) "Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*.", *Medical mycology*. England, 44(Supplement_1), pp. S9-S11. doi:10.1080/13693780600835716.

Peláez-García de la Rasilla, T., González-Jiménez, I., Fernández-Arroyo, A., Roldán, A., Carretero-Ares, J. L., García-Clemente, M., Telenti-Asensio, M., García-Prieto, E., Martínez-Suarez, M., Vázquez-Valdés, F., Melón-García, S., Caminal-Montero, L., Fernández-Simón, I., Mellado, E. y Sánchez-Núñez, M. L. (2022) "COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA): Hospital or Home Environment as a Source of Life-Threatening *Aspergillus fumigatus* Infection?", *Journal of Fungi*, 8(3). doi:10.3390/jof8030316.

Pelaez, T., Gijón, P., Bunsow, E., Bouza, E., Sánchez-Yebra, W., Valerio, M., Gama, B., Cuenca-Estrella, M. y Mellado, E. (2012a) "Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis", *Journal of clinical microbiology*, 50(7), p. 2531—2534. doi:10.1128/jcm.00329-12.

Pelaez, T., Gijón, P., Bunsow, E., Bouza, E., Sánchez-Yebra, W., Valerio, M., Gama, B., Cuenca-Estrella, M. y Mellado, E. (2012b) "Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis", *Journal of clinical microbiology*, 50(7), p. 2531—2534. doi:10.1128/jcm.00329-12.

Pelaez, T., Monteiro, M. C., Garcia-Rubio, R., Bouza, E., Gomez-Lopez, A. y Mellado, E. (2015) "First detection of *Aspergillus fumigatus* azole-resistant strain due to Cyp51A TR46/Y121F/T289A in an azole-naive patient in Spain", *New Microbes and New Infections*. Elsevier Ltd, 6, pp. 33-34. doi:10.1016/j.nmni.2015.04.005.

Pérez-Cantero, A., López-Fernández, L., Guarro, J. y Capilla, J. (2020) "Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(1). doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.09.011.

Pfaller, J. B., Messer, S. A., Hollis, R. J., Diekema, D. J. y Pfaller, M. A. (2003) "In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs.", *Journal of clinical microbiology*, 41(3), pp. 1126-1129. doi:10.1128/JCM.41.3.1126-1129.2003.

Pfaller, M. A., Carvalhaes, C., Messer, S. A., Rhomberg, P. R. y Castanheira, M. (2020) "Activity of a long-acting echinocandin, rezafungin, and comparator antifungal agents tested against

Bibliografía

contemporary invasive fungal isolates (SENTRY program, 2016 to 2018)", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(4). doi:10.1128/AAC.00099-20.

Phillips, M. A., Steenwyk, J. L., Shen, X. X. y Rokas, A. (2021) "Examination of Gene Loss in the DNA Mismatch Repair Pathway and Its Mutational Consequences in a Fungal Phylum", *Genome biology and evolution*, 13(10), pp. 1-12. doi:10.1093/gbe/evab219.

Pinto, E., Monteiro, C., Maia, M., Faria, M. A., Lopes, V., Lameiras, C. y Pinheiro, D. (2018) "Aspergillus Species and Antifungals Susceptibility in Clinical Setting in the North of Portugal: Cryptic Species and Emerging Azoles Resistance in *A. fumigatus*.", *Frontiers in microbiology*. Switzerland, 9, p. 1656. doi:10.3389/fmicb.2018.01656.

Pontes, L., Beraquet, C. A. G., Arai, T., Pigolli, G. L., Lyra, L., Watanabe, A., Moretti, M. L. y Schreiber, A. Z. (2020) "Aspergillus fumigatus Clinical Isolates Carrying CYP51A with TR34/L98H/S297T/F495I Substitutions Detected after Four-Year Retrospective Azole Resistance Screening in Brazil.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(3). doi:10.1128/AAC.02059-19.

Prigitano, A., Esposto, M. C., Romanò, L., Auxilia, F. y Tortorano, A. M. (2019) "Azole-resistant Aspergillus fumigatus in the Italian environment", *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, pp. 220-224. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.10.017>.

Prigitano, A., Venier, V., Cogliati, M., De Lorenzis, G., Esposto, M. C. y Tortorano, A. M. (2014) "Azole-resistant Aspergillus fumigatus in the environment of northern Italy, May 2011 to June 2012.", *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. Sweden, 19(12), p. 20747. doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.12.20747.

Ragozzino, S., Goldenberger, D., Wright, P. R., Zimmerli, S., Mühlethaler, K., Neofytos, D., Riat, A., Boggian, K., Nolte, O., Conen, A., Fankhauser, H., Schreiber, P. W., Zbinden, R., Lamoth, F. y Khanna, N. (2022) "Distribution of Aspergillus Species and Prevalence of Azole Resistance in Respiratory Samples from Swiss Tertiary Care Hospitals", *Open Forum Infectious Diseases*, 9(2), pp. 1-4. doi:10.1093/ofid/ofab638.

Rath, P.-M., Buchheidt, D., Spiess, B., Arfanis, E., Buer, J. y Steinmann, J. (2012) "First Reported Case of Azole-Resistant Aspergillus fumigatus Due to the TR/L98H Mutation in Germany", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, pp. 6060-6061. Disponible en: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:39095891>.

Ratnadass, A. y Sester, M. (2023) "Crop protection practices and risks associated with human fungal infectious diseases: A One Health perspective", *Cahiers Agricultures*, 32, pp. 234-240. doi:10.1051/cagri/2022036.

Reenan, R. A. y Kolodner, R. D. (1992) "Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins.", *Genetics*. United States, 132(4), pp. 963-973. doi:10.1093/genetics/132.4.963.

dos Reis, T. F., Silva, L. P., de Castro, P. A., Almeida de Lima, P. B., do Carmo, R. A., Marini, M. M., da Silveira, J. F., Ferreira, B. H., Rodrigues, F., Malavazi, I. y Goldman, G. H. (2018) "The Influence of Genetic Stability on Aspergillus fumigatus Virulence and Azole Resistance", *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 8(1), pp. 265-278. doi:10.1534/g3.117.300265.

Ren, J., Jin, X., Zhang, Q., Zheng, Y., Lin, D. y Yu, Y. (2017) "Fungicides induced triazole-resistance in Aspergillus fumigatus associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields.", *Journal of hazardous materials*. Netherlands, 326, pp. 54-60. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.12.013.

- Resendiz-Sharpe, A., Dewaele, K., Merckx, R., Bustamante, B., Vega-Gomez, M. C., Rolon, M., Jacobs, J., Verweij, P. E., Maertens, J. y Lagrou, K. (2021) "Triazole-Resistance in Environmental *Aspergillus fumigatus* in Latin American and African Countries.", *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*. Switzerland, 7(4). doi:10.3390/jof7040292.
- Rivelli Zea, S. M. y Toyotome, T. (2022) "Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* as an emerging worldwide pathogen", *Microbiology and Immunology*, 66(3), pp. 135-144. doi:10.1111/1348-0421.12957.
- Rivero-Menendez, O., Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E. y Cuenca-Estrella, M. (2016) "Triazole resistance in *Aspergillus* spp.: A worldwide problem?", *Journal of Fungi*, 2(3). doi:10.3390/jof2030021.
- Rivero-Menendez, O., Cuenca-Estrella, M. y Alastruey-Izquierdo, A. (2019) "In vitro activity of olorofim (F901318) against clinical isolates of cryptic species of *Aspergillus* by EUCAST and CLSI methodologies", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(6), pp. 1586-1590. doi:10.1093/jac/dkz078.
- Rivero-Menendez, O., Soto-Debran, J. C., Medina, N., Lucio, J., Mellado, E. y Alastruey-Izquierdo, A. (2019) "Molecular identification, antifungal susceptibility testing, and mechanisms of azole resistance in *Aspergillus* species received within a surveillance program on antifungal resistance in Spain", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(9), pp. 1-10. doi:10.1128/AAC.00865-19.
- Rocchi, S., Daguindau, E., Grenouillet, F., Deconinck, E., Bellanger, A.-P., Garcia-Hermoso, D., Bretagne, S., Reboux, G. y Millon, L. (2014) "Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolate with the TR34/L98H mutation in both a fungicide-sprayed field and the lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis.", *Journal of clinical microbiology*. United States, 52(5), pp. 1724-1726. doi:10.1128/JCM.03182-13.
- Rogers, T. R., Verweij, P. E., Castanheira, M., Dannaoui, E., White, P. L. y Arendrup, M. C. (2022) "Molecular mechanisms of acquired antifungal drug resistance in principal fungal pathogens and EUCAST guidance for their laboratory detection and clinical implications", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(8), pp. 2053-2073. doi:10.1093/jac/dkac161.
- Rudramurthy, S. M., Paul, R. A., Chakrabarti, A., Mouton, J. W. y Meis, J. F. (2019) "Invasive aspergillosis by *aspergillus flavus*: Epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management", *Journal of Fungi*, 5(3). doi:10.3390/jof5030055.
- Rudramurthy, S., Seyedmojtaba, S., Manpreet, D., Arunaloake, C., F., M. J. y W., M. J. (2017) "Pharmacodynamics of Voriconazole against Wild-Type and Azole-Resistant *Aspergillus flavus* Isolates in a Nonneutropenic Murine Model of Disseminated Aspergillosis", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, 61(1), pp. 10.1128/aac.01491-16. doi:10.1128/aac.01491-16.
- de Ruiter, M. T., de Valk, H. A., Meis, J. F. G. M. y Klaassen, C. H. W. (2007) "Retrotransposon insertion-site context (RISC) typing: a novel typing method for *Aspergillus fumigatus* and a convenient PCR alternative to restriction fragment length polymorphism analysis.", *Journal of microbiological methods*. Netherlands, 70(3), pp. 528-534. doi:10.1016/j.mimet.2007.06.009.
- Rybak, M. J., Wenbo, G., P., W. N., E., P. J., L., K. S., David, R. P. y R., F. J. (2019) "Mutations in *hmg1*, Challenging the Paradigm of Clinical Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*", *mBio*. American Society for Microbiology, 10(2), pp. 10.1128/mbio.00437-19. doi:10.1128/mbio.00437-19.
- Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008) "Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method", *Nature Protocols*, 3(6), pp. 1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73.

Bibliografía

- Schruefer, S., Böhmer, I., Dichtl, K., Spadinger, A., Kleinemeier, C. y Ebel, F. (2021) "The response regulator Skn7 of *Aspergillus fumigatus* is essential for the antifungal effect of fludioxonil", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 11(1), pp. 1-12. doi:10.1038/s41598-021-84740-6.
- Schruefer, S., Pschibul, A., Wong, S. S. W., Sae-Ong, T., Wolf, T., Schäuble, S., Panagiotou, G., Brakhage, A. A., Amanianda, V., Kniemeyer, O. y Ebel, F. (2023) "Distinct transcriptional responses to fludioxonil in *Aspergillus fumigatus* and its Δ tcsC and Δ skn7 mutants reveal a crucial role for Skn7 in the cell wall reorganizations triggered by this antifungal", *BMC Genomics*. BioMed Central, 24(1), pp. 1-25. doi:10.1186/s12864-023-09777-5.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. y Van Dijck, P. (2002) "On the safety of *Aspergillus niger* - A review", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5), pp. 426-435. doi:10.1007/s00253-002-1032-6.
- Sewell, T. R., Zhang, Y., Brackin, A. P., Shelton, J. M. G., Rhodes, J. y Fisher, M. C. (2019) "Elevated Prevalence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in Urban versus Rural Environments in the United Kingdom.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 63(9). doi:10.1128/AAC.00548-19.
- Seyedmousavi, S., Chang, Y. C., Law, D., Birch, M., Rex, J. H. y Kwon-Chung, K. J. (2019) "Efficacy of Olorofim (F901318) against *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, and *A. tanneri* in Murine Models of Profound Neutropenia and Chronic Granulomatous Disease.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 63(6). doi:10.1128/AAC.00129-19.
- Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M. y Foroumadi, A. (2020) "History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action", *Bioorganic Chemistry*. Elsevier, 104(June), p. 104240. doi:10.1016/j.bioorg.2020.104240.
- Sharma, C., Nelson-Sathi, S., Singh, A., Radhakrishna Pillai, M. y Chowdhary, A. (2019) "Genomic perspective of triazole resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates without cyp51A mutations", *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier, 132(June), p. 103265. doi:10.1016/j.fgb.2019.103265.
- Sierotzki, H. y Scalliet, G. (2013) "A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides", *Phytopathology*, 103(9), pp. 880-887. doi:10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW.
- Simões, D., de Andrade, E. y Sabino, R. (2023) "Fungi in a One Health Perspective", *Encyclopedia*, 3(3), pp. 900-918. doi:10.3390/encyclopedia3030064.
- Singh, A., Healey, K. R., Yadav, P., Upadhyaya, G., Sachdeva, N., Sarma, S., Kumar, A., Tarai, B., Perlin, D. S. y Chowdhary, A. (2018) "Absence of azole or echinocandin resistance in candida glabrata isolates in India despite background prevalence of strains with defects in the dna mismatch repair pathway", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), pp. 1-9. doi:10.1128/AAC.00195-18.
- Singh, A., Sharma, B., Mahto, K. K., Meis, J. F. y Chowdhary, A. (2020) "High-frequency direct detection of triazole resistance in *aspergillus fumigatus* from patients with chronic pulmonary fungal diseases in India", *Journal of Fungi*, 6(2), pp. 1-13. doi:10.3390/jof6020067.
- Snelders, E., Camps, S. M. T., Karawajczyk, A., Rijs, A. J. M. M., Zoll, J., Verweij, P. E. y Melchers, W. J. G. (2015) "Genotype-phenotype complexity of the TR46/Y121F/T289A cyp51A azole resistance mechanism in *Aspergillus fumigatus*.", *Fungal genetics and biology : FG & B*. United States, 82, pp. 129-135. doi:10.1016/j.fgb.2015.06.001.

- Snelders, E., Camps, S. M. T., Karawajczyk, A., Schaftenaar, G., Kema, G. H. J., van der Lee, H. A., Klaassen, C. H., Melchers, W. J. G. y Verweij, P. E. (2012) "Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*", *PLoS ONE*, 7(3). doi:10.1371/journal.pone.0031801.
- Snelders, E., Huis In 't Veld, R. A. G., Rijs, A. J. M. M., Kema, G. H. J., Melchers, W. J. G. y Verweij, P. E. (2009) "Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles.", *Applied and environmental microbiology*, 75(12), pp. 4053-4057. doi:10.1128/AEM.00231-09.
- Snelders, E., Karawajczyk, A., Schaftenaar, G., Verweij, P. E. y Melchers, W. J. G. (2010) "Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 54(6), pp. 2425-2430. doi:10.1128/AAC.01599-09.
- Snelders, E., Van Der Lee, H. A. L., Kuijpers, J., Rijs, A. J. M. M., Varga, J., Samson, R. A., Mellado, E., Donders, A. R. T., Melchers, W. J. G. y Verweij, P. E. (2008) "Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism", *PLoS Medicine*, 5(11), pp. 1629-1637. doi:10.1371/journal.pmed.0050219.
- Solano, C. y Vázquez, L. (2018) "Invasive aspergillosis in the patient with oncohematologic disease", *Revista Iberoamericana de Micología*. Asociación Española de Micología, 35(4), pp. 198-205. doi:10.1016/j.riam.2018.10.001.
- Souza Guimaraes, H. L. y da Costa Souza, N. P. (2017) "Aspergillus Biotechnology: An Overview on the Production of Hydrolases and Secondary Metabolites", *Current Biotechnology*, pp. 283-294. doi:http://dx.doi.org/10.2174/2211550105666160607071134.
- Steinmann, J., Hamprecht, A., Vehreschild, M. J. G. T., Cornely, O. A., Buchheidt, D., Spiess, B., Koldehoff, M., Buer, J., Meis, J. F. y Rath, P.-M. (2015) "Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany.", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. England, 70(5), pp. 1522-1526. doi:10.1093/jac/dku566.
- Stensvold, C. R., Jørgensen, L. N. y Arendrup, M. C. (2012) "Azole-Resistant invasive aspergillosis: Relationship to agriculture", *Current Fungal Infection Reports*, 6(3), pp. 178-191. doi:10.1007/s12281-012-0097-7.
- Stone, N. R. H., Bicanic, T., Salim, R. y Hope, W. (2016) "Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions", *Drugs*, 76(4), pp. 1-16. doi:10.1007/s40265-016-0538-7.Liposomal.
- Sugui, J. A., Peterson, S. W., Figat, A., Hansen, B., Samson, R. A., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M. y Kwon-Chung, K. J. (2014) "Genetic relatedness versus biological compatibility between *Aspergillus fumigatus* and related species", *Journal of Clinical Microbiology*, 52(10), pp. 3707-3721. doi:10.1128/JCM.01704-14.
- Taccone, F. S., Van den Abeele, A. M., Bulpa, P., Misset, B., Meersseman, W., Cardoso, T., Paiva, J. A., Blasco-Navalpotro, M., De Laere, E., Dimopoulos, G., Rello, J., Vogelaers, D., Blot, S. I., Brusselaers, N., Charles, P. E., Clause, D., Courouble, P., Forêt, F., Li, D., Martin, C., Mashayekhi, S., Paiva, J. A., Pasqualotto, A., Pérez, M., Rao, R., d'Hebron, V., Souto, J., Spapen, H. y Vandewoude, K. (2015) "Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: Clinical presentation, underlying conditions, and outcomes", *Critical Care*, 19(1), pp. 1-15. doi:10.1186/s13054-014-0722-7.
- Taher, K., Graf, S., Fakhfakh, M. M., Salah, H. B. H., Yahyaoui, A., Rezgui, S., Nasraoui, B. y Stammler, G. (2014) "Sensitivity of *Zysoseptoria tritici* Isolates from Tunisia to Pyraclostrobin,

Bibliografía

Fluxapyroxad, Epoxiconazole, Metconazole, Prochloraz and Tebuconazole", *Journal of Phytopathology*, 162(7-8), pp. 442-448. doi:10.1111/jph.12210.

Tang, C. M., Cohen, J. y Holden, D. W. (1992) "An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity.", *Molecular microbiology*. England, 6(12), pp. 1663-1671. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb00891.x.

Teclegiorgis, G., Sondus, A., Abdullah, A., P., W. N., Joy, S. K., F., P. T., G., F. S. y S., I. A. (2020) "Fosmanogepix (APX001) Is Effective in the Treatment of Pulmonary Murine Mucormycosis Due to *Rhizopus arrhizus*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, 64(6), pp. 10.1128/aac.00178-20. doi:10.1128/aac.00178-20.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2020) "Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0, 2020", *Eucast*, (April), pp. 0-8. Disponible en: <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals>.

Thomas, C., Alexandre, A., L., K. S., Gurpreet, S., Yasuo, K., S., W. A. G., E., P. J., E., K. D., Genki, K., Lauren, A.-D., Takahiro, N., Mihiro, S., Stuart, O., Damien, C., Franz, L., Matthew, C., Jonathan, S., Michael, C., Stéphane, B., John, K.-U., John, M., Kazuhiro, I., Pete, S. y Garth, R. (2017) " In Vitro and In Vivo Antifungal Profile of a Novel and Long-Acting Inhaled Azole, PC945, on *Aspergillus fumigatus* Infection", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, 61(5), pp. 10.1128/aac.02280-16. doi:10.1128/aac.02280-16.

Toyotome, T., Onishi, K., Sato, M., Kusuya, Y., Hagiwara, D., Watanabe, A. y Takahashi, H. (2021) "Identification of Novel Mutations Contributing to Azole Tolerance of *Aspergillus fumigatus* through In Vitro Exposure to Tebuconazole.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 65(9), p. e0265720. doi:10.1128/AAC.02657-20.

Vahedi Shahandashti, R. y Lass-Flörl, C. (2019) "Antifungal resistance in *Aspergillus terreus*: A current scenario", *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier Inc., 131(June), p. 103247. doi:10.1016/j.fgb.2019.103247.

De Valk, H. A., Meis, J. F. G. M., Curfs, I. M., Muehlethaler, K., Mouton, J. W. y Klaassen, C. H. W. (2005) "Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates", *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), pp. 4112-4120. doi:10.1128/JCM.43.8.4112-4120.2005.

Valsecchi, I., Mellado, E., Beau, R., Raj, S. y Latgé, J. P. (2015) "Fitness studies of azole-resistant strains of *Aspergillus fumigatus*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), pp. 7866-7869. doi:10.1128/AAC.01594-15.

Van De Veerdonk, F. L., Gresnigt, M. S., Romani, L., Netea, M. G. y Latgé, J. P. (2017) "*Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions", *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 15(11), pp. 661-674. doi:10.1038/nrmicro.2017.90.

Vela-Corcía, D., Romero, D., De Vicente, A. y Pérez-García, A. (2018) "Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance", *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1-12. doi:10.1038/s41598-018-25336-5.

Veloukas, T., Kalogeropoulou, P., Markoglou, A. N. y Karaoglanidis, G. S. (2014) "Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations", *Phytopathology*, 104(4), pp. 347-356. doi:10.1094/PHYTO-07-13-0208-R.

Vermeulen, E., Maertens, J., De Bel, A., Nulens, E., Boelens, J., Surmont, I., Mertens, A., Boel, A.

y Lagrou, K. (2015) "Nationwide Surveillance of Azole Resistance in Aspergillus Diseases.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 59(8), pp. 4569-4576. doi:10.1128/AAC.00233-15.

Vermeulen, E., Maertens, J., Schoemans, H. y Lagrou, K. (2012) "Azole-resistant Aspergillus fumigatus due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012.", *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. Sweden, 17(48).

Verweij, Paul E, Chowdhary, A., Melchers, W. J. G. y Meis, J. F. (2016) "Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles?", *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 62(3), pp. 362-368. doi:10.1093/cid/civ885.

Verweij, P. E., Lucas, J. A., Arendrup, M. C., Bowyer, P., Brinkmann, A. J. F., Denning, D. W., Dyer, P. S., Fisher, M. C., Geenen, P. L., Gisi, U., Hermann, D., Hoogendijk, A., Kiers, E., Lagrou, K., Melchers, W. J. G., Rhodes, J., Rietveld, A. G., Schoustra, S. E., Stenzel, K., Zwaan, B. J. y Fraaije, B. A. (2020) "The one health problem of azole resistance in Aspergillus fumigatus: current insights and future research agenda", *Fungal Biology Reviews*. Elsevier Ltd, 34(4), pp. 202-214. doi:10.1016/j.fbr.2020.10.003.

Verweij, Paul E., Zhang, J., Debets, A. J. M., Meis, J. F., van de Veerdonk, F. L., Schoustra, S. E., Zwaan, B. J. y Melchers, W. J. G. (2016) "In-host adaptation and acquired triazole resistance in Aspergillus fumigatus: a dilemma for clinical management", *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 16(11), pp. e251-e260. doi:10.1016/S1473-3099(16)30138-4.

Vidal-Acuña, M. R., Ruiz, M., Torres, M. J. y Aznar, J. (2019) "Prevalence and in vitro antifungal susceptibility of cryptic species of the genus Aspergillus isolated in clinical samples", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(5), pp. 296-300. doi:10.1016/j.eimc.2018.07.010.

Vincent, B. M., Lancaster, A. K., Scherz-Shouval, R., Whitesell, L. y Lindquist, S. (2013) "Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B", *PLoS Biology*, 11(10). doi:10.1371/journal.pbio.1001692.

Wang, X., Li, X., Wang, Y., Qin, Y., Yan, B. y Martyniuk, C. J. (2021) "A comprehensive review of strobilurin fungicide toxicity in aquatic species: Emphasis on mode of action from the zebrafish model", *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 275, p. 116671. doi:10.1016/j.envpol.2021.116671.

Warrilow, A. G. S., Parker, J. E., Price, C. L., Nes, W. D., Kelly, S. L. y Kelly, D. E. (2015) "In Vitro Biochemical Study of CYP51-Mediated Azole Resistance in Aspergillus fumigatus.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 59(12), pp. 7771-7778. doi:10.1128/AAC.01806-15.

WHO releases first-ever list of health-threatening fungi (2022) *Saudi medical journal*.

Wiedemann, A., Spadinger, A., Löwe, A., Seeger, A. y Ebel, F. (2016) "Agents that activate the High Osmolarity Glycerol pathway as a means to combat pathogenic molds", *International Journal of Medical Microbiology*, 306(8), pp. 642-651. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005.

Wiederhold, N. P. (2022) "Pharmacodynamics, Mechanisms of Action and Resistance, and Spectrum of Activity of New Antifungal Agents", *Journal of Fungi*, 8(8). doi:10.3390/jof8080857.

Wiederhold, N. P., Gil, V. G., Gutierrez, F., Lindner, J. R., Albatineh, M. T., McCarthy, D. I., Sanders, C., Fan, H., Fothergill, A. W. y Sutton, D. A. (2016) "First Detection of TR34 L98H and

Bibliografía

TR46 Y121F T289A Cyp51 Mutations in *Aspergillus fumigatus* Isolates in the United States.", *Journal of clinical microbiology*. United States, 54(1), pp. 168-171. doi:10.1128/JCM.02478-15.

World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, United Nations Environment Programme y World Organisation for Animal Health (2023) *A one health priority research agenda for antimicrobial resistance*, *FAO publications catalogue 2022*.

Xiao, L., Madison, V., Chau, A. S., Loebenberg, D., Palermo, R. E. y McNicholas, P. M. (2004) "Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding.", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. United States, 48(2), pp. 568-574. doi:10.1128/AAC.48.2.568-574.2004.

Yanicostas, C. y Soussi-yanicostas, N. (2021) "Sdhi fungicide toxicity and associated adverse outcome pathways: What can zebrafish tell us?", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22). doi:10.3390/ijms222212362.

Zhang, J., van den Heuvel, J., Debets, A. J. M., Verweij, P. E., Melchers, W. J. G., Zwaan, B. J. y Schoustra, S. E. (2017) "Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides", *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, 284(1863), p. 20170635. doi:10.1098/rspb.2017.0635.

Zhang, J., Li, L., Lv, Q., Yan, L., Wang, Y. y Jiang, Y. (2019) "The fungal CYP51s: Their functions, structures, related drug resistance, and inhibitors", *Frontiers in Microbiology*, 10(April). doi:10.3389/fmicb.2019.00691.

Zheng, B., Yan, L., Liang, W. y Yang, Q. (2019) "Paralogous Cyp51s mediate the differential sensitivity of *Fusarium oxysporum* to sterol demethylation inhibitors", *Pest Management Science*. John Wiley & Sons, Ltd, 75(2), pp. 396-404. doi:https://doi.org/10.1002/ps.5127.

Zhou, D., Korfanty, G. A., Mo, M., Wang, R., Li, X., Li, H., Li, S., Wu, J.-Y., Zhang, K.-Q., Zhang, Y. y Xu, J. (2021) "Extensive Genetic Diversity and Widespread Azole Resistance in Greenhouse Populations of *Aspergillus fumigatus* in Yunnan, China.", *mSphere*. United States, 6(1). doi:10.1128/mSphere.00066-21.

Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J. J., Rohr, J., Scharmüller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schulz, R. y Schäfer, R. B. (2019) "Fungicides: An Overlooked Pesticide Class?", *Environmental Science and Technology*, 53(7), pp. 3347-3365. doi:10.1021/acs.est.8b04392.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO I: Cepas de *A. fumigatus* utilizadas en el método de cribado

Cepa	Origen (*)	Modificación en Cyp51A	TRESPERG			
			CSP	MP2	CFEM	ERG
TP-3	España (A)	TR34/L98H	t10	m1.1	c08A	e05
TP-367	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e11
TP-369	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e05
TP-391	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e05
TP-436	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e05
TP-494	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e05
TP-579	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e11
TP-1003	España (C)	TR34/L98H	t10	m1.1	c08A	e05
TP-1003E	España (C)	TR34/L98H	t10	m1.1	c08A	e05
TP-1004	España (C)	TR34/L98H	t10	m1.1	c08A	e05
TP-1004E	España (C)	TR34/L98H	t10	m1.1	c08A	e05
TP-1005_	España (C)	TR34/L98H	t2	m1.1	C09	e16
H-100	España (C)	TR34/L98H	t04B	m1.2	c22	e07
TP-14988	España (C)	TR34/L98H	t4	m1.1	c8B	e7
CNM CM-7582	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e16
CNM CM-7609	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.4	c09	e16
CNM CM-8535	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e13
CNM CM-8714	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e16
CNM CM-9339	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e05
CNM CM-9399	España (C)	TR34/L98H	t02	m1.1	c09	e05
CNM CM-9670	España (C)	TR34/L98H	ND	ND	ND	ND
CNM CM-9701	España (C)	TR34/L98H	t28	m12.1	c08A	E11
CNM CM-9886	España (C)	TR34/L98H	t01	m1.1	c12	e07
M10731	Países Bajos (C)	TR34/L98H/S297T/F495I	t02	m1.1	c09	e05
CNM CM-3271	Países Bajos (C)	TR34/L98H/S297T/F495I	t02	m1.5	c09	e16
TP-90812	España (C)	TR46/Y121F/T289A	t01	m1.1	c09	e05
CNM CM-8057	España (C)	TR46/Y121F/T289A	t01	m1.8	c08A	e09
CNM CM-9103	España (C)	TR46/Y121F/T289A	t01	m1.1	c09	e15
CNM CM-9396	España (C)	TR46/Y121F/T289A	t01	m1.1	c09	e15
CR051	España (LM)	TR53	t01	m5.6	c08.1	e07
CNM CM-4599	Países Bajos (C)	TR53	t04A	m1.1	c09	e13
CNM CM-1244	Rei Unido (C)	G54	t01	m5.3	c08A	e07
CNM CM-2160	Rei Unido (C)	G54	t02	m1.1	c09	e16
CNM CM-2161	Rei Unido (C)	G54	t01	m5.3	c07	e05
CNM CM-2162	Rei Unido (C)	G54	t04A	m1.1	c08A	e07
CNM CM-2266	España (C)	G54	t03	m1.1	c08B	e02
CNM CM-3500	España (C)	G54	t03	m1.1	c08B	e02
CNM CM-8940	España (C)	G54	t04A	m1.3	c08A	e07
CNM CM-9114	España (C)	G54	t02	m1.1	c22	e16
CNM CM-9501	España (C)	G54	t02	m1.8	c22	e20
CNM CM-9551	España (C)	G54	t02	m1.8	c22	e20
CR061	España (LM)	G54	t01	m5.6	c08.1	e07
CNM CM-1245	Rei Unido (C)	M220	t04.1	m5.3	c08.1	e07
CNM CM-1252	Rei Unido (C)	M220	t04.1	m5.3	c08.1	e07
CNM CM-2159	Rei Unido (C)	M220	t02	m1.1	c09	e16
CNM CM-2164	Rei Unido (C)	M220	t02	m1.2	c04	e05
CNM CM-4593	Países Bajos (C)	M220	t01	m5.1	c09	e06
CR 060	España (LM)	M220	t01	m5.6	c08.1	e07
TP-1362	España (C)	G448S	t01	m3.4	c08A	e07
CNM CM-9702	España (C)	G448S	t01	m5.3	c06	e07
CNM CM-9820	España (C)	G448S	ND	ND	ND	ND
CNM CM-9821	España (C)	G448S	ND	ND	ND	ND

TP-1	España (A)	G448S	t04A	m1.3	c05A	e07
TP-2	España (A)	G448S	t04A	m1.3	c05A	e07
TP-4	España (A)	G448S	t04A	m1.3	c05A	e07
AF237	Cepa de referencia	WT	t03	m1.1	c08.1	e07
ATCC46645	Cepa de referencia	WT	t02	m1.1	c23	e05
CBS	Cepa de referencia	WT	t01	m5.6	c08.1	e07
CNM CM-2120	España (C)	WT	t03	m1.1	c09	e09
CNM CM-2123	España (C)	WT	t01	m1.2	c08.1	e07
CNM CM-2126	España (C)	WT	t01	m3.4	c22	e11
CNM CM-2141	España (C)	WT	t02	m6.5	c08.1	e16
CNM CM-2142	España (C)	WT	t03	m1.3	c05.1	e07
CNM CM-2157	España (C)	WT	t04.1	m5.5	c03	e11
CNM CM-2167	España (C)	WT	t01	m1.1	c08.1	e07
CNM CM-2182	España (C)	WT	t04.1	m1.3	c08.2	e11
CNM CM-2195	España (C)	WT	t01	m5.3	c10	e07
CNM CM-2200	España (C)	WT	t04.1	m1.8	c08.1	e06
CNM CM-2202	España (C)	WT	t03	m1.1	c07	e09
CNM CM-2580	España (C)	WT	t01	m5.5	c03	e11
CNM CM-4210	España (C)	WT	t10	m1.1	c05.1	e07
CNM CM-4601	España (C)	WT	t01	m1.1	c19	e07
CNM CM-4862	España (C)	WT	t02	m1.1	c09	e05
CNM CM-4876	España (C)	WT	t04.1	m1.1	c08.1	e15
CNM CM-4896	España (C)	WT	t02	m1.1	c09	e05
CNM CM-4982	España (C)	WT	t26	m1.1	c08.1	e16
CNM CM-5052	España (C)	WT	t01	m5.7	c08.1	e07
CNM CM-5143	España (C)	WT	t01	m1.1	c05.1	e07
CNM CM-5163	España (C)	WT	t01	m1.7	c08.1	e11
CNM CM-5178	España (C)	WT	t03	m5.4	c08.1	e07
CNM CM-5297	España (C)	WT	t04.1	m1.1	c02	e04
CNM CM-5325	España (C)	WT	t03	m5.3	c09	e07
CNM CM-5360	España (C)	WT	t01	m1.1	c12	e07
CNM CM-5390	España (C)	WT	t02	m5.4	c09	e07
CNM CM-5392	España (C)	WT	t25	m1.1	c08.1	e11
CNM CM-5393	España (C)	WT	t01	m3.1	c08.1	e07
CNM CM-5403	España (C)	WT	t03	m1.1	c12	e09
CNM CM-5409	España (C)	WT	t04.1	m1.1	c03	e07
CNM CM-5410	España (C)	WT	t04.1	m1.1	c12	e15
CNM CM-5411	España (C)	WT	t04.1	m3.4	c09	e06
CNM CM-5417	España (C)	WT	t03	m1.1	c05.1	e06
CNM CM-5419	España (C)	WT	t06.2	m6.2	c08.1	e11
CNM CM-5485	España (C)	WT	t01	m3.4	c20	e05
CNM CM-5489	España (C)	WT	t04.1	m3.4	c08.1	e06
CNM CM-5536	España (C)	WT	t02	m1.2	c09	e05
CNM CM-5590	España (C)	WT	t04.1	m1.1	c08.1	e15
CNM CM-5621	España (C)	WT	t18.1	m1.1	c05.1	e06
CNM CM-5635	España (C)	WT	t01	m5.1	c09	e06
CNM CM-5703	España (C)	WT	t02	m1.2	c09	e05
CNM CM-5725	España (C)	WT	t06.2	m3.4	c08.1	e07
CNM CM-5736	España (C)	WT	t06.2	m3.4	c08.1	e07
CNM CM-5756	España (C)	WT	t04.1	m1.3	c08.1	e07
CNM CM-5757	España (C)	WT	t04.1	m5.3	c16	e07
CNM CM-5836	España (C)	WT	t02	m1.1	c08.1	e13
CNM CM-5888	España (C)	WT	t01	m1.1	c08.1	e07

* C, clínica; A, ambiental; LM, mutante del laboratorio. ND: determinado.

ANEXO II. Cepas de *A. fumigatus* empleadas en el estudio del genoma

Cepa	Cyp51A	CytB	B-TUB	SDH2	Msh6	País	Origen	Año	Clado
ES42518	WT		WT	WT	--	IT	VET	2016	I
CM6616	WT		WT	WT	--	ES	CL	2012	
CM6458	WT		WT	WT	--	ES	CL	2011	
ES59287	WT		WT	WT	--	IT	VET	2016	
09-7500806	WT		WT	WT	--	RU	CL	--	
ATCC204305/2580	WT		WT	WT	--	Ref	--	--	
IFM58029	WT		WT	WT	--	JP	CL	--	
IFM59361	WT		WT	WT	--	JP	CL	--	
IFM62516	WT		WT	WT	--	JP	CL	--	
IFM55369	WT		F200Y	WT	--	JP	CL	--	
IFM59359	WT		WT	WT	--	JP	CL	--	
IFM59777	WT		WT	WT	--	JP	CL	--	
IFM59073	WT		WT	WT	--	JP	CL	--	
CM5757	WT		WT	WT	--	ES	CL	2009	
CM5907	WT		WT	WT	--	ES	CL	2009	
12-7504462	WT		WT	WT	--	RU	CL	--	
CM7555	WT (R)		WT	WT	--	ES	CL	2014	
SL143439	WT		WT	WT	--	PG	--	--	
08-19-02-30	WT		WT	WT	--	PB	AM	--	
CM9114	G54R		WT	WT	--	ES	CL	2017	
SL143437	WT		WT	WT	--	PG	CL	--	
SL143441	WT		WT	WT	--	PG	--	--	I
IFM59056	WT		WT	WT	--	JP	CL	--	
IFM58401	WT		WT	WT	--	JP	CL	--	
TP17	WT		WT	WT	--	ES	CL	2008	
CM7510	WT (R)		WT	WT	--	ES	CL	2014	
CBS CA10	WT		WT	WT	--	Ref	CL	--	
akuBKU80	WT		WT	WT	--	Ref	CL	--	
SL143435	N248K		WT	WT	--	PG	--	--	
SL143438	N248K		WT	WT	--	PG	--	--	
SL146112	N248K		WT	WT	--	PG	--	--	
IFM61118	N248K		WT	WT	--	JP	CL	--	
IFM61578	P216L		WT	WT	--	JP	CL	--	
IFM58026	N248K		WT	WT	--	JP	CL	--	
CM3248	N248K		WT	WT	--	ES	CL	2005	
IFM59365	WT		WT	WT	--	JP	CL	--	

F16134	M220K		WT	WT	--	DN	CL	--	I	
ES7913			WT	WT	--	IT	VET	2017		
F17764	WT		WT	WT	--	CN	CL	--		
F12219	G54R		WT	WT	--	RU	CL	--		
AF41	WT		WT	WT	--	RU	CL	--		
AF72	G54E		WT	WT	--	RU	CL	2002		
F14403	G54R		WT	WT	--	RU	CL	--		
IFM60514	WT		WT	WT	--	JP	CL	--		
IFM61407	WT		WT	WT	--	JP	CL	--		
IFM61610	WT		WT	WT	--	JP	CL	--		
AF90	M220V		WT	WT	--	RU	CL	1997		
SL143436	WT		WT	WT	--	PG	--	--		
T11	WT		WT	WT	--	DN	AM	2009		
CM8900	WT (R)		WT	WT	--	ES	CL	2017		
CM9103	WT		WT	WT	--	ES	CL	2017		
CM4862	WT		WT	WT	--	ES	CL	2007		
TP16	WT		WT	WT	--	ES	AM	2013		
CM8940	G54A		WT	WT	--	ES	CL	2017		
F16311	WT		WT	WT	--	RU	CL	--		
F18085	WT		WT	WT	--	RU	CL	--		
CM237	WT		WT	WT	--	RU	CL	--		
CM6126	WT		WT	WT	--	ES	CL	2010		
CM6052	WT		WT	WT	G240A	ES	CL	2010		
F17729	WT		WT	WT	--	RU	CL	--		
F17729W	WT		WT	WT	--	RU	CL	--		
F14946G	WT		WT	WT	--	RU	CL	--		
CM7467	WT		WT	WT	--	ES	CL	2014		II
CM2123	WT		WT	WT	--	ES	CL	2002		
T22	TR34/L98H		F200Y	R51G	G240A	DM	AM	2009		
TP20	TR34/L98H		F200Y	WT	G240A	ES	CL	2010		
2762619	TR34/L98H		F200Y	WT	G240A	ES	CL	2010		
TP8	TR34/L98H		F200Y	H270R	G240A	ES	CL	2013		
TP22/90812	TR46/F121Y	G143A	F200Y	H270Y	G240A	ES	CL	--		
10-01-02-27	TR34/L98H	G143A	F200Y	H270Y	G240A	PB	CL	--		
TP9	TR34/L98H		F200Y	WT	G240A	ES	CL	2013		
CM7609	TR34/L98H	F129L	F200Y	WT	G240A	ES	CL	2014		
TP7	TR34/L98H		F200Y	H270R	G240A	ES	CL	2013		
TP6	TR34/L98H		F200Y	H270R	G240A	ES	CL	2012		
CM4599	TR53	G143A	F200Y	WT	G240A	PB	CL	2006		
Afu343-P-11	TR34/L98H		F200Y	WT	G240A	IN	CL	--		
Afu591-12	TR34/L98H	G143A	F200Y	WT	G240A	IN	CL	--		
Afu218-E11	TR34/L98H	G143A	F200Y	WT	G240A	IN	AM	--		

Afu166-E11	TR34/L98H	G143A	F200Y	WT	G240A	IN	AM	--	
Afu124-E11	TR34/L98H	G143A	F200Y	WT	G240A	IN	AM	--	
Afu257-E11	TR34/L98H	G143A	F200Y	WT	G240A	IN	AM	--	
Afu1042-09	TR34/L98H	G143A	F200Y	WT	G240A	IN	CL	--	
08-36-03-25	TR34/L98H*		F200Y	WT	G240A	PB	CL	--	
CM8022*	TR34/L98H*		E198Q	T298A	G240A	ES	CL	2016	
M10731*	TR34/L98H*		E198Q	WT	G240A	DN	CL	--	
08-12-12-13	TR34/L98H*		F200Y	WT	--	PB	CL	--	
CM3271*	TR34/L98H*		F200Y	WT	--	PB	CL	2004	
CM3273*	TR34/L98H*		E198Q	WT	--	PB	CL	2004	
CM8535	TR34/L98H	G143A	F200Y	WT	--	ES	CL	2016	
08-31-08-91	TR34/L98H		F200Y	WT	G240A	PB	CL	--	
ES49519	WT		WT	WT	G240A	IT	VET	2016	
CM6051	WT		WT	WT	--	ES	CL	2010	
CM2141	WT		WT	WT	G240A	ES	CL	2002	
CM5419	WT		WT	WT	--	ES	CL	2008	
ES7601	WT		WT	WT	G240A	IT	VET	2017	
ES36254	WT		WT	WT	G240A	IT	VET	2017	
ES36359	WT		WT	WT	G240A	IT	VET	2017	
ES4649	WT		WT	WT	G240A	IT	VET	2017	
CM4023	TR34/L98H		WT	WT	G240A	PB	CL	2006	
12-7505446	TR34/L98H		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
08-19-02-46	TR34/L98H		WT	WT	G240A	PB	AM	--	
08-19-02-61	TR34/L98H		WT	WT	G240A	PB	AM	--	
T18	TR34/L98H		WT	WT	G240A	DN	AM	2009	
CM3820	TR34/L98H		WT	WT	G240A	PB	CL	2005	
CM4594	TR34/L98H		WT	WT	G240A	PB	CL	2004	
CM3936	TR34/L98H		WT	WT	G240A	PB	CL	2005	
CM4050	TR34/L98H		WT	WT	G240A	PB	CL	2006	
CM8190	TR34/L98H		WT	WT	G240A	ES	CL	2016	
R13	TR34/L98H		WT	WT	G240A	DM	AM	2009	
12-7505220	TR34/L98H		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
08-19-02-10	TR34/L98H		WT	WT	G240A	PB	EN	--	
CM7496	WT		WT	WT	G240A	ES	CL	2014	
ATCC46645	WT		WT	WT	--	Ref	--	--	
F12636	G54E		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
ES48850	WT		WT	WT	G240A	IT	VET	2017	
ES5784	WT		WT	WT	G240A	IT	VET	2017	
CM8755	WT		WT	WT	G240A	ES	CL	2016	
F5211G	WT		WT	WT	G240A	RU	CL	--	

CM2159	M220K		WT	WT	G240A	RU	CL	--	II
Af65	WT		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
12-7504652	WT		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
12-7505054	WT		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
CM5390	WT		WT	WT	G240A	ES	CL	2008	
F14513G	G138C		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
F13535	G138C		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
F13952	G138C		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
F12041	G138C		WT	WT	G240A	RU	CL		
CM3277	TR34/L98H		E198A	WT	G240A	PB	CL	2007	II
CM7582	TR34/L98H		E198A	WT	G240A	ES	CL	2014	
F16216	TR34/L98H		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
CM3819	TR34/L98H	G143A	E198A	WT	G240A	PB	CL	2005	
TP5	TR34/L98H		E198A	WT	G240A	ES	CL	2013	
CM8714	TR34/L98H		E198A	WT	G240A	ES	CL	2016	
F17582	WT		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
CM5536	WT		WT	WT	--	ES	CL	2009	
F15390	M220T		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
F14532	M220T		WT	WT	G240A	RU	CL	--	
CM5703	WT		WT	WT	G240A	ES	CL	2009	
TP3	WT		WT	WT	--	ES	AM	2012	
F13619	H147Y G448S		WT	WT	G240A	RU	CL	---	
CM2097	G54R		WT	WT	--	FR	CL	1997	
CM4896	WT		WT	WT	--	ES	CL	2007	
F7763	5SNPs		WT	WT	--	RU	CL	--	III
TP12	5SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2001	
CM7632	5SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2015	
AF293	5SNPs		WT	WT	--	Ref	CL	--	
TP32	3SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2012	IV
F15927	3SNPs		WT	WT	--	CN	CL	--	
SL143440	3SNPs		WT	WT	--	PG	--	--	
CM2495	3SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2003	
CM2730	3SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2004	
CM2733	3SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2004	
CM3249	3SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2005	
CM3262	3SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2005	
CM3720	3SNPs (R)		WT	WT	--	ES	CL	2006	
CM4602	3SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2006	
CM4946	3SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2007	

CM7560	3 SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2014	IV
CM7570	3 SNPs		WT	WT	--	ES	CL	2014	

ES, España; PG, Portugal; CN, Canadá; IN, India; RU, Reino Unido; DN, Dinamarca; PB, Países Bajos; FR, Francia; JN, Japón; Ref, Referencia

ANEXO III: Colección de cepas de *Aspergillus* spp. aisladas en el estudio prospectivo de 3 años

Número de cepario	Año de aislamiento	Tipo de muestra	Especie
1	2019	Ambiental	<i>A. flavus</i>
2	2019	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
3	2019	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
4	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
5	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
6	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
7	2019	Clínica	<i>A. calidoustus</i>
8	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
9	2019	Clínica	<i>A. terreus</i>
10	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
11	2019	Clínica	<i>A. terreus</i>
12	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
13	2019	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
14	2019	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
15	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
16	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
17	2019	Ambiental	<i>A. niger</i>
18	2019	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
19	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
20	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
21	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
22	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
23	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
24	2019	Clínica	<i>A. lentulus</i>
25	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
26	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
27	2019	Clínica	<i>A. terreus</i>
28	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
29	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
30	2019	Clínica	<i>A. lentulus</i>
31	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
32	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
33	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
34	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
35	2019	Clínica	<i>A. carneus</i>
36	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
37	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
38	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
39	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
40	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
41	2019	Clínica	<i>A. calidoustus</i>
42	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>

43	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
44	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
45	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
46	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
47	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
48	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
49	2019	Clínica	<i>A. unguis</i>
50	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
51	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
52	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
53	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
54	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
55	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
56	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
57	2019	Clínica	<i>A. lentulus</i>
58	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
59	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
60	2019	Clínica	<i>A. candidus</i>
61	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
62	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
63	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
64	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
65	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
66	2019	Clínica	<i>A. terreus</i>
67	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
68	2019	Clínica	<i>A. candidus</i>
69	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
70	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
71	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
72	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
73	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
74	2019	Clínica	<i>A. lentulus</i>
75	2019	Clínica	<i>A. terreus</i>
76	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
77	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
78	2019	Clínica	<i>A. flavus</i>
79	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
80	2019	Clínica	<i>A. lentulus</i>
81	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
82	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
83	2019	Clínica	<i>A. terreus</i>
84	2019	Clínica	<i>A. niger</i>
85	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>

86	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
87	2019	Clínica	<i>A. terreus</i>
88	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
89	2019	Clínica	<i>A. lentulus</i>
90	2019	Clínica	<i>A. nidulans</i>
91	2019	Clínica	<i>A. nidulans</i>
92	2019	Clínica	<i>A. versicolor</i>
93	2019	Clínica	<i>A. terreus</i>
94	2019	Clínica	<i>A. nidulans</i>
95	2019	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
96	2020	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
97	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
98	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
99	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
100	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
101	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
102	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
103	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
104	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
105	2020	Clínica	<i>A. nidulans</i>
106	2020	Clínica	<i>A. nidulans</i>
107	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
108	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
109	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
110	2020	Clínica	<i>A. lentulus</i>
111	2020	Clínica	<i>A. lentulus</i>
112	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
113	2020	Clínica	<i>A. unguis</i>
114	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
115	2020	Clínica	<i>A. lentulus</i>
116	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
117	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
118	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
119	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
120	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
121	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
122	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
123	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
124	2020	Clínica	<i>A. versicolor</i>
125	2020	Clínica	<i>A. unguis</i>
126	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
127	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
128	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>

129	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
130	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
131	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
132	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
133	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
134	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
135	2020	Clínica	<i>A. fumigatiaffinis</i>
136	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
137	2020	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
138	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
139	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
140	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
141	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
142	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
143	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
144	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
145	2020	Clínica	<i>A. lentulus</i>
146	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
147	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
148	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
149	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
150	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
151	2020	Ambiental	<i>A. nidulans</i>
152	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
153	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
154	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
155	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
156	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
157	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
158	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
159	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
160	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
161	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
162	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
163	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
164	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
165	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
166	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
167	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
168	2020	Clínica	<i>A. nidulans</i>
169	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
170	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
171	2020	Clínica	<i>A. lentulus</i>

172	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
173	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
174	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
175	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
176	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
177	2020	Clínica	<i>A. nidulans</i>
178	2020	Clínica	<i>A. nidulans</i>
179	2020	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
180	2020	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
181	2020	Clínica	<i>N. udagawae</i>
182	2020	Clínica	<i>N. udagawae</i>
183	2020	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
184	2020	Clínica	<i>A. terreus</i>
185	2020	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
186	2020	Ambiental	<i>A. terreus</i>
187	2020	Clínica	<i>A. niger</i>
188	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
189	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
190	2020	Clínica	<i>A. flavus</i>
191	2021	Clínica	<i>A. flavus</i>
192	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
193	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
194	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
195	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
196	2021	Clínica	<i>A. nidulans</i>
197	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
198	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
199	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
200	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
201	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
202	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
203	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
204	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
205	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
206	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
207	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
208	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
209	2021	Ambiental	<i>A. niger</i>
210	2021	Ambiental	<i>A. nidulans</i>
211	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
212	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
213	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
214	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
215	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>

216	2021	Clínica	<i>A. nidulans</i>
217	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
218	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
219	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
220	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
221	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
222	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
223	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
224	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
225	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
226	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
227	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
228	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
229	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
230	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
231	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
232	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
233	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
234	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
235	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
236	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
237	2021	Ambiental	<i>A. niger</i>
238	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
239	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
240	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
241	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
242	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
243	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
244	2021	Clínica	<i>A. nidulans</i>
245	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
246	2021	Clínica	<i>N. udagawae</i>
247	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
248	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
249	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
250	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
251	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
252	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
254	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
256	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
257	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
258	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
259	2021	Clínica	<i>A. nidulans</i>
260	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>

261	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
262	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
263	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
269	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
270	2021	Ambiental	<i>A. niger</i>
271	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
272	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
273	2021	Ambiental	<i>A. niger</i>
274	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
275	2021	Ambiental	<i>A. nidulans</i>
276	2021	Ambiental	<i>A. niger</i>
277	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
278	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
279	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
280	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
281	2021	Clínica	<i>A. flavus</i>
282	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
283	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
284	2021	Ambiental	<i>A. niger</i>
285	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
286	2021	Ambiental	<i>A. niger</i>
287	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
288	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
289	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
290	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
291	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
292	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
293	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
294	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
295	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
296	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
297	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
298	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
299	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
300	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
301	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
302	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
303	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
304	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
305	2021	Ambiental	<i>A. niger</i>
306	2021	Clínica	<i>A. ochraceus</i>
307	2021	Clínica	<i>A. calidoustus</i>
308	2021	Clínica	<i>A. nidulans</i>
309	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>

310	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
311	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
312	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
313	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
314	2021	Clínica	<i>A. ochraceus</i>
315	2021	Clínica	<i>A. flavus</i>
316	2021	Clínica	<i>A. sydowii</i>
317	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
318	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
319	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
320	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
321	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
322	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
323	2021	Ambiental	<i>A. unguis</i>
324	2021	Ambiental	<i>A. unguis</i>
325	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
326	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
327	2021	Clínica	<i>A. ochraceus</i>
328	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
329	2021	Clínica	<i>A. niger</i>
330	2021	Ambiental	<i>A. niger</i>
331	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
332	2021	Clínica	<i>A. nidulans</i>
333	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
334	2021	Ambiental	<i>A. fumigatus</i>
335	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
336	2021	Clínica	<i>A. nidulans</i>
337	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
338	2021	Clínica	<i>A. terreus</i>
339	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
340	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
341	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
342	2021	Clínica	<i>A. fumigatus</i>
343	2021	Clínica	<i>A. versicolor</i>

ANEXO IV: Artículo publicado

An expanded agar-based screening method for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*

Jose Lucio¹ | Irene Gonzalez-Jimenez¹ | Rocio Garcia-Rubio¹ | Maria Soledad Cuetera² | Emilia Mellado^{1,3} 

¹Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Spain

²Microbiology Department, Hospital Severo Ochoa, Leganés, Spain

³Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016), ISCIII, Majadahonda, Spain

Correspondence

Emilia Mellado, Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain.
Email: emellado@isciii.es

Funding information

Fondo de Investigación Sanitaria, Grant/Award Number: FIS PI18CIII/00045; Fondo de Investigación Sanitaria, Grant/Award Number: F17CIII/00037

Abstract

Antifungal susceptibility testing is an essential tool for guiding antifungal therapy. Reference methods are complex and usually only available in specialised laboratories. We have designed an expanded agar-based screening method for the detection of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. Normally, identification of resistance mechanisms is obtained only after sequencing the *cyp51A* gene and promoter. However, our screening method provides azole resistance detection and presumptive resistance mechanisms identification. A previous agar-based method consisting of four wells containing voriconazole, itraconazole, posaconazole and a growth control, detected azole resistance to clinical azoles. Here, we have modified the concentrations of voriconazole and posaconazole to adapt to the updated EUCAST breakpoints against *A. fumigatus*. We have also expanded the method to include environmental azoles to assess azole resistance and the azole resistance mechanism involved. We used a collection of *A. fumigatus* including 54 azole-resistant isolates with Cyp51A modifications (G54, M220, G448S, TR₅₃, TR₃₄/L98H, TR₄₆/Y121F/T289A, TR₃₄/L98H/S297T/F495I), and 50 azole susceptible isolates with wild-type Cyp51A. The screening method detects azole-resistant *A. fumigatus* isolates when there is growth in any of the azole-containing wells after 48h. The growth pattern in the seven azoles tested helps determine the underlying azole resistance mechanism. This approach is designed for surveillance screening of *A. fumigatus* azole-resistant isolates and can be useful for the clinical management of patients prior to antifungal susceptibility testing confirmation.

KEYWORDS

Aspergillus fumigatus, azole resistance, Cyp51A mutations, screening method, surveillance studies

1 | INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus is the most representative species among the genus *Aspergillus*. This ubiquitous mould is the cause of different diseases named aspergillosis, among which invasive aspergillosis (IA) stands out as of the most critical clinical manifestation due to its high mortality rates in immunocompromised hosts.¹⁻⁴ Triazoles are the primary clinical choice for prophylaxis and treatment of these

pathologies.⁵ Currently, four triazole drugs are used: itraconazole (ITC), voriconazole (VRC), posaconazole (POS) and more recently isavuconazole (ISV). *A. fumigatus* strains resistant to all of them have been reported, and there are different cross-resistance patterns depending on the resistance mechanism involved. Nowadays, the treatment of *Aspergillus* infections is being compromised in some geographical areas as a consequence of the worldwide resistance spread.⁶ Classically, the development of azole resistance in *A. fumigatus* has

been attributed to two different routes: (i) a medical route, involving in vivo or in-host acquisition, that can happen after a prolonged period of azole therapy and (ii) an environmental route, regarding the acquisition of resistance in the agricultural setting due to the use of demethylation inhibitor fungicides (DMIs) for crop protection.⁷ In the agricultural setting, different DMIs are used to combat fungal plant pathogens; however, due to the similar chemical structure to clinical azoles used as therapy, cross-resistance between both types of azole drugs is the rule.^{8–10}

Azole drugs target the 14- α sterol demethylase (Cyp51), inhibiting the activity of an enzyme that plays a key role in the ergosterol biosynthesis pathway.¹¹ In *A. fumigatus*, this enzyme is encoded by two paralogous genes (*cyp51A* and *cyp51B*).¹² Despite *cyp51B*, nowadays most of the azole resistance mechanisms described have been associated with several point mutations in the *cyp51A* gene, tandem repeat (TR) insertions in the promoter of *cyp51A* or a combination of both point mutations and TRs.^{6,7} The different Cyp51A modifications are responsible for different azole susceptibility profiles. In the case of G54 mutations, elevated minimum inhibitory concentrations (MICs) to ITC, POS and unaffected MICs to VRC are the rule.^{13–15} Point mutations at M220 show a susceptibility pattern of resistance to ITC and reduced susceptibility to VRC and POS.¹⁶ Strains harbouring the point mutation G448S show resistance to VRC and reduced susceptibility to ITC and POS.¹⁷ However, those *A. fumigatus* strains with TR insertions in the promoter of *cyp51A* with a combination of different point mutations in the coding sequence (TR₃₄/L98H, TR₃₄/L98H/S297T/F495I, TR₄₆/Y121F/T289A and TR₅₃) commonly share a resistance pattern to all clinical azole drugs.^{18–22} However, different DMI susceptibility profiles have been found in the different *A. fumigatus* population groups based on their azole resistance mechanism and a previous whole genome sequencing (WGS) analysis, which suggests that the different resistance mechanisms have different origins and are specifically associated with the local use of a particular DMI.²³ MICs profiles to both classes of DMIs, imidazoles and triazoles, are generally high, excluding strains harbouring G54 mutations, but the pattern of cross-resistance depend on the different Cyp51A modifications. Strains harbouring G448S mutations are specifically resistant to triazoles DMIs and strains with TR₄₆/Y121F/T289A and TR₃₄/L98H/S297T/F495I showed high MICs to imidazoles.²³

There are two reference methods for antifungal susceptibility testing (EUCAST and CLSI),^{24,25} but they are only available in specialised centres. More than a decade ago, a method consisting of 4-well azole agar plates containing ITC, VRC, POS, and a growth control was designed as a screening test to detect *A. fumigatus* azole-resistant strains.²⁶ Since then, it has been adopted for clinical and environmental testing studies to evaluate azole resistance in *A. fumigatus*.^{27–29} Even the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) has recently published recommendations for the screening procedure.³⁰ However, since the method was developed using concentrations of drugs according to the breakpoints in use at that moment, a number of major errors have occurred with voriconazole and posaconazole.^{31,32} These errors are probably due to the concentration of the drug in the agar plate are

higher than the revised EUCAST voriconazole and posaconazole breakpoints (1 mg/L and 0.25 mg/L, respectively).³³

In this study, we designed an expanded agar-based screening method including the previous three clinical azole drugs, with lower concentrations for voriconazole and posaconazole to adapt to the updated EUCAST breakpoints against *A. fumigatus*.³³ In addition, we have included four DMIs used in crop protection (prochloraz (PCZ), imazalil (IMZ), metconazole (MET) and epoxiconazole (EPZ)) to determine the *A. fumigatus* azole resistance profile and to presumptively identify the responsible azole resistance mechanism. We validated the proposed method using a collection of well-characterised *A. fumigatus* isolates with known azole resistance mechanisms.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | *Aspergillus fumigatus* strain collection

A total of 104 unrelated *A. fumigatus* strains with environmental and clinical origin were used in this study. All isolates were identified to the species level by PCR amplification and sequencing of ITS and β -tubulin genes.³⁴ Fifty isolates had a susceptible azole phenotype and a wild-type (WT) Cyp51A sequence. The other 54 isolates harboured known azole resistance mechanisms consisting of Cyp51A mutations G54 (11 isolates), M220 (6 isolates), G448S (7 isolates), TR₃₄/L98H (22 isolates), TR₅₃ (2 isolates), TR₃₄/L98H/S297T/F495I (2 isolates) and TR₄₆/Y121F/T289A (4 isolates).

2.2 | Characterisation of azole resistance molecular mechanisms in *A. fumigatus* strains

Mechanisms of azole resistance were characterised by sequencing the main *A. fumigatus* azole target, the *cyp51A* gene. Conidia from each strain were cultured in 3 ml of GYEP liquid medium (0.3% yeast extract, 1% peptone; Difco, Soria Melguizo, Madrid, Spain) with 2% glucose (Sigma-Aldrich Quimica) and grown overnight at 37°C, after which mycelium mats were harvested and DNA was extracted.³⁵ The full *cyp51A* sequence, including its promoter, was amplified and sequenced for every isolate using the PCR conditions described before.²⁰ DNA sequences were compared against the *cyp51A* sequence of *A. fumigatus* reference strain CBS 144.89 (NCBI accession number AFUB_063960). Several representative strains for each known azole resistance mechanism were included in this work. The geographical origin and genotype of all the strains are displayed in Table S1.

2.3 | Microdilution antifungal susceptibility testing

2.3.1 | Clinical azoles

The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using a broth micro-dilution method following EUCAST

reference method 9.3.2.²⁴ The clinical azoles used were ITC (Janssen Pharmaceutica), VRC (Pfizer SA) and POS (Merck Sharp & Dohme Corp.). The final concentrations tested ranged from 0.015 to 8 mg/L. *A. flavus* ATCC 204304 and *A. fumigatus* ATCC 204305 were used as quality control strains. MICs were visually read after 24 and 48 h of incubation at 37°C in a humid atmosphere. Clinical breakpoints for interpreting microdilution antifungal susceptibility testing (AFST) results have been established by EUCAST for *A. fumigatus* to ITC, VRC and POS. These breakpoints were used for classifying each isolate as susceptible (S) or resistant (R) to each antifungal, in this case, ITC and VRC ($S \leq 1$, $R > 1$) or POS ($S \leq 0.125$, $R > 0.25$). These clinical breakpoints were updated in February 2020 after the introduction of the concept of area of technical uncertainty (ATU). This new classification was designed as a warning to those problematic MICs overlapping the susceptible and resistant category. The uncertainty of this category gives an instruction to categorise and report the susceptibility based on the MICs to the other azoles tested.³³ [<https://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>].

2.3.2 | Agricultural azoles (DMIs)

Antifungal DMIs used were two imidazole drugs, prochloraz (PCZ) and imazalil (IMZ), and two triazole compounds, metconazole (MET) and epoxiconazole (EPZ), all purchased at Sigma-Aldrich. All antifungal drugs were dissolved in DMSO and autosterilised for 30 min at room temperature, as stated in the EUCAST guidelines (<https://eucast.org/>). The final concentrations tested ranged from 0.06 to 32 mg/L. Clinical breakpoints for interpreting AFST results have not been established for these drugs, so isolates were considered susceptible or resistant based on the MICs shown by the group of *A. fumigatus* azole-susceptible strains.

2.4 | Agar-based screening plates

Four-well plates (Nunc™ Non-Treated Multidishes, Thermo Scientific) were prepared containing 1 mL of RPMI 1640%–2% glucose agar. One set of plates (Figure 1A) was supplemented with clinical antifungals—4 mg/L ITC, 1 mg/L VRC, 0.25 mg/L POS and no azole drug as a growth control. The other set of plates (Figure 1B) was supplemented with DMI antifungals—16 mg/L IMZ, 16 mg/L PCZ, 1 mg/L MET and 32 mg/L EPZ. The azole concentrations in the plates for VRC (1 mg/L) and POS (0.25 mg/L) have been reduced one dilution from what was previously recommended VRC (2 mg/L) and POS (0.5 mg/L).³⁰ This modification was done based on the new concept of ATU (Area of Technical Uncertainty) to ensure that strains growing at concentrations compatible with this new concept were not missed.³³ Detailed media and antifungal drug preparation are described in Appendix A.

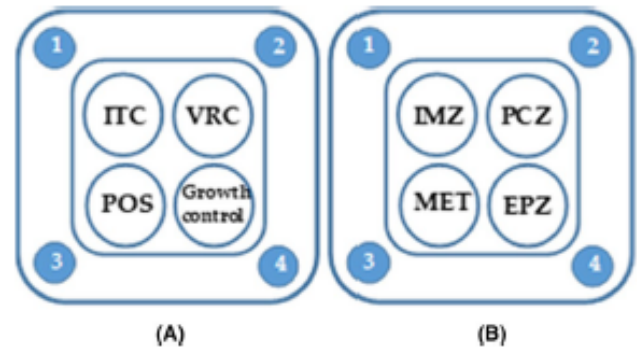


FIGURE 1 Four-well plates containing RPMI-agar media and (A) clinical antifungals: itraconazole (ITC, well 1), voriconazole (VRC, well 2), posaconazole (POS, well 3) and a drug-free control growth well (well 4), and (B) DMI antifungals: imazalil (IMZ, well 1), prochloraz (PCZ, well 2), metconazole (MET, well 3) and epoxiconazole (EPZ, well 4)

2.5 | Inoculation of screening plates

The *A. fumigatus* strains were subcultured on potato dextrose agar (PDA) plates (Oxoid, Madrid, Spain) and incubated at 37°C until the colonies were visibly sporulated (24–48 h). Screening plates were inoculated using a swab soaked in H₂O supplemented with Tween at 0.1% by rubbing colonies from PDA plates and streaking the swab over the four wells. Plates were incubated at 37°C for 48 h and visually read using the growth control well as a positive control. The strains were considered resistant to every specific antifungal if the growth observed in the drug-containing wells was similar to that of the growth control.

2.6 | Ethics

No ethics approval was required.

3 | RESULTS

3.1 | Antifungal susceptibility testing: clinical azoles

Attending to the EUCAST methodology, *A. fumigatus* strains showed a broad range of MIC values to the clinical azoles tested (Table 1). All *cyp51A*-WT strains were susceptible to the clinical azoles tested. Among the azole-resistant strains with point mutations, those *A. fumigatus* isolates harbouring the G54 mutation were resistant to ITC and POS but susceptible to VRC; azole-resistant isolates with M220 were resistant to ITC, showing variable MICs to VRC and POS, and strains harbouring G448S mutations were resistant to VRC, with variable MICs to ITC and POS. Strains with TR insertions in the *cyp51A* promoter showed multiresistance to all clinical azoles tested, as expected.

TABLE 1 Minimal inhibitory concentration ranges of *Aspergillus fumigatus* isolates to clinical antifungal drugs and to demethylation inhibitor drugs (DMIs). *A. fumigatus* isolates are grouped based on their azole susceptibility profile and their Cyp51A azole resistance mechanisms

Azole Susceptibility/Cyp51A modifications (#)	MICs ranges to clinical antifungals (mg/L)			MICs to DMIs antifungals (mg/L)			
	ITC	VRC	POS	Imidazole		Triazole	
				IMZ	PCZ	MET	EPZ
Azole-Susceptible							
WT (50)	0.25-0.5	0.125-0.5	0.06-0.125	0.125-0.5	0.125-0.5	0.125-0.5	2-4
Azole-Resistant: Point mutations							
G54 (11)	>8	0.25-0.5	1->8	0.06-0.125	0.125-0.25	0.06-0.125	0.5-2
M220 (6)	>8	0.25-1	0.25-2	0.25-2	0.25-1	0.25-1	4-16
G448S (7)	1-2	>8	0.25-1	0.5-2	1-2	1-32	8-32
Azole-Resistant: TR integrations							
TR ₂₄ /L98H (22)	>8	4-8	0.5-1	1-8	2-8	1-2	>32
TR ₂₄ /L98H/S297T/F495I (2)	>8	4-8	0.5-1	8	>32	4-16	>32
TR ₄₉ /Y121F/T289A (4)	2-4	4->8	0.5	32->32	16->32	8-16	>32
TR ₂₅ (2)	>8	2-4	0.5-1	2-8	2-8	2	>32

Note: #Number of isolates.

Abbreviations: AZL, azole; EPZ, epoxiconazole; IMZ, Imazalil; ITC, Itraconazole; MET, metconazole; MIC, minimal inhibitory concentration; PCZ, prochloraz; POS, posaconazole; TR, Tandem Repeat; VRC: Voriconazole.

TABLE 2 Screening plates results of *Aspergillus fumigatus* isolates to clinical azole drugs and imidazole and triazole demethylation inhibitor antifungals

Azole Susceptibility/Cyp51A modifications (#)	Screening results ^a						
	Clinical azole drugs			DMI antifungals			
	ITC	VRC	POS	Imidazoles		Triazoles	
	ITC	VRC	POS	IMZ	PCZ	MET	EPZ
AZL-Susceptible							
WT (50)	-	-	-	-	-	-	-
AZL-R: Point mutations							
G54 (11)	+	-	+	-	-	-	-
M220 (6)	+	v	v	-	-	-	-
G448S (7)	v	+	v	-	-	+	-
AZL-R: TR integrations							
TR ₂₄ /L98H (22)	+	+	+	-	-	+	+
TR ₂₄ /L98H/S297T/F495I (2)	+	+	+	-	+	+	+
TR ₄₉ /Y121F/T289A (4)	v	+	+	+	+	+	+
TR ₂₅ (2)	+	+	+	-	-	+	+

Note: #Number of isolates. ^a -, no growth; + growth; v, variable growth depending on amino acid substitutions or background strains.

Abbreviations: AZL, azole; DMI, demethylation inhibitor fungicides; EPZ, epoxiconazole; IMZ, Imazalil; ITC, Itraconazole; MET, metconazole; PCZ, prochloraz; POS, posaconazole; TR, Tandem Repeat; VRC, Voriconazole.

3.2 | Antifungal susceptibility testing: DMIs

The susceptibility of *A. fumigatus* strains to each DMI antifungal drug is shown in Table 1. The majority of resistant strains with Cyp51A TRs integrations showed higher MICs to all DMIs tested compared to the WT isolates. Although this was a general phenotype among these isolates, some differences were associated

with individual azole resistance mechanisms. Strains harbouring G54 mutations showed hyper-susceptibility to all the DMI antifungals tested, both imidazoles and triazoles. Strains with G448S mutation displayed higher susceptibility to imidazoles than to triazoles. Within the TR group, the specific susceptibility phenotype observed led to a particular resistance mechanism: strains that harboured TR₂₄/L98H/S297T/F495I showed high resistance to

triazoles and to imidazole PCZ; strains with TR₄₆/Y121F/T289A were highly resistant to all imidazole and triazole drugs tested; whereas strains with TR₃₄/L98H or TR₅₃ were highly resistant only to EPZ.

3.3 | Pattern of growth for 4-well screening plate visualisation

All *A. fumigatus* strains tested grew in the control well. Azole susceptible isolates only grew in the no-drug control well while the *A. fumigatus* azole-resistant strains—based on the phenotype of azole resistance—showed different growth patterns in the different wells with azole drugs. This could be associated with their specific azole resistance mechanism. Growth in the 4-well screening plates matched the microdilution antifungal susceptibility testing (Table 2). Only two azole-resistant groups presented some peculiarities due to their susceptibility profile to clinical azoles. Strains with M220 substitutions showed variable growth on VRC and POS supplemented wells whereas those with G4485 mutation showed variable growth on ITC and POS supplemented wells, which is in agreement with the variable MICs obtained in the susceptibility testing. The growth pattern obtained for each *A. fumigatus* Cyp51A resistance mechanism to clinical azoles and DMIs is shown in Figure 2. One of the limitations of this study is that isolates with resistance mechanisms TR₃₄/L98H and TR₅₃ showed similar MIC profiles to the DMIs evaluated so that the final confirmation would always be by molecular methods, sequencing the *cyp51A* gene.

4 | DISCUSSION

Azole resistance in *A. fumigatus* is a worldwide emerging problem that is compromising IA clinical treatment.^{1,6,36} The outcome of IA depends on the early initiation of an effective therapy, which relies on a rapid detection of antifungal resistance. Several factors are involved in treatment failure, but knowledge of azole resistance and the associated resistance mechanism is vital for the therapeutic response and patient survival.^{36,37} Identification of azole-resistant *A. fumigatus* strains by broth microdilution reference procedures can represent a major problem for most routine laboratories as well-trained personnel is required. Furthermore, standardised in vitro susceptibility testing takes at least 5–7 days to be fully completed so it is a time-consuming procedure. The 4-well screening method assessed in this study is an easier and faster way to detect azole-resistant *A. fumigatus* strains in the clinical setting. Also, and due to its simplicity, it can be implemented in any mycology laboratory.

This expanded method includes a modification on the VRC and POS concentrations in the screening plates, which is an improvement in the detection of azole resistance since these new plates were modified according to the introduction of the concept of ATU.³³ Thus, incorporating this new category, and the implication of those *A. fumigatus* isolates that grow at bordering MICs, it is possible to detect those isolates that show a susceptibility profile that matches the new clinical breakpoints and the recently incorporated ATU concept. This can avoid false susceptibility errors that could have happened in the past due to the higher clinical breakpoints established, and the wrong classification of isolates as susceptible. As this methodology has been modified to be updated

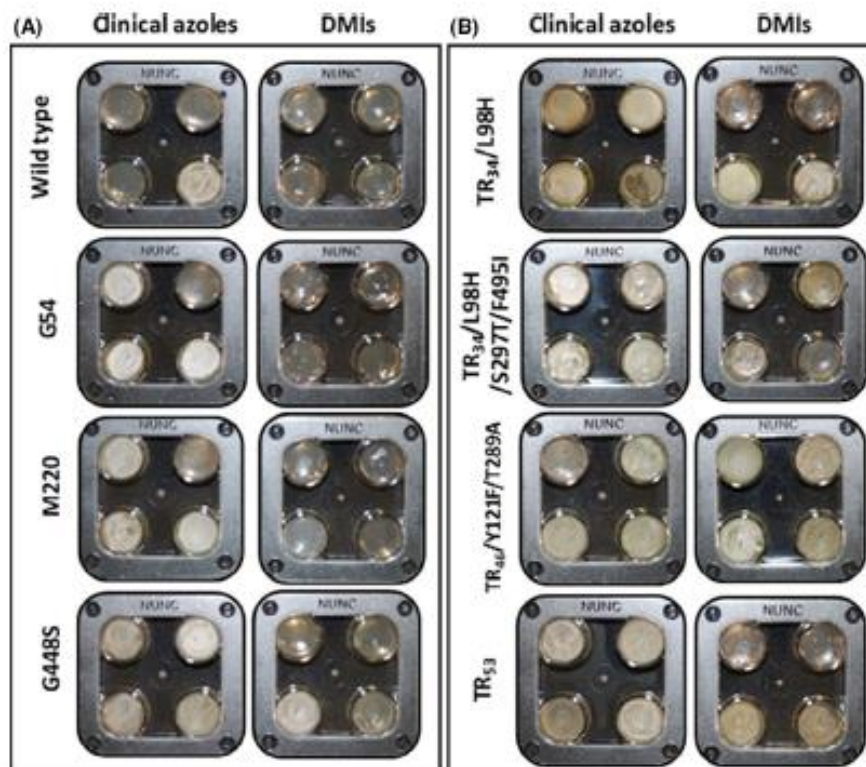


FIGURE 2 Screening plates (clinical azoles and DMIs) inoculated with strains carrying the different Cyp51A azole resistance mechanisms. Growth pattern for *Aspergillus fumigatus* strains with Cyp51A point mutations (A) or TR-based mutations in Cyp51A (B)

to the new EUCAST clinical breakpoints, our susceptibility growth pattern obtained for each *A. fumigatus* Cyp51A azole resistance mechanism could be very useful as an easier and quicker initial susceptibility test for mycology laboratories, and in surveillance studies to catch isolates growing in this ATU concept that should be selected to send to reference laboratory for CYP51A sequencing and confirmation of MICs.

Aspergillus fumigatus azole resistance is commonly found as a cross-resistant phenotype. In a previous work, we analysed *A. fumigatus* cross-resistance between clinical azoles and nine DMI drugs used for crop protection.²³ We were able to confirm different patterns of cross-resistance based on the azole resistance mechanism of each strain.²³ Specific differences detected in DMI susceptibility profiles were used to design and validate the proposed screening method. This work describes an improved screening method using four DMIs used for crop protection in addition to three clinical azoles. Identification of the specific mechanism of resistance is possible based on the particular growth pattern detected. Our results showed a strong correlation between the susceptibility profiles observed in our agar-based screening method and the expected AFST (EUCAST) of each strain based on their Cyp51A alteration.¹⁴⁻²³

Azole susceptibility of an isolate is assumed when there is growth only in the no-drug control well, which is ideal for surveillance studies. The necessity of epidemiological surveillance studies was started in 2013 by the European Center for Disease Prevention and Control (ECDC)³⁸ as updated information of azole susceptibility status of *A. fumigatus* is needed at a local level.^{8,39-41} The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) recommended that antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* isolates causing invasive aspergillosis disease should be performed in patients from regions with high percentages of resistance.⁴² Surveillance studies could benefit from this easy, low-cost and sensitive screening method to detect azole-resistant strains among the local *A. fumigatus* epidemiology.

One limitation of this study is that is not possible to establish a DMIs pattern for azole-resistant *A. fumigatus* strains with non-cyp51A mutations, as they usually present a wide MIC range to azoles. However, any azole-resistant strain will be studied by sequencing of cyp51A and in case that the strains are wild type for cyp51A they will be included in a different study, but they will be registered as azole resistant and this information would be helpful to the clinical case. Even if results need to be confirmed through microdilution susceptibility testing and cyp51A sequencing, this method could be very useful to reduce the response time for clinical diagnosis of azole resistance in patients colonised/infected with *A. fumigatus* azole-resistant strains, as resistance is quickly detected, facilitating an appropriate antifungal therapy, and therefore improving the clinical outcome of the patient. This methodology used could also contribute to isolate unidentified cyp51A mutations conferring unknown/new profiles of azole cross-resistance in *A. fumigatus*.

5 | CONCLUSIONS

Due to the selective pressure of azole drugs used in medicine and in the environment, an increased isolation of azole-resistant *A. fumigatus* strains has been encountered. In this scenario, the active surveillance of *A. fumigatus*, both in clinical and environmental setting, is essential for the control of azole resistance. The screening method described and validated in this study provides an easy way to detect azole-resistant *A. fumigatus* strains. The proposed method could be used in any mycology laboratory and have a dual use in hospital laboratories as a prompt indicative of the *A. fumigatus* azole susceptibility, as well as in surveillance studies to increase the knowledge of the local epidemiology of *A. fumigatus* azole resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI18CIII/00045) and also by Plan Nacional de I + D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/CIII/0004/0003), co-financed by European Development Regional Fund ERDF 'A way to achieve Europe', Operative program Intelligent Growth 2014-2020. Jose Lucio holds a predoctoral fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria (F17CIII/00037).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Jose Lucio: Data curation (equal); Investigation (lead); Methodology (lead); Validation (equal); Writing - original draft (lead); Writing - review & editing (equal). **Irene Gonzalez-Jimenez:** Investigation (supporting); Writing - original draft (supporting); Writing - review & editing (supporting). **Rocio Garcia-Rubio:** Validation (supporting); Writing - review & editing (supporting). **Maria Soledad Cuetara:** Validation (supporting); Writing - review & editing (supporting). **Emilia Mellado:** Conceptualization (lead); Data curation (equal); Formal analysis (lead); Funding acquisition (lead); Project administration (lead); Resources (lead); Supervision (lead); Visualization (lead); Writing - review & editing (equal).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Emilia Mellado  <https://orcid.org/0000-0002-9801-0260>

REFERENCES

1. Latgé J-P, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev*. 2019;2019:33. 10.1128/CMR.00140-18

2. Low CY, Rotstein C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med Rep*. 2011;3:1-8. 10.3410/M3-14
3. Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V, et al. Factors associated with overall and attributable mortality in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2008;47:1176-1184. 10.1086/592255
4. Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care*. 2015;19:1-15. 10.1186/s13054-014-0722-7
5. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;63:e1-e60. 10.1093/cid/ciw326
6. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis*. 2017;216:S436-S444. 10.1093/infdis/jix210
7. Garcia-Rubio R, Cuenca-Estrella M, Mellado E. Triazole resistance in *Aspergillus* species: an emerging problem. *Drugs*. 2017;77:599-613. 10.1007/s40265-017-0714-4
8. Escribano P, Rodríguez-Sánchez B, Díaz-García J, et al. Azole resistance survey on clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2020;27(8):1170.e1-1170.e7. 10.1016/j.cmi.2020.09.042
9. Snelders E, Huis In 't Veld RAG, Rijs AJMM, Kema GHJ, Melchers WJG, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:4053-4057. 10.1128/AEM.00231-09
10. Zhang J, van den Heuvel J, Debets AJM, et al. Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2017;284:20170635. 10.1098/rspb.2017.0635
11. Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770:467-477. 10.1016/j.bbagen.2006.07.018
12. Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Identification of two different 14- α sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2431-2438. 10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001
13. Camps SMT, Van Der Linden JWM, Li Y, et al. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: A case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:10-16. 10.1128/AAC.05088-11
14. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:1120-1124. 10.1128/aac.47.3.1120-1124.2003
15. Mann PA, Parmegiani RM, Wei S-Q, et al. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14 α -demethylase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:577-581. 10.1128/aac.47.2.577-581.2003
16. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14 α -sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2747-2750. 10.1128/AAC.48.7.2747-2750.2004
17. Pelaez T, Gijón P, Bunsow E, et al. Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2531-2534. 10.1128/jcm.00329-12
18. Hodiament CJ, Dolman KM, Ten Berge IJM, Melchers WJG, Verweij PE, Pajkrt D. Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Med Mycol*. 2009;47:217-220. 10.1080/13693780802545600
19. Lescar J, Meyer I, Akshita K, et al. *Aspergillus fumigatus* harbouring the sole Y121F mutation shows decreased susceptibility to voriconazole but maintained susceptibility to itraconazole and posaconazole. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:3244-3247. 10.1093/jac/dku316
20. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1897-1904. 10.1128/aac.01092-06
21. Pontes L, Beraquet CAG, Arai T, et al. *Aspergillus fumigatus* clinical isolates carrying CYP51A with TR34/L98H/S297T/F495I substitutions detected after four-year retrospective azole resistance screening in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64:e02059-19. 10.1128/AAC.02059-19
22. van der Linden JWM, Arendrup MC, Warris A, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:1041-1044. 10.3201/eid2106.140717
23. Garcia-Rubio R, Gonzalez-Jimenez I, Lucio J, Mellado E. *Aspergillus fumigatus* cross-resistance between clinical and demethylase inhibitor azole drugs. *Appl Environ Microbiol*. 2021;87(5):e02539-20. 10.1128/AEM.02539-20
24. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, et al. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST technical note on isavuconazole breakpoints for *Aspergillus*, itraconazole breakpoints for *Candida* and updates for the antifungal susceptibility testing method documents. *Clin Microbiol Infect*. 2016;57:1-e1-4. 10.1016/j.cmi.2016.01.017
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Reference method for broth dilution. Ref. method broth dilution Antifung. susceptibility Test. yeasts. *Approv. Stand.* 3th ed. 2008, 28, 0-13.
26. Linden J, Arendrup MC, Lee H, Melchers W, Verweij P. Azole containing agar plates as a screening tool for azole resistance of *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*. 2009;52:19.
27. Arendrup MC, Verweij PE, Mouton JW, Lagrou K, Meletiadis J. Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72:3325-3333. 10.1093/jac/dkx319
28. Buil JB, van der Lee HAL, Rijs AJMM, et al. Single-center evaluation of an agar-based screening for azole resistance in *Aspergillus fumigatus* by using VIPcheck. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:e01250-17. 10.1128/AAC.01250-17
29. Van Der Linden JWM, Camps SMT, Kampinga GA, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis*. 2013;57:513-520. 10.1093/cid/cit320
30. Guinea J, Verweij PE, Meletiadis J, et al. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25:681-687. 10.1016/j.cmi.2018.09.008
31. Serrano-Lobo J, Gómez A, Rodríguez-Sánchez B, Muñoz P, Escribano P, Guinea J. ASPEIN Study Group. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolate Screening in Azole-Containing Agar Plates (EUCAST E.Def 10.1): low impact of plastic trays used and poor performance in cryptic species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(8):e0048221. 10.1128/AAC.00482-21
32. Espinel-Ingroff A, Turnidge J, Alastruey-Izquierdo A, et al. Posaconazole MIC Distributions for *Aspergillus fumigatus* Species Complex by four methods: impact of *cyp51A* mutations on estimation of epidemiological cutoff values. *Antimicrob Agents Chemother*.

- 2018;62(4):e01916-e1917. 10.1128/AAC.01916-17. PMID: 29437624; PMCID: PMC5913929
33. Guinea J. Updated eucast clinical breakpoints against *Aspergillus*, implications for the clinical microbiology laboratory. *J. Fungi*. 2020;6:1-11. 10.3390/jof6040343
34. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1244-1251. 10.1128/AAC.00942-07
35. Tang CM, Cohen J, Holden DW. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol Microbiol*. 1992;6:1663-1671. 10.1111/j.1365-2958.1992.tb00891.x
36. van der Linden JWM, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:1846-1854. 10.3201/eid1710.110226
37. Meis JF, Chowdhary A, Rhodes JL, Fisher MC, Verweij PE. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016;371:20150460. 10.1098/rstb.2015.0460
38. Kleinkauf N, Verweij P, Arendrup MC, et al. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. ECDC, Stockholm, Sweden (2013). *Eur Cent Dis Control Tech Rep*. 2013. 10.2900/76274
39. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Rivero-Menéndez O, et al. Molecular identification and susceptibility testing of molds isolated in a prospective surveillance of triazole resistance in Spain (FILPOP2 Study). *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:1-11. 10.1128/AAC.00358-18
40. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:3380-3387. 10.1128/AAC.00383-13
41. Lestrade PP, van der Velden WJFM, Bouwman F, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis and triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in patients with haematological malignancies: a single-centre retrospective cohort study. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73:1389-1394. 10.1093/jac/dkx527
42. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:e1-e38. 10.1016/j.cmi.2018.01.002

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Lucio J, Gonzalez-Jimenez I, Garcia-Rubio R, Cuetara MS, Mellado E. An expanded agar-based screening method for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*. 2022;65:178-185. doi:[10.1111/myc.13400](https://doi.org/10.1111/myc.13400)

ANEXO V: Genotipos de las cepas de *A. fumigatus* aisladas en el estudio prospectivo de 3 años

Número de cepario	Fecha de aislamiento†	Tipo de muestra	Genotipado TRESPERG			
			CSP	MP2	CFEM	ERG
14	16/01/2019	Ambiental	t01	m1.1	c05A	e02
318	25/10/2021	Clínica	t01	m1.1	c05A	e07
235	15/04/2021	Clínica	t01	m1.1	c05A	e07
205	16/02/2021	Ambiental	t01	m1.1	c07	e07
101	16/01/2020	Clínica	t01	m1.1	c08A	e07
248	11/05/2021	Clínica	t01	m1.1	c08A	e07
247	14/05/2021	Clínica	t01	m1.1	c08B	e07
131	23/04/2020	Clínica	t01	m1.1	c20	e07
128	15/04/2020	Clínica	t01	m3.3	c20	e07
185	15/12/2020	Ambiental	t01	m3.4	c05A	e15
335	26/11/2021	Clínica	t01	m3.4	c20	e11
194	27/01/2021	Clínica	t01	m3.4	c20	e15
199	27/01/2021	Clínica	t01	m3.4	c20	e15
195	24/01/2021	Clínica	t01	m3.4	c20	e15
23	15/03/2019	Clínica	t01	m5.1	c09	e07
301	31/08/2021	Clínica	t01	m5.1	c09	e07
309	20/09/2021	Clínica	t01	m5.1	c09	e07
36	29/05/2019	Clínica	t01	m5.3	c08A	e07
183	11/11/2020	Clínica	t01	m5.3	c08A	e07
122	06/03/2020	Clínica	t01	m5.3	c08B	e07
287	21/07/2021	Ambiental	t01	m5.3	c08B	e07
254	17/05/2021	Clínica	t01	m5.4	c05A	e19
292	04/08/2021	Clínica	t01	m5.4	c06	e11
261	14/06/2021	Clínica	t01	m5.4	c06	e15
294	02/08/2021	Clínica	t01	m5.4	c06	e15
42	24/06/2019	Clínica	t01	m5.5	c08A	e07
3	10/01/2019	Ambiental	t01	m5.5	c20	e15
18	16/01/2019	Ambiental	t01	m5.10	c08A	e07
331	01/12/2021	Ambiental	t02	m1.1	c08A	e05
144		Clínica	t02	m1.1	c08A	e09
56	19/09/2019	Clínica	t02	m1.1	c08A	e13
317	22/10/2021	Ambiental	t02	m1.1	c08B	e05
322	03/11/2021	Ambiental	t02	m1.1	c08B	e05
67	05/10/2019	Clínica	t02	m1.1	c09	e05
69	04/10/2019	Clínica	t02	m1.1	c09	e05
208	19/02/2021	Ambiental	t02	m1.1	c09	e11
130	23/04/2020	Clínica	t02	m1.2	c08B	e06
277	13/07/2021	Ambiental	t02	m1.5	c08A	e16
107	06/02/2020	Clínica	t02	m1.8	c17	e05
102	17/01/2020	Clínica	t02	m1.12	c09	e05
26	29/03/2019	Clínica	t02	m6.3	c08A	e09
153	07/09/2020	Clínica	t02	m6.3	c08A	e09
158	11/11/2020	Clínica	t02	m6.3	c08A	e09

165	14/09/2020	Clínica	t02	m6.3	c08A	e09
175	21/10/2020	Clínica	t02	m6.8	c08A	e09
304	09/09/2021	Clínica	t02	m6.9	c08B	e06
156	09/09/2020	Clínica	t02	m6.9	c08B	e11
95	12/12/2019	Clínica	t02	m6.11	c08A	e13
193	23/01/2021	Clínica	t02	m6.11	c08A	e17
179	09/11/2020	Ambiental	t02B	m12.1	c32	e23
21	04/03/2019	Clínica	t02B	m8.1	c14	e10
25	27/03/2019	Clínica	t02B	m8.1	c14	e10
285	19/07/2021	Ambiental	t03	m1.1	c05A	e07
293	02/08/2021	Clínica	t03	m1.1	c05A	e07
296	11/08/2021	Clínica	t03	m1.1	c05A	e07
164	17/09/2020	Clínica	t03	m1.1	c05A	e09
300	30/08/2021	Clínica	t03	m1.1	c05A	e09
242	03/05/2021	Clínica	t03	m1.1	c05A	e13
263	15/06/2021	Clínica	t03	m1.1	c05A	e13
269		Clínica	t03	m1.1	c05A	e13
5	04/01/2019	Clínica	t03	m1.1	c07	e06
2	10/01/2019	Ambiental	t03	m1.1	c07	e07
33	15/05/2019	Clínica	t03	m1.1	c08A	e07
76	28/10/2019	Clínica	t03	m1.1	c08A	e07
203	16/02/2021	Ambiental	t03	m1.1	c08A	e07
333	13/12/2021	Ambiental	t03	m1.1	c08A	e07
334	13/12/2021	Ambiental	t03	m1.1	c08A	e07
58	23/09/2019	Clínica	t03	m1.1	c08A	e09
271	03/07/2021	Clínica	t03	m1.1	c08A	e09
6	04/01/2019	Clínica	t03	m1.1	c08A	e13
321	02/11/2021	Clínica	t03	m1.1	c08A	e16
236	13/04/2021	Ambiental	t03	m1.1	c08B	e07
223	30/03/2021	Ambiental	t03	m1.1	c08B	e09
233	13/04/2021	Ambiental	t03	m1.1	c08B	e09
319	24/10/2021	Clínica	t03	m1.1	c09	e09
167	26/09/2020	Clínica	t03	m1.1	c10	e06
222	21/03/2021	Clínica	t03	m1.1	c10	e06
229	06/04/2021	Clínica	t03	m1.1	c10	e06
337	02/12/2021	Clínica	t03	m1.1	c10	e06
339	28/05/2021	Clínica	t03	m1.1	c10	e06
133	18/06/2020	Clínica	t03	m1.1	c10	e07
71	21/10/2019	Clínica	t03	m1.3	c05A	e07
73	28/10/2019	Clínica	t03	m1.3	c05A	e07
77	28/10/2019	Clínica	t03	m1.3	c05A	e07
79	28/10/2019	Clínica	t03	m1.3	c05A	e07
225	01/04/2021	Ambiental	t03	m1.3	c08A	e09
232	13/04/2021	Clínica	t03	m1.3	c08A	e09
243	07/05/2021	Clínica	t03	m1.3	c08B	e09

258	31/05/2021	Clínica	t03	m1.3	c08B	e09
299	24/08/2021	Ambiental	t03	m1.3	c09	e02
298	20/08/2021	Clínica	t03	m1.3	c19	e02
34	20/05/2019	Clínica	t03	m1.5	c10	e06
213	02/03/2021	Clínica	t03	m2.3	c07	e06
283	19/07/2021	Ambiental	t03	m2.3	c07	e06
221	26/03/2021	Clínica	t03	m3.3	c05A	e07
31	01/04/2019	Clínica	t03	m3.3	c05A	e09
252	17/05/2021	Clínica	t03	m3.3	c05A	e09
13	16/01/2019	Ambiental	t03	m3.3	c05A	e13
126	20/03/2020	Clínica	t03	m3.3	c08A	e07
81	31/10/2019	Clínica	t03	m3.4	c08A	e19
62	02/10/2019	Clínica	t03	m3.8	c04	e07
85	05/12/2019	Clínica	t04A	m1.1	c03	e07
43	23/07/2019	Clínica	t04A	m1.1	c04	e07
154	04/09/2020	Clínica	t04A	m1.1	c04	e07
155	04/09/2020	Clínica	t04A	m1.1	c04	e07
215	06/03/2021	Clínica	t04A	m1.1	c05A	e09
256	31/05/2021	Clínica	t04A	m1.1	c05A	e09
48	07/08/2019	Clínica	t04A	m1.1	c05B	e07
109	12/02/2020	Clínica	t04A	m1.1	c07	e07
70	16/10/2019	Clínica	t04A	m1.1	c08A	e13
180	09/11/2020	Ambiental	t04A	m1.1	c08B	e06
238	21/04/2021	Clínica	t04A	m1.1	c08B	e07
28	11/04/2019	Clínica	t04A	m1.1	c09	e07
29	15/04/2019	Clínica	t04A	m1.1	c09	e07
134	18/06/2020	Clínica	t04A	m1.1	c09	e07
138	14/06/2020	Clínica	t04A	m1.1	c12	e09
137	23/06/2020	Ambiental	t04A	m1.1	c12	e15
140	06/07/2020	Clínica	t04A	m1.1	c12	e15
211	23/02/2021	Clínica	t04A	m1.3	c05A	e07
214	05/03/2021	Clínica	t04A	m1.3	c05A	e07
20	02/03/2019	Clínica	t04A	m1.3	c08A	e07
108	12/02/2020	Clínica	t04A	m1.3	c08A	e07
192	25/01/2021	Ambiental	t04A	m1.3	c08A	e07
141	15/07/2020	Clínica	t04A	m1.3	c08B	e07
217	19/03/2021	Clínica	t04A	m1.3	c08B	e07
219	26/03/2021	Clínica	t04A	m1.3	c08B	e07
220	26/03/2021	Clínica	t04A	m1.3	c08B	e07
224	31/03/2021	Clínica	t04A	m1.3	c08B	e07
230	08/04/2021	Clínica	t04A	m1.3	c08B	e07
274	09/07/2021	Ambiental	t04A	m1.3	c08B	e07
204	16/02/2021	Ambiental	t04A	m1.5	c07	e07
64	30/09/2019	Clínica	t04A	m3.4	c03	e07
86	02/12/2019	Clínica	t04A	m3.4	c03	e07

88	02/12/2019	Clínica	t04A	m3.4	c03	e07
96	07/01/2020	Ambiental	t04A	m3.4	c20	e11
97	03/01/2020	Clínica	t04A	m3.4	c20	e11
313	13/10/2021	Ambiental	t04A	m3.4	c20	e13
249	10/05/2021	Clínica	t04A	m5.5	c05A	e07
241	30/04/2021	Clínica	t04A	m5.9	c04	e15
257	23/05/2021	Clínica	t04A	m5.9	c04	e15
260	07/06/2021	Clínica	t04A	m5.9	c04	e15
272	30/06/2021	Clínica	t04A	m5.9	c04	e15
100	14/01/2020	Clínica	t04B	m1.2	c20	e07
234	15/04/2021	Clínica	t05	m1.1	c08A	e13
228	08/04/2021	Clínica	t05	m1.1	c09	e11
61	01/10/2019	Clínica	t05	m1.3	c03	e13
119	05/03/2020	Clínica	t05	m1.3	c03	e13
340	27/12/2021	Clínica	t06A	m2.1	c01	e08
341	29/12/2021	Clínica	t06A	m2.1	c01	e08
342	29/12/2021	Clínica	t06A	m2.1	c01	e08
121		Clínica	t06A	m6.2	c08A	e13
227	03/04/2021	Clínica	t06b	m1.1	c08A	e15
46	05/08/2019	Clínica	t08	m6.12	c31	e10
32	23/04/2019	Clínica	t09	m1.1	c03	e07
303	03/09/2021	Clínica	t09	m1.1	c03	e07
278	12/07/2021	Ambiental	t09	m5.3	c10	e07
279	24/06/2021	Clínica	t09	m5.3	c10	e07
282	19/07/2021	Ambiental	t09	m5.3	c10	e07
218	25/03/2021	Ambiental	t13	m3.4	c20	e11
202	15/02/2021	Ambiental	t18b	m6.9	c08B	e11
280	14/07/2021	Clínica	t18B	m6.10	c27	e13
289	27/07/2021	Clínica	t18B	m6.10	c27	e13
290	27/07/2021	Clínica	t18B	m6.10	c27	e13
291	03/08/2021	Clínica	t18B	m6.10	c27	e13
295	09/08/2021	Clínica	t18B	m6.10	c27	e13
139	24/06/2020	Clínica	t28	m6.11	c08A	e09
147		Clínica	t30	m5.7	c05A	e07

†: fecha de aislamiento (dd/mm/yyyy)

ANEXO VI: Artículo en revisión



Distribution of *Aspergillus* Species and Prevalence of Azole Resistance in clinical and environmental Samples from a Spanish Hospital during a three-year study period.

Journal:	<i>Mycoses</i>
Manuscript ID	MYC-OR-2023-335
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	24-Oct-2023
Complete List of Authors:	Emilia Mellado, Emilia; Instituto de Salud Carlos III Campus de Majadahonda; Centro de Investigacion Biomedica en Red Enfermedades Infecciosas Lucio, Jose; Instituto de Salud Carlos III Campus de Majadahonda Alcazar-Fuoli, Laura; Instituto de Salud Carlos III Campus de Majadahonda; Centro de Investigacion Biomedica en Red Enfermedades Infecciosas Gil, Horacio; Instituto de Salud Carlos III Campus de Majadahonda Cano-Pascual, Samuel; Instituto de Salud Carlos III Campus de Majadahonda Hernandez-Egido, Sara; Hospital Universitario Severo Ochoa Cuetara, Maria Soledad; Hospital Universitario Severo Ochoa
Subject Area:	Microbiology
Area of Expertise:	Antifungal Susceptibility, Molecular Mycology, Microbiologic Resistance
Keywords:	<i>Aspergillus fumigatus</i> , genotyping, antifungal target, antifungal activity

SCHOLARONE™
Manuscripts

Distribution of *Aspergillus* Species and Prevalence of Azole Resistance in clinical and environmental Samples from a Spanish Hospital during a three-year study period.

Jose Lucio¹, Laura Alcazar-Fuoli^{1,3}, Horacio Gil¹, Samuel Cano-Pascual¹, Sara Hernandez-Egido², Maria Soledad Cuertara² and Emilia Mellado^{1,3*}.

¹ Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain.

² Microbiology Department, University Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid, Spain.

³ Center for Biomedical Research in Network in Infectious Diseases (CIBERINFEC-CB21/13/00105), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

*Correspondence: Emilia Mellado, Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Center for Biomedical Research in Network in Infectious Diseases (CIBERINFEC-CB21/13/00105) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain.
Email: emellado@isciii.es

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ABSTRACT

BACKGROUND: Surveillance studies are crucial for updating trends in *Aspergillus* species and antifungal susceptibility information.

OBJECTIVES: Determine the *Aspergillus* species distribution and azole resistance prevalence during this 3-year prospective surveillance study in a Spanish Hospital.

MATERIALS & METHODS: 335 *Aspergillus* spp clinical and environmental isolates were collected during a 3-year study. All isolates were screened for azole resistance using an agar-based screening method and resistance was confirmed by EUCAST antifungal susceptibility testing. The azole resistance mechanism was confirmed by sequencing the *cyp51A* gene and its promoter. All *A. fumigatus* strains were genotyped using TRESPERG analysis.

RESULTS: *A. fumigatus* was the predominant species recovered with a total of 174 strains (51.94%). The rest of *Aspergillus* spp were less frequent: *A. niger* (14.93%), *A. terreus* (9.55%), *A. flavus* (8.36%), *A. nidulans* (5.37%) and *A. lentulus* (3.28%), among other *Aspergillus* species (6.57%). TRESPERG analysis showed 99 different genotypes, with 72.73% of the strains being represented as a single genotype. Some genotypes were common among clinical and environmental *A. fumigatus* azole-susceptible strains, even when isolated months apart. We describe the occurrence of two azole-resistant *A. fumigatus* strains, one clinical and another environmental, that were genotypically different and did not share genotypes with any of the azole-susceptible strains.

CONCLUSIONS: *A. fumigatus* strains showed a very diverse population although several genotypes were shared among clinical and environmental strains. The isolation of azole-resistant strains from both settings suggest that an efficient analysis of clinical and environmental sources must be done to detect azole resistance in *A. fumigatus*.

Keywords: *Aspergillus* spp, azole resistance, surveillance, TRESPERG genotyping, hospital environment

1. Introduction

Regarding opportunistic fungal pathogens, *Aspergillus* species stand out as major agents, causing a broad spectrum of clinical manifestation named aspergillosis¹. *Aspergillus fumigatus* is the most frequently isolated species from this genus and is the cause of, among other pathologies, invasive aspergillosis (IA), a critical clinical manifestation of aspergillosis associated with high mortality rates in immunocompromised hosts^{2,3}. Currently, triazole drugs are the antifungal of choice for prophylaxis and first-line treatment of *Aspergillus* infections^{4,5}. However, the therapeutical options against *A. fumigatus* infections are being reduced as the reports of azole-resistant *A. fumigatus* strains have increased globally during the last decades^{5,6}. The development of azole resistance in *A. fumigatus* is caused by selective pressure associated with the employment of azole drugs, and has been classically described by two different routes: a medical route that can occur inside the host, in patients that have been treated with long-term azole therapy; and another route related to the environment, where the acquisition of azole resistance happens in the agricultural scenario, due to the use of demethylation inhibitor fungicides (DMIs) to protect crops against fungal plant pathogens^{7,8}. Although there are many DMIs used, they share a similar chemical structure to clinical triazoles, thus generating cross-resistance between both antifungal classes^{9,10}. Regardless of the development route of azole resistance or the underlying azole mechanism, azole resistance is deeply associated with treatment failure^{5,11}.

The 14- α sterol demethylase (Cyp51) is the target of triazole drugs. The mode of action of these antifungals is based on the inhibition of the Cyp51 activity, an enzyme that plays a crucial role in the ergosterol biosynthesis pathway, encoded by the gene *cyp51A* and its homologue *cyp51B*¹². The majority of the azole resistance mechanisms described have been associated with different point mutations in the *cyp51A* gene, tandem repeat (TR) insertions in its promoter or the combination of both mechanisms^{7,13-15}.

Nowadays, two similar reference methods for antifungal susceptibility testing (AFST) are used globally, EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing, <https://www.eucast.org/>) and CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, <https://clsi.org/>). Although these methods are validated and standardized, they present some limitations, such as being available only in specialized centers and being slow methodologies, taking at least 5 to 7 days to be completed. A rapid detection of azole resistance is crucial for increasing the possibilities of therapeutical success and the recovery of the patients. New screening methods, such as 4-well azole agar plates, are very useful for detecting azole resistance in *A. fumigatus*¹⁶⁻¹⁸, being easier, simpler, and faster to perform, and they are not restricted to specialized centers, improving the chances of successful clinical outcomes. Although results require confirmation through microdilution susceptibility testing and *cyp51A* sequencing, this method has been recommended by the EUCAST for screening procedures¹⁹. An expanded version of this method was described and validated by our group²⁰, with two types of

4-well agar plates, one supplemented with clinical azoles with antifungal concentrations adapted to the last
EUCAST breakpoints against *A. fumigatus*²¹, and 4-well agar plates containing DMI antifungals. This method
could be easily applied to surveillance studies due to the advantages mentioned before.

Moreover, in the last decade, the ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) has recom-
mended epidemiological surveillance studies to update locally *A. fumigatus* azole susceptibility information²².
Several countries have started these surveillance studies, mainly from clinical samples²³⁻²⁸, but also, to a lesser
extent, including environmental samples²⁹⁻³¹.

In addition to azole resistance surveillance studies, *A. fumigatus* genotyping is a useful methodology to de-
termine the population structure of this species and to study the epidemiological association between envi-
ronmental and clinical strains. Several genotyping methods have been described but only two, STRAf and
TRESPERG, have been compared and show a good discriminatory power³²⁻³⁴. While STRAf assay had a
higher discriminatory power ($D = 0.9993$) compared to the TRESPERG typing method ($D = 0.9972$), the latter
can be readily integrated in any clinical microbiology laboratory since it does not demand specialized equip-
ment or trained staff. Both of them are used to determine and analyze genetic distances and have proven to
be powerful instruments for *A. fumigatus* molecular typing³⁴.

In this study, we aim to determine the distribution of *Aspergillus* species and prevalence of azole resistance
using a 3-year prospective collection of clinical and environmental strains from the Severo Ochoa Universi-
tary Hospital in Madrid. Also, we analyze the genetic relatedness of *A. fumigatus* strains isolated from clinical
samples and those that co-exist in the hospital environment.

2. Materials and Methods

2.1. *Aspergillus* spp strains

A total of 335 *Aspergillus* spp strains were analyzed: 283 clinical and 52 environmental isolates. All *Aspergillus*
isolates were cultured using standardized mycological procedures and identified at the section or species
level based on local routine procedures (ie phenotypic identification and/or sequencing). To extract *Aspergil-
lus* DNA, conidia from every strain were cultured in liquid glucose-yeast extract-peptone (GYEP) medium
(0.3% yeast extract, 1% peptone; Difco, Soria Melguizo, Madrid, Spain) containing 2% glucose (Sigma-Al-
drich Química, Madrid, Spain) at 37°C for 24 hours. After disrupting the mycelium mechanically through
vortex-mixing with glass beads, the genomic DNA of the isolates was extracted using the phenol-chloroform
method³⁵. All *Aspergillus* spp strains identified from the Severo Ochoa University Hospital were sent to the
National Centre for Microbiology to screen for azole resistance and to genotype *A. fumigatus* strains.

2.2. Environmental surveillance 105

Environmental air samples were obtained using an air sampler AESAP1075 (Sampl'air Lite, AES 106
Laboratories). Two samples of 1 m³ of air were captured per day of testing, one at the entrance of a hospital 107
room and another at the center of the room selected. Sabouraud/Gentamicin (28 µg/mL)/Chloramphenicol 108
(240 µg/mL) agar plates, irradiated with the air sample, were sealed and incubated at 35°C for 5 days. The 109
environmental surveillance was performed by the preventive medicine department at the hospital. The air 110
sampling procedure was sometimes altered by repetitions due to internal cleaning protocols, COVID-19 111
impact, and construction work inside the hospital. Due to this, the number of air samples was irregular 112
during the environmental surveillance: 230 air samples in 2019, 222 air samples in 2020 and 317 air samples 113
in 2021. 114

2.3. Agar-based screening plates 115

A method consisting of two sets of four-well agar plates was used to screen for azole resistance in all strains 117
of the study²⁰. The strains were considered resistant to every specific antifungal if the growth observed in the 118
drug-containing wells was like that of the growth control. All isolates that showed growth in the agar plates 119
were considered possible azole-resistant strains and were evaluated for AFST using the EUCAST. 120

2.4. Microdilution Antifungal Drugs Susceptibility Testing 121

AFST was performed following the EUCAST broth microdilution reference method 9.4³⁶. Antifungals used 123
were the azoles ITC, VRC, POS and isavuconazole (ISV) (all from Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain). 124
MICs were performed at least twice for each isolate. Clinical breakpoints for interpreting AFST results estab- 125
lished by EUCAST³⁷ were used for classifying the *A. fumigatus* strains as susceptible or resistant. *Aspergillus* 126
isolates with an MIC above the usual epidemiological cutoff values for at least 1 of the mold-active triazoles 127
(VRC, POS, ITC) were submitted to sequencing of the entire *cyp51A* gene and promoter region for detection 128
of mutations. 129

2.5. PCR Conditions for *cyp51A* amplification, and Sequencing 130

The full coding sequence of *cyp51A* including its promoter was amplified and sequenced, using primers and 132
PCR conditions previously described¹². To exclude the possibility that any change identified in the sequences 133
was due to PCR-induced errors, each isolate was independently analyzed twice. The amplified products 134

were purified using Illustra ExoProStar 1-step (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK) and both 135
strands were sequenced with the Big-Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, 136
CA, USA) following manufacturer's instructions. All gene sequences were edited and assembled using La- 137
sergene software package (DNASTar Inc., Madison, WI, USA). DNA sequences were compared against the 138
cyp51A sequence of *A. fumigatus* reference strain CBS 144.89 (NCBI accession number AFUB_063960). The 139
GenBank accession numbers for the *cyp51A* DNA sequences from both resistant strains are H100 PP392543 140
and H208 PP392544. 141

2.6. Strains Genotyping and Genotypic Diversity Analysis 142

All *A. fumigatus* strains included in this study were genotyped following the previously described typing 143
method TRESPERG³⁴. The combination of the genotypes obtained with each marker has a discriminatory 144
value (D) of 0.9972 using the Simpson index³⁸. The genotypic diversity analysis was performed as described 145
previously³³ and was represented graphically using a minimum spanning tree (MST) generated with the 146
combination of TRESPERG typing data analyzed by BioNumerics (version 6.0.1) software (Applied Maths, 147
Belgium). The date of isolation, source, and genotype of all the strains of the study are displayed in Supple- 148
mentary Table S1. The GenBank accession numbers for all four TRESPERG loci have been added in Supple- 149
mentary Table S2. The year of isolation, geographical origin, and genotypes of the *A. fumigatus* azole-resistant 150
strains, all harboring TR₃₄/L98H mutation, isolated in Spain from 2012 to 2023, were included for comparison 151
(Supplementary Table S3). 152

3. Results 153

3.1. *Aspergillus* spp strains 154

During the 3-year study period, 335 *Aspergillus* spp. isolates from 283 clinical samples and 52 environmental 155
samples were included. *Aspergillus fumigatus* was the predominant species recovered (174 isolates, 51.94%), 156
followed by *A. niger* (50 isolates, 14.93%), *A. terreus* (32 isolates, 9.55%) and *A. flavus* (28 isolates, 8.36%). 157
Several other less frequent species were identified, including *A. nidulans* (18 isolates, 5.37%) and *A. lentulus* 158
(11 isolates, 3.28%). Other species identified to a lesser extent were *A. calidoustus* (3 isolates, 0.89%), *A. carneus* 159
(1 isolate, 0.3%), *A. unguis* (5 isolates, 1.49%), *A. candidus* (2 isolates, 0.6%), *A. versicolor* (3 isolates, 0.89%), *A.* 160
fumigatiaffinis (1 isolate, 0.3%), *Neosartorya udagawae* (3 isolates, 0.89%), *A. ochraceus* (3 isolates, 0.89%) and *A.* 161
sydowii (1 isolate, 0.3%) (Table 1). 162

3.2. Agar-based screening plates 163

All strains tested grew in the control well without azole drug. Only two *A. fumigatus* strains grew in all wells supplemented with clinical azole drugs (ITZ, VCZ and POS) and in the agar wells supplemented with the DMIs, MET and EPZ, a pattern that we have previously reported as a possible underlying azole resistance mechanism Cyp51A dependant (TR₃₄/L98H or TR₉₃). Although this screening method was explicitly designed to screen for azole resistance in *A. fumigatus*, we considered that it could be useful for the surveillance to use it with the rest of non-*fumigatus* *Aspergillus* species isolated in this study.

Table 1. *Aspergillus* species, number and percentages (%) of strains isolated by the 3 years study period.

<i>Aspergillus</i> species	No. of strains isolated (%)							
	2019		2020		2021		Total	
	C	E	C	E	C	E	C	E
<i>A. fumigatus</i>	39 (41.05)	5 (5.3)	34 (35.8)	5 (5.3)	66 (45.5)	25 (17.2)	139 (41.5)	35 (10.45)
<i>A. niger</i>	13 (13.7)	1 (1.05)	13 (13.7)	0	14 (9.65)	9 (6.2)	40 (11.9)	10 (3)
<i>A. terreus</i>	8 (8.4)	0	13 (13.7)	1 (1.05)	10 (6.9)	0	31 (9.25)	1 (0.3)
<i>A. flavus</i>	12 (12.6)	1 (1.05)	12 (12.6)	0	3 (2.1)	0	27 (8.1)	1 (0.3)
<i>A. nidulans</i>	3 (3.2)	0	5 (5.3)	1 (1.05)	7 (4.8)	2 (1.4)	15 (4.5)	3 (0.9)
<i>A. lentulus</i>	6 (6.3)	0	5 (5.3)	0	0	0	11 (3.3)	0
<i>A. calidoustus</i>	2 (2.1)	0	0	0	1 (0.7)	0	3 (0.9)	0
<i>A. carneus</i>	1 (1.05)	0	0	0	0	0	1 (0.3)	0
<i>A. magnus</i>	1 (1.05)	0	2 (2.1)	0	0	2 (1.4)	3 (0.9)	2 (0.6)
<i>A. candidus</i>	2 (2.1)	0	0	0	0	0	2 (0.6)	0
<i>A. versicolor</i>	1 (1.05)	0	1 (1.05)	0	1 (0.7)	0	3 (0.9)	0
<i>A. fumigatiaffinis</i>	0	0	1 (1.05)	0	0	0	1 (0.3)	0
<i>N. udagawae</i>	0	0	2 (2.1)	0	1 (0.7)	0	3 (0.9)	0
<i>A. ochraceus</i>	0	0	0	0	3 (2.1)	0	3 (0.9)	0
<i>A. sydowii</i>	0	0	0	0	1 (0.7)	0	1 (0.3)	0
Total	88 (92.6)	7 (7.4)	88 (92.6)	7 (7.4)	107 (73.8)	38 (26.2)	283 (84.5)	52 (15.5)

C: Clinical origin, E: Environmental origin;

3.3. Antifungal Drugs Susceptibility Testing

Strains that were positive in the 4-well screening assay were subjected to azole drugs antifungal susceptibility testing (EUCAST). Two strains of *A. fumigatus* showed azole-resistant MICs, consisting of >8 mg/L to itraconazole, 4 mg/L to voriconazole, 0.5 mg/L to posaconazole and 8 mg/L to isavuconazole. The rest of the strains tested were all azole-susceptible. Thus, the prevalence of azole-resistant strains in this study was 0.6% (2 of 335 strains) and the prevalence of azole-resistant *A. fumigatus* was 1.15% (2 of 174 *A. fumigatus* strains).

3.4. Amplification and Sequence Analysis of *cyp51A*

The two *A. fumigatus* azole resistant strains (H-100 and H-208) were subjected to amplification and sequencing of the complete *cyp51A* gene. Sequence analysis revealed the same azole resistance mechanism in both strains, consisting of a 34-bp tandem repeat insertion in the promoter region of *cyp51A* together with a L98H substitution in the coding sequence of the gene (TR₃₄/L98H).

3.5. Genotypic variability in environmental and clinical samples.

The 174 *A. fumigatus* strains were genotyped, although 7 of them could not be amplified in one of the TRESPERG markers and were therefore excluded from the genotypic analysis. The TRESPERG genotypes of these 167 strains can be found in Supplementary Table 1. Out of the 167 strains, 31 were excluded from genotypic analysis because they share the same genotype as other strains from the same patient or were from the same day environmental search. Finally 136 strains were included in the genotypic analysis. A total of 99 different genotypes were identified according to the TRESPERG typing assay. The TRESPERG results showed a very diverse population with 72.73% of the total genotypes being represented as a single genotype. The *A. fumigatus* clinical strains showed less diversity than the ones from environmental origin (Table 2). The genotypic diversity of the *A. fumigatus* strains from clinical and environmental origin was graphically represented using a Minimum spanning tree (MST) (Figure 1).

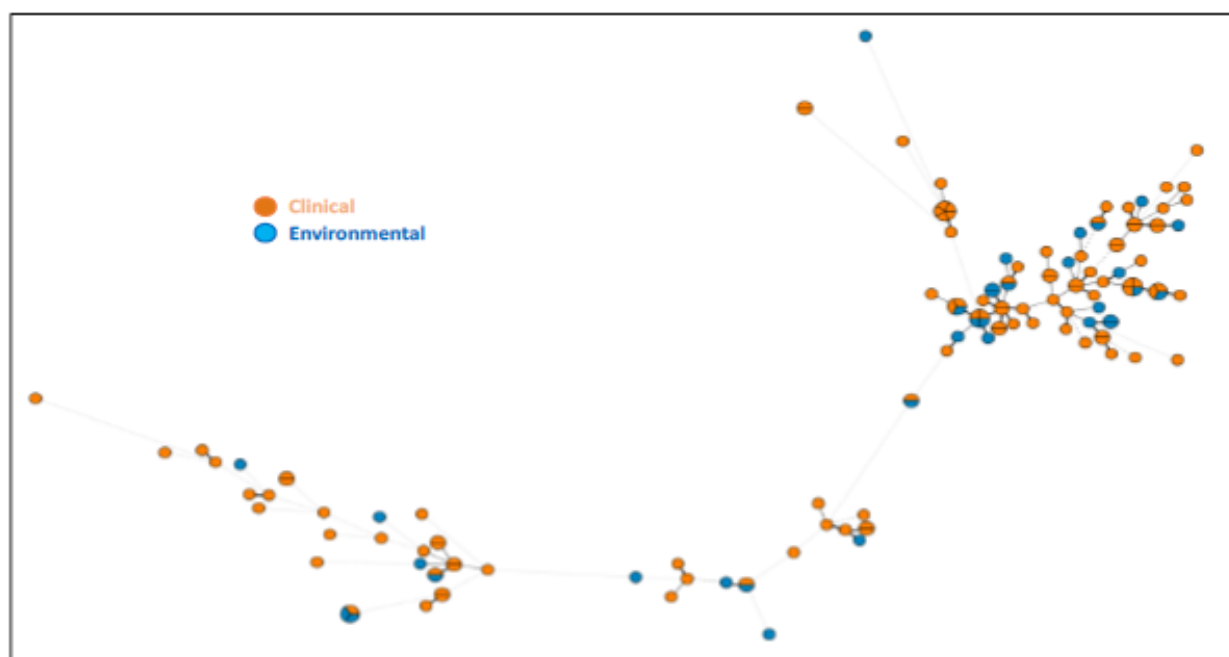


Figure 1. Minimum spanning tree (MST) showing the genotypic diversity *A. fumigatus* strains from clinical (in orange) and environmental (in blue) origin. Each circle shows a unique genotype, and its size represents the number of strains belonging to the same genotype. Connecting lines between circles show the similarity between genotypes: solid and bold (shaded in black) indicate only one marker difference, a solid line indicates differences in two markers, and dashed lines for differences in three or more markers.

Table 2. *Aspergillus fumigatus* genotypes found in air and in clinical samples collected during the 3 years of the study. 206

Sample source	No. of strains	No. of single genotypes	Diversity (%)
Clinical	102	60	58.82
Environmental	34	26	76.47

The strains were distributed in different clusters regardless of their origin, including strains from clinical and environmental origins in each cluster defined. Among the remaining 27 genotypes that were not unique, 15 genotypes were common among clinical *A. fumigatus* strains and 2 genotypes were shared among environmental *A. fumigatus* strains, some of them being isolated several times, even months apart. Ten of these 27 common genotypes were shared between clinical and environmental strains (Table 3). Also, some of these genotypes were common between clinical strains from different patients and environmental surveillance collected on different days. 208
209
210
211
212
213
214
215

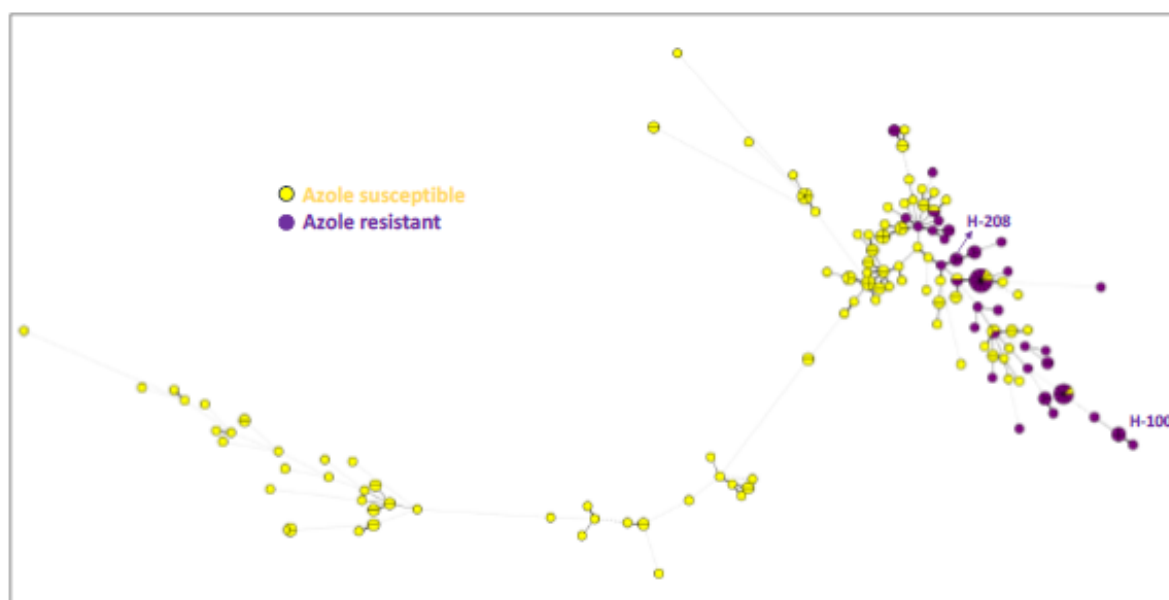


Figure 2. Minimum spanning tree (MST) showing the genotypic diversity of azole-susceptible (yellow) and azole-resistant (purple) *A. fumigatus* strains. Each circle shows a unique genotype, and its size shows the number of strains belonging to the same genotype. Connecting lines between circles show the similarity between genotypes: solid and bold (shaded in black) indicate only one marker difference, a solid line indicates differences in two markers, and dashed lines for differences in three or more markers. The two azole-resistant strains obtained in this work are indicated: H-100 and H-208. 216
217
218
219
220
221
222

The two azole-resistant *A. fumigatus* strains were not isogenic, having different genotypes: (i) the strain from the environment (t04Bm1.2c22be07) and (ii) the patient strain (t02Am1.1c09e11). None of the genotypes were coincident with any of the genotypes found in the azole-susceptible *A. fumigatus* strains of this study. The 223
224
225
226

genotypic diversity of azole-susceptible and azole-resistant *A. fumigatus* strains from this study was evaluated using a collection of azole-resistant *A. fumigatus* strains, harbouring the TR₃₄/L98H azole resistance mechanism, from different locations in Spain that were isolated between 2012-2023 (Supplementary Table S3) and represented with a MST (Figure 2). The genotypes of the two azole-resistant strains from this study shared genotypes with azole-resistant *A. fumigatus* strains previously isolated in some locations in Spain. The azole-susceptible strains were widely distributed across the MST and all the azole-resistant strains were highly related and most of them grouped together in close clusters.

Table 3. Genotypes shared between clinical and environmental *A. fumigatus* strains.

Strain ID	Date of isolation*	Source	TRESPERG typing			
			CSP	MP2	CFEM	ERG
H122	2020/03/06	Clinical	t01	m5.3	c08B	e07
H287	2021/07/21	Environmental	t01	m5.3	c08B	e07
H285	2021/07/19	Environmental	t03	m1.1	c05A	e07
H293	2021/08/02	Clinical	t03	m1.1	c05A	e07
H296	2021/08/11	Clinical	t03	m1.1	c05A	e07
H33	2019/05/15	Clinical	t03	m1.1	c08A	e07
H76	2019/10/28	Clinical	t03	m1.1	c08A	e07
H203	2021/02/16	Environmental	t03	m1.1	c08A	e07
H333	2021/12/13	Environmental	t03	m1.1	c08A	e07
H225	2021/04/01	Environmental	t03	m1.3	c08A	e09
H232	2021/04/13	Clinical	t03	m1.3	c08A	e09
H213	2021/03/02	Clinical	t03	m2.3	c07	e06
H283	2021/07/19	Environmental	t03	m2.3	c07	e06
H137	2020/06/23	Environmental	t04A	m1.1	c12	e15
H140	2020/07/06	Clinical	t04A	m1.1	c12	e15
H20	2019/03/02	Clinical	t04A	m1.3	c08A	e07
H108	2020/02/12	Clinical	t04A	m1.3	c08A	e07
H192	2021/01/25	Environmental	t04A	m1.3	c08A	e07
H141	2020/07/15	Clinical	t04A	m1.3	c08B	e07
H217	2021/03/19	Clinical	t04A	m1.3	c08B	e07
H230	2021/04/08	Clinical	t04A	m1.3	c08B	e07
H274	2021/07/09	Environmental	t04A	m1.3	c08B	e07
H96	2020/01/07	Environmental	t04A	m3.4	c20	e11
H97	2020/01/03	Clinical	t04A	m3.4	c20	e11
H278	2021/07/12	Environmental	t09	m5.3	c10	e07
H279	2021/06/24	Clinical	t09	m5.3	c10	e07
H282	2021/07/19	Environmental	t09	m5.3	c10	e07

*: date of isolation (/yyyy/mm/dd)

236

237

4. Discussion

The spectrum of pathologies caused by *Aspergillus* species is named aspergillosis with invasive aspergillosis (IA) as one of the most critical diseases due to its high mortality rates among immunocompromised hosts^{1,39,40}. *Aspergillus fumigatus* is the most frequently isolated species among the *Aspergillus* genus in different parts of the world^{23,24,26,28,31}. Similarly, in our 3-year surveillance results, out of a total of 335 *Aspergillus* spp. isolates, more than half (51.94%) of the strains were identified as *A. fumigatus*. This result was similarly found in other Spanish surveillance studies, although the prevalence order of the rest of *Aspergillus* species differs^{23,24}. In our study, the number of *A. fumigatus* isolates was followed by *A. niger*, *A. terreus* and *A. flavus*.

Nowadays, the rise of *A. fumigatus* azole-resistant strains has become globally alarming⁷, representing a severe threat to a successful clinical outcome, because azole resistance is closely associated to treatment failure and a higher mortality rate^{5,11,41,42}. In response to this urgent issue, the ECDC has declared that epidemiological surveillance studies are a useful tool to provide local information regarding *A. fumigatus* azole susceptibility levels²². In Spain, multiple studies have evaluated the distribution of *Aspergillus* species and the prevalence of azole resistance from clinical samples, but most of these studies were limited due to a lack of environmental samples^{23,24,27}, although a few studies have included these type of isolates^{29,31}. The inclusion of environmental isolates has been reinforced by the finding of the hospital setting as a hypothetical source of dissemination of azole-resistant *A. fumigatus*⁴³.

Broth microdilution reference methodologies can constitute a considerable laborious and time-consuming way to perform surveillance studies. The employment of 4-well screening methods is affordable and simple to perform in any mycology laboratory and can easily detect azole-resistant *A. fumigatus* strains¹⁹. Moreover, they can presumably identify the resistance mechanism involved²⁰, despite the fact that those strains considered as resistant have to be confirmed by AFST and *cyp51A* sequencing. The 4-well agar expanded method²⁰ has been used in this study and it permits for screening the entire collection of strains included, and it detected two *A. fumigatus* azole-resistant strains from clinical and environmental origin. Both strains were pan-azole-resistant and harbored a TR₃₄/L98H azole resistance mechanism, the most frequent azole resistance mechanism described in *A. fumigatus*^{7,13,14}. The prevalence of azole-resistant *A. fumigatus* in this study was 1.15% (2 of 174 *A. fumigatus* strains), a low rate compared to other locations in Europe^{28,44-46}, although it fits within previous studies in Spain which range from the rare occurrence under 1 % in 2010-11²³ and 1.2 % in 2016²⁴ to 5.5 % in the most recent study in 2021³¹.

In surveillance studies, genotyping assays are a very useful tool to understand the distribution and dynamics of *A. fumigatus* in both clinical and environmental settings⁴⁷⁻⁵⁰. TRESPERG has been employed in this study to genotype *A. fumigatus*, taking advantage of its good discriminatory power and simplicity^{33,34}. The results

of genotyping showed that the genotypes of the strains included in this study are very diverse, with 72.73% 270
being a single genotype. Although the diversity of the genotypes was high in both settings, we found that 271
was higher among strains with an environmental origin, in consonance with the findings in other studies 272
49,51,52. However, this result should be taken cautiously because there is a considerable difference in the num- 273
bers of clinical/environmental strains included in the study. 274

According to the genotyping results, the two azole-resistant *A. fumigatus* strains had different genotypes and 275
did not share their genotype with any azole-susceptible *A. fumigatus* strains found in this study. Furthermore, 276
the azole-resistant *A. fumigatus* strain isolated from a clinical source come from an azole-naïve patient, so the 277
development of the azole resistance mechanism could not possibly happen inside the host since there was 278
not selective pressure. Recently, azole-resistant *A. fumigatus* isogenic strains have been found in a patient and 279
in their bathroom, which suggests two hypotheses: that the environmental setting could be contaminated 280
with azole-resistant *A. fumigatus* that could colonize the patient; or that the patient was the source of the 281
environmental contamination⁴³. Other studies have found similar situations to these two hypotheses⁵³⁻⁵⁵. A 282
very interesting finding in this study is that several genotypes were shared between clinical and environ- 283
mental strains, in alignment with the different hypotheses proposed before. Moreover, if we had tracked the 284
different locations of the environmental captures and the locations of the patients, we could have determined 285
if patients hospitalized in different parts of the same hospital were infected with the same spore population 286
as other studies have found⁴⁹. 287

The two azole-resistant strains were genotypically different and with no genetic relation with the rest of 289
azole-susceptible strains included in the study. However, the genotypic comparison that include the collec- 290
tion of azole-resistant *A. fumigatus* strains from different locations in Spain showed that all azole-resistant 291
strains grouped in very close clusters, as has been previously described in other studies⁵⁶⁻⁵⁸. Although the 292
reason why these strains that harbor TR₃₄/L98H azole resistance mechanism are so genetically related re- 293
mains unclear, a better adaptation to persist in the environment or a relation with *A. fumigatus* genetic insta- 294
bility have both been suggested^{59,60}. 295

5. Conclusions 297

Resistance of the human pathogenic fungus *A. fumigatus* to azole drugs is rising. However, the link between 298
patient infections and their potential acquisition from Hospital environmental sources remain vague. In this 299
work we used two recent methodological techniques that for their simplicity allow for easy integration into 300
any clinical microbiology laboratory, fulfilling all the needs of surveillance for azole resistance, combined 301

with a suitable typing assay. In this study, we found that *A. fumigatus* genotypes were highly diverse in both settings, emphasizing the highly mixed nature of *A. fumigatus* populations. However, identical clonal genotypes were found to occur both in the clinical strains and in the environmental sampling, suggesting that patients hospitalized in different parts of the same hospital can be infected with the same strain as every patient might inhale the same spore population. The isolation of azole-resistant strains from a patient and from the hospital environment is an interesting finding, encouraging more analysis of clinical and environmental sources to detect azole resistance in *A. fumigatus*.

References

1. Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.* 2019;33(1). doi:10.1128/CMR.00140-18
2. Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: Clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care.* 2015;19(1):1-15. doi:10.1186/s13054-014-0722-7
3. Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2021;35(2):415-434. doi:10.1016/j.idc.2021.03.008
4. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;63(4):e1-e60. doi:10.1093/cid/ciw326
5. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis.* 2017;216(suppl_3):S436-S444. doi:10.1093/infdis/jix210
6. Wiederhold NP, Verweij PE. *Aspergillus fumigatus* and pan-azole resistance: Who should be concerned? *Curr Opin Infect Dis.* 2020;33(4):290-297. doi:10.1097/QCO.0000000000000662
7. Garcia-Rubio R, Cuenca-Estrella M, Mellado E. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs.* 2017;77(6):599-613. doi:10.1007/s40265-017-0714-4
8. 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):389-395. doi:10.1016/j.medmal.2019.07.014
9. Zhang J, van den Heuvel J, Debets AJM, et al. Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2017;284(1863):20170635. doi:10.1098/rspb.2017.0635
10. Garcia-Rubio R, Gonzalez-Jimenez I, Lucio J, Mellado E. *Aspergillus fumigatus* Cross-Resistance between Clinical and Demethylase Inhibitor Azole Drugs. Elkins CA, ed. *Appl Environ Microbiol.*

11. Meis JF, Chowdhary A, Rhodes JL, Fisher MC, Verweij PE. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2016;371(1709). doi:10.1098/rstb.2015.0460
12. Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Identification of two different 14- α sterol demethylase- related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2431-2438. doi:10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001
13. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):1897–1904. doi:10.1128/aac.01092-06
14. Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Triazole resistance in *Aspergillus* spp.: A worldwide problem? *J Fungi*. 2016;2(3). doi:10.3390/jof2030021
15. Pérez-Cantero A, López-Fernández L, Guarro J, Capilla J. Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(1). doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.09.011
16. Linden J, Arendrup MC, Lee H, Melchers W, Verweij P. Azole containing agar plates as a screening tool for azole resistance of *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*. 2009;52:19.
17. Arendrup MC, Verweij PE, Mouton JW, Lagrou K, Meletiadis J. Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(12):3325-3333. doi:10.1093/jac/dkx319
18. Buil JB, van der Lee HAL, Rijs AJMM, et al. Single-Center Evaluation of an Agar-Based Screening for Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* by Using VIPcheck. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(12). doi:10.1128/AAC.01250-17
19. Guinea J, Verweij PE, Meletiadis J, et al. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(6):681-687. doi:10.1016/j.cmi.2018.09.008
20. Lucio J, Gonzalez-Jimenez I, Garcia-Rubio R, Cuetara MS, Mellado E. An expanded agar-based screening method for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*. 2022;65(2):178-185. doi:10.1111/myc.13400
21. Guinea J. Updated eucast clinical breakpoints against *Aspergillus*, implications for the clinical microbiology laboratory. *J Fungi*. 2020;6(4):1-11. doi:10.3390/jof6040343
22. Kleinkauf N, Verweij PE, Arendrup MC, et al. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. ECDC, Stockholm, Sweden (2013). *Eur Cent Dis Control Tech Rep*. Published online February 28, 2013. doi:10.2900/76274

23. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3380-3387. doi:10.1128/AAC.00383-13
24. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Rivero-Menéndez O, et al. Molecular identification and susceptibility testing of molds isolated in a prospective surveillance of triazole resistance in Spain (FILPOP2 Study). *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(9):1-11. doi:10.1128/AAC.00358-18
25. Lestrade PP, van der Velden WJFM, Bouwman F, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis and triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in patients with haematological malignancies: A single-centre retrospective cohort study. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(5):1389-1394. doi:10.1093/jac/dkx527
26. Ragozzino S, Goldenberger D, Wright PR, et al. Distribution of *Aspergillus* Species and Prevalence of Azole Resistance in Respiratory Samples from Swiss Tertiary Care Hospitals. *Open Forum Infect Dis.* 2022;9(2):1-4. doi:10.1093/ofid/ofab638
27. Vidal-Acuña MR, Ruiz M, Torres MJ, Aznar J. Prevalence and in vitro antifungal susceptibility of cryptic species of the genus *Aspergillus* isolated in clinical samples. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019;37(5):296-300. doi:10.1016/j.eimc.2018.07.010
28. van der Linden JWM, Arendrup MC, Warris A, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(6):1041-1044. doi:10.3201/eid2106.140717
29. Peláez-García de la Rasilla T, González-Jiménez I, Fernández-Arroyo A, et al. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA): Hospital or Home Environment as a Source of Life-Threatening *Aspergillus fumigatus* Infection? *J Fungi.* 2022;8(3). doi:10.3390/jof8030316
30. Ener B, Ergin Ç, Gülmez D, et al. Frequency of azole resistance in clinical and environmental strains of *Aspergillus fumigatus* in Turkey: A multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77(7):1894-1898. doi:10.1093/jac/dkac125
31. Escribano P, Rodríguez-Sánchez B, Díaz-García J, et al. Azole resistance survey on clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;27(8):1170.e1-1170.e7. doi:10.1016/j.cmi.2020.09.042
32. De Valk HA, Meis JFGM, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CHW. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4112-4120. doi:10.1128/JCM.43.8.4112-4120.2005
33. Garcia-Rubio R, Gil H, Monteiro MC, Pelaez T, Mellado E. A new *Aspergillus fumigatus* typing method based on hypervariable tandem repeats located within exons of surface protein coding genes (TRESP). *PLoS One.* 2016;11(10):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0163869
34. Garcia-Rubio R, Escribano P, Gomez A, Guinea J, Mellado E. Comparison of two highly discriminatory typing methods to analyze *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *Front Microbiol.* 2018;9(JUL):1-9.

35. Tang CM, Cohen J, Holden DW. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol Microbiol.* 1992;6(12):1663-1671. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb00891.x 406-408
36. Guinea J, Meletiadiis J, Arikan-Akdagli S, Kahlmeter G, Arendrup MC, (EUCAST) S on AST (AFST) of the EEC for AST. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.4 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_EDef_9.4_method_for_susceptibility_testing_of_moulds.pdf. Published 2022 409-413
37. Arendrup MC, Friberg N, Mares M, et al. How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(11):1464-1472. doi:10.1016/j.cmi.2020.06.007 414-416
38. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988;26(11):2465-2466. doi:10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988 417-419
39. Low CY, Rotstein C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med Rep.* 2011;3(1):1-8. doi:10.3410/M3-14 420-421
40. Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V, et al. Factors Associated with Overall and Attributable Mortality in Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2008;47(9):1176-1184. doi:10.1086/592255 422-423
41. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJG, Meis JF. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2016;62(3):362-368. doi:10.1093/cid/civ885 424-426
42. van der Linden JWM, Snelders E, Kampinga GA, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(10):1846-1854. doi:10.3201/eid1710.110226 427-429
43. 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.* 2021;7(1):1-9. doi:10.3390/jof7010022 430-432
44. Lavergne RA, Morio F, Danner-Boucher I, et al. One year prospective survey of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* at a French cystic fibrosis reference centre: Prevalence and mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(7):1884-1889. doi:10.1093/jac/dkz144 433-435
45. Buil JB, Snelders E, Denardi LB, Melchers WJG, Verweij PE. Trends in Azole Resistance in the netherlands 1994-2016. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(1):176-178. 436-437
46. Morio F, Aubin GG, Danner-Boucher I, et al. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J* 438-439

- Antimicrob Chemother.* 2012;67(8):1870-1873. doi:10.1093/jac/dks160 440
47. van der Torre MH, Shen H, Rautemaa-Richardson R, Richardson MD, Novak-Frazer L. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* in chronic pulmonary aspergillosis patients. *J Fungi.* 2021;7(2):1-20. doi:10.3390/jof7020152 441-443
 48. Fan H, Chen Y, Duan L, et al. Comparison of two typing methods for characterization of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* from potting soil samples in a Chinese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(2):1-8. doi:10.1128/AAC.01578-19 444-446
 49. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, et al. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol.* 1998;36(6):1494-1500. doi:10.1128/jcm.36.6.1494-1500.1998 447-449
 50. Jeanvoine A, Godeau C, Laboissière A, Reboux G, Millon L, Rocchi S. Molecular epidemiology of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in sawmills of eastern France by microsatellite genotyping. *J Fungi.* 2020;6(3):1-10. doi:10.3390/jof6030120 450-452
 51. Guinea J, De Viedma DG, Peláez T, et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus*: An in-depth genotypic analysis of isolates involved in an outbreak of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(10):3498-3503. doi:10.1128/JCM.01159-11 453-455
 52. Araujo R, Amorim A, Gusmão L. Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor hospital environments. *Med Mycol.* 2010;48(6):832-838. doi:10.3109/13693780903575360 456-457
 53. Lemaire B, Normand AC, Forel JM, Cassir N, Piarroux R, Ranque S. Hospitalized Patient as Source of *Aspergillus fumigatus*, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(8):1524-1527. doi:10.3201/eid2408.171865 458-459
 54. Godeau C, Reboux G, Scherer E, et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the hospital: Surveillance from flower beds to corridors. *Am J Infect Control.* 2020;48(6):702-704. doi:10.1016/j.ajic.2019.10.003 460-462
 55. Lavergne RA, Chouaki T, Hagen F, et al. Home environment as a source of life-threatening azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2017;64(1):76-78. doi:10.1093/cid/ciw664 463-465
 56. Garcia-Rubio R, Monzon S, Alcazar-Fuoli L, Cuesta I, Mellado E. Genome-wide comparative analysis of *Aspergillus fumigatus* strains: The reference genome as a matter of concern. *Genes (Basel).* 2018;9(7). doi:10.3390/genes9070363 466-468
 57. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, et al. Clonal Expansion and Emergence of Environmental Multiple-Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains Carrying the TR34/L98H Mutations in the *cyp51A* Gene in India. *PLoS One.* 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0052871 469-471
 58. Camps SMT, Rijs AJMM, Klaassen CHW, et al. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates harboring the TR34/L98H azole resistance mechanism. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2674-2680. doi:10.1128/JCM.00335-12 472-474

59. dos Reis TF, Silva LP, de Castro PA, et al. The Influence of Genetic Stability on *Aspergillus fumigatus* Virulence and Azole Resistance. *G3 Genes | Genomes | Genetics*. 2018;8(1):265-278. doi:10.1534/g3.117.300265
60. Fernanda dos RT, Pereira SL, Alves de CP, et al. The *Aspergillus fumigatus* Mismatch Repair MSH2 Homolog Is Important for Virulence and Azole Resistance. *mSphere*. 2019;4(4):e00416-19. doi:10.1128/mSphere.00416-19

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Minimum spanning tree (MST) showing the genotypic diversity *A. fumigatus* strains from clinical (in orange) and environmental origin (in blue). Each circle shows a unique genotype, and its size represents the number of strains belonging to the same genotype. Connecting lines between circles show the similarity between genotypes: solid and bold (shaded in black) indicate only one marker difference, a solid line indicates differences in two markers, and dashed lines for differences in three or more markers.

Figure 2. Minimum spanning tree (MST) showing the genotypic diversity of azole-susceptible (in yellow) and azole-resistant (in purple) *A. fumigatus* strains. Each circle shows a unique genotype, and its size the number of strains belonging to the same genotype. Connecting lines between circles show the similarity between genotypes: solid and bold (shaded in black) indicate only one marker difference, a solid line indicates differences in two markers, and dashed lines for differences in three or more markers. The two azole-resistant strains obtained in this work are indicated: H-100 and H-208.

Supplementary Table 1: Geographical origin, clinical/environmental isolation, azole resistance mechanism related to Cyp51A and TRESPERG genotyping of the collection of *A. fumigatus* strains used in this work.

Supplementary Table 2: Genbank accession numbers of all *A. fumigatus* TRESPERG gene locus.

Supplementary Table 3: Geographical origin, clinical/environmental isolation, azole resistance mechanism related to Cyp51A and TRESPERG genotyping of the collection of *A. fumigatus* strains isolated in different geographical locations in Spain.

Author Contributions: Conceptualization, EM; methodology, JL; SCP; SRE; validation, JL, MSC, EM; formal analysis, EM, LAF, HG; investigation, JL, MSC; resources, EM; data curation, JL, HG, EM.; writing – original draft preparation, JL, MSC, writing – review and editing, JL; LAF, HG, EM.; visualization, EM.; supervision, MSC; EM; project administration, EM.; funding acquisition, EM. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI21CIII/00028). J. Lucio held a predoctoral fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria (F17CIII/00037). This Research is also supported by the Center for Biomedical Research in Infectious Diseases (CIBERINFEC-CB21/13/00105) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain.

Ethical review Committee approval: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

519

520

ANEXO VII: Artículo en revisión

Type of the Paper (Article.)

Importance of the *Aspergillus fumigatus* mismatch repair protein Msh6 in antifungal resistance development

Lucio J.^{1#}, Gonzalez-Jimenez I.^{1#}, Roldan A.¹, Amich J.¹, Alcazar-Fuoli L.^{1,2} and Mellado E.^{1,2*}

¹ Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Maja-dahonda, Madrid, Spain;

² CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC-CB21/13/00105), ISCIII, Spain.

both authors contribute equally. *Correspondence: emellado@isciii.es

Abstract: One of the systems responsible for recognition and repair of mistakes occurring during cell replication is the DNA mismatch repair (MMR) system. Two major protein complexes constitute the MMR pathway: MutS and MutL. Here, we investigated the possible relation of four *A. fumigatus* MMR genes with azole resistance: *msh2*, *msh6*, *pms1*, and *mlh1*. We examined the MMR gene variations in 168 *A. fumigatus* genomes. Our analysis showed that genes *msh2*, *pms1*, and *mlh1* have low genetic variability and do not seem to correlate with drug resistance. In contrast, there is a nonsynonymous mutation (G240A) in the *msh6* gene that is harbored by 42% of the strains, most of them also harboring the TR34/L98H azole resistance mechanism in *cyp51A*. The *msh6* gene was deleted in the *Δmsh6* *A. fumigatus* strain and the *Δmsh6* isolates were analyzed for fitness, azole susceptibility and virulence capacity, showing no differences compared with the *Δmsh6* parental strain. Wild-type *msh6* and *Δmsh6* strains were grown on high concentrations of azole and other non-azole antifungal drugs used in crop protection. A 10- and 2- fold higher mutation rates in genes that confer resistance to boscalid and benomyl, respectively, were observed in *Δmsh6* strains compared to the wild-type. This study suggests a link between Msh6 and fungicide resistance acquisition.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, antifungal resistance, *msh6*, MMR pathway.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Triazoles are the main drugs used for treatment and prophylaxis against *Aspergillus* spp. infections [1, 2]. However, the increased worldwide detection of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates is threatening azole drugs' effectiveness in aspergillosis management [3]. Triazole drugs belong to the demethylation inhibitors drug family (DMIs), which targets fungi at the 14- α sterol demethylase (Cyp51), an essential enzyme from the ergosterol biosynthesis route [4]. In the clinical setting the four triazole drugs used as first line antifungal treatment are mainly voriconazole and isavuconazole, and also itraconazole and posaconazole. On the other hand, in the agricultural environment, DMIs are used to protect crops against different fungal plant pathogens, but due to their chemical structure similar to clinical azoles, cross-resistance between both drug families is common [5-7]. In addition, other classes of fungicides, such as

benzimidazoles (MBCs), strobilurins (QoIs), and succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs) are also intensively used to protect crops, together with DMIs, creating an environmental pressure to the evolution of resistance against all major classes of fungicides [8].

The development of azole resistance in *A. fumigatus* occurs due to a selective pressure of antifungals that can be applied in two different scenarios: the clinical path, usually as a result of long periods of exposure to azole clinical therapy, which associates with single point mutations in *cyp51A*, and an environmental acquisition due to the use of DMIs in the agricultural setting, related to a combination of Cyp51A modifications (several *cyp51A* point mutations together with tandem repeat insertions (TR), in the promoter of *cyp51A*) [9]. The majority of the azole resistant isolates described to date have been associated with the environmental route, whereas the resistant isolates developed in clinics have arisen after long azole treatments [10]. In plant pathogens, DMI resistance shows a wide variety of mechanisms although the combination of Cyp51 point mutations and promoter insertions are predominant among diverse fungal species [9].

Unlike DMIs, the impact of non azole pesticides in the development of *A. fumigatus* azole resistance has been poorly studied [8, 11-12]. Some of these non-azole fungicides mentioned previously, including QoIs, SDHIs, and MBCs, are widely used [13] and some studies have reported resistant strains harboring point mutations in their target genes. Resistance mechanisms to QoIs have been associated to point mutations in the cytochrome *bcl* gene (*cytB*) [14, 15]; SDHIs resistance mechanisms have been related to point mutations in the *sdhB* subunit [15, 16]; and lastly, point mutations in the β -tubulin gene (*benA*) have been linked to resistance to MBCs [17]. We have recently used a collection of *A. fumigatus* strains to reveal a correlation between resistance to these fungicides and the azole resistance mechanisms involving TRs, showing a multi-resistance pattern phenomenon in *A. fumigatus* that could be related to their specific genetic background [8].

In a previous WGS phylogenetic analysis performed in our lab, a genome collection of azole-susceptible and resistant *A. fumigatus* strains from diverse geographical origins were bundled in four different clusters. The most remarkable finding was that all genomes harboring the azole resistance mechanisms with TRs in *cyp51A* promoter were grouped in the same cluster [18], suggesting genetic closeness possibly due to additional genetic mechanisms operating in these genomes that could include fitter genotypes. Some studies have suggested genetic instability as a possible mechanism of evolving azole resistance in *A. fumigatus* [19, 20], as well as in other fungal pathogens [21-23]. In this sense, the avoidance of mistakes during cell replication allows for genetic stability, key for the enduring survival of organisms [24]. The DNA mismatch repair (MMR) system conducts the recognition and repair of any mistakes occurring during DNA replication [25]. This pathway is constituted by two protein complexes, MutS, which recognizes and binds to the mismatch, and MutL, interacting with the mistake and removing the strand [26]. Multiple homologs of these proteins have been identified among the eukaryotic microorganisms, best characterized in *Saccharomyces cerevisiae* [27]. Although the MMR has been poorly investigated in *A. fumigatus* compared to *S. cerevisiae*, the genes comprising it

are well conserved through all phylum *Ascomycota*, including *msh1*, *msh2*, *msh3*, *msh4*, *msh6* and *mlh1* [28]. Defects in MMR, such as gene loss or alterations of the pathways, can cause alterations in the recognition and repair of mutations, creating, in this scenario, an increased mutation rate associated with mutator phenotypes [27, 29].

Here, we investigated the potential relation of MMR in the development of resistance in *A. fumigatus* by searching for mutations in the genes *msh2*, *msh6*, *pms1* and *mlh1* among a collection of environmental and clinical *A. fumigatus* isolates. In view of the results obtained, we deleted *msh6* to evaluate the importance of genetic instability in *A. fumigatus* as a possible mechanism of evolving antifungal resistance. Comparison of mutation frequencies in *A. fumigatus* wild-type and $\Delta msh6$ strains showed that the loss of Msh6 results in an increased mutation rate when exposed to some antifungals, allowing for a rapid generation of resistance.

2. Materials and Methods

2.1. *Aspergillus fumigatus* strains

A total of 144 clinical *A. fumigatus* strains obtained over a period of 20 years (2001 to 2021) and belonging to the Spanish National Center of Microbiology, were used in this study. This collection comprises a heterogeneous group of isolates including azole-susceptible and azole-resistant strains. Resistant strains include a selection of the most common azole resistance mechanisms described to date (G54, M220, G448S, TR₃₄/L98H, TR₃₄/L98H/S297T/F495I, TR₄₆/Y121F/T289A, TR₅₃). Species level identification was performed by PCR amplification and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 regions and a portion of the β -tubulin gene [30]. The reference strain *akvB^{KU80}* was used to perform all the transformation experiments.

2.2. Whole genome sequencing analysis

A search for variants or mutations in MMR genes was performed within a collection of 163 *A. fumigatus* genomes that had been previously sequenced in our laboratory using Nextera® XT Library Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) as described before or obtained from public databases [18]. All the data used in this analysis including information about clinical antifungal susceptibility and azole resistance mechanisms of the strains can be found in Supplementary Table S1.

2.3. Generation of *A. fumigatus* $\Delta msh6$ strains

2.3.1. Vector construction

To assess the role of Msh6, the corresponding *msh6* gene was deleted from the *A. fumigatus* strain *akvB^{KU80}* and replaced by the resistance marker pyrithiamine (*prt*) (Figure 1). The corresponding fusion cassette was constructed by overlapping PCR. The PCR conditions for amplification of upstream, downstream and the *prt* fragment excerpts were 2 minutes at 98°C and then 30 cycles of 30 seconds at 98°C, 15 seconds at 55°C and 2 minutes at 98°C, with a final elongation step of 7 minutes at 68°C. PCR reaction mix was performed using the PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara Bio USA, Inc.) following

manufacturer’s instructions using primers p1 and p2 for the upstream excerpt, p4 and p6 for the downstream and p3 and p5 for the *prt* insert (Table S2). For the amplification of the final fusion cassette PCR conditions were 95°C for 1 minute, then 35 cycles of 95°C for 30 seconds followed by 6 minutes at 68°C, ending with a final step of 6 minutes at 68°C. Primers used for amplifying the whole cassette were p1 and p6 (Table S2). PCR was performed using the Advantage® Polymerase Mix (Takara Bio USA, Inc.) following manufacturer’s recommendations, mixing equal amounts of the three excerpts to conform the cassette. The primer locations and the fusion vector design are shown in Fig. 1.

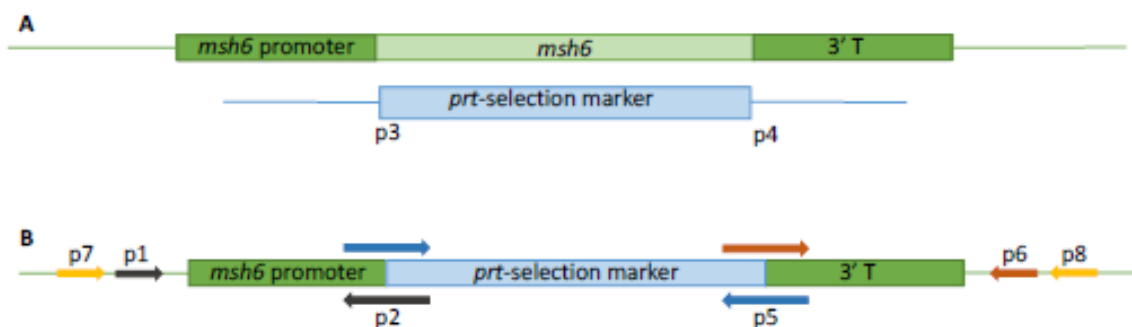


Figure 1: Construction of the fusion cassette for *A. fumigatus msh6* deletion in the *akuB^{KU80}* strain. The deleted *msh6* gene is indicated in light green and the pyrithiamine selection marker in light blue. (A) Map of the parental *msh6*-WT strain and the pyrithiamine (*prt*) selection marker. (B) Design of the phusion cassette for *A. fumigatus Δmsh6* strain.

2.3.2. Transformation

Aspergillus fumigatus transformation was achieved using protoplasts, as described before [31]. The resulting transformants were selected on minimal medium plates containing 0.5 g/ml pyrithiamine (Sigma Aldrich, Madrid, Spain). Mutants were confirmed by PCR and sequencing using primers p7 and p8 (Fig. 1, Table S3) and the positive ones were named with a letter T (transformant) followed by a number.

2.4. Phenotypic characterization of *Δmsh6* mutant.

A total of 10⁴ conidia from two independent *Δmsh6* strains (T3 and T6) and its parental WT strain (*akuB^{KU80}*) were grown in solid MM containing 0.04 μM, 0.06 μM, and 1.6 μM of menadione; 0.005% and 0.02% of H₂O₂; 10mg/L, 50mg/L, and 100 mg/L of Congo Red (Sigma, Madrid, Spain); and 10mg/L and 100 mg/L of Calcofluor white (Sigma, Madrid, Spain). Plates were incubated for 72h at 37°C and at least two biological replicates were performed for each test.

2.5. *Galleria mellonella* survival assay

To determine whether there were differences in virulence, the parental strain and the generated *Δmsh6* (T3 and T6) mutant strains, were tested in the alternative model of infection *G. mellonella*. Wax-moth larvae used (TruLarv™ BioSystems Technology, UK)

were infected with *A. fumigatus* mutants and \DeltaakuB^{KU80} strain as a control. Wax-moth larvae killing assays were performed as previously described [32]. 20 larvae (0.2–0.3 g) were inoculated with 10^3 and 10^4 conidia per larvae for each strain and incubated at 37°C for 8 days, during which mortality was recorded daily. Each experiment was performed at least 3 times, and results were reported as mean values. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software package (version 11.0) (SPSS Inc., USA). Kaplan-Meier survival curves were analyzed by using a log-rank (Mantel-Cox) test for significance. A *p* value < 0.01 was considered significant.

2.6. Antifungal susceptibility testing

Antifungal susceptibility tests were performed following the E-test method [33] for itraconazole (ITC), voriconazole (VCZ) and Posaconazole (PSZ) (bioMérieux, Spain). An inoculum adjusted to 10^5 conidia per ml was used, and 200 μ l were plated in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Quimica SA, Spain) agar base plates supplemented with 2% glucose. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were read after 48h incubation at 35°C. Confirmation of Antifungal susceptibility testing was performed using the broth microdilution method described by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [34]. The antifungal agents tested were ITC (Janssen Pharmaceutical, Spain), VCZ (Pfizer, Spain), PSZ (Schering-Plough, Spain), and Amphotericin B (AmB) (Sigma, Madrid, Spain). *Aspergillus flavus* ATCC204304 and *A. fumigatus* ATCC204305 were used as quality control strains. *In vitro* susceptibility and resistance were defined according to the epidemiological cutoff values published for *A. fumigatus*. Isolates with ITC and VCZ MICs ≤ 1 μ g/ml and PSZ ≤ 0.25 μ g/ml were considered susceptible [35]. Both susceptibility tests were repeated at least twice for each strain.

2.7. Mutagenesis experiments in $\Delta msh6$ strains

Putative gains of antifungal resistance were assayed by plating a total of 10^9 conidia of two $\Delta msh6$ null mutant strains (T3 and T6) and their parental WT strain (*akuB^{KU80}*) on solid minimal media (MM) supplemented with one of the following: 2 mg/L of PSZ, 4 mg/L of VCZ, 32 mg/L of prochloraz (PRZ), benomyl (BNY), boscalid (BCL) or azoxystrobin (AZB). All plates were incubated at 37°C up to 14 days until resistant colonies emerged. Colonies were picked and streaked in a new MM plate supplemented with the same antifungal at the matching concentration. Strains that grew again in these plates were picked and isolated for further genetic analysis.

2.8. Genetic analysis of the mutants

Genomic DNA was extracted from all *A. fumigatus* mutants followed by PCR amplification and sequencing of *sdhB*, *benA*, and *cyp51A* genes, as previously described [8, 36].

3. Results

3.1. Analysis of mutations in MMR genes in a collection of isolates

We previously performed a whole genome sequencing analysis using a collection of 163 *A. fumigatus* genomes, from which a phylogenetic tree was built [Garcia-Rubio et al., 2018]. In that analysis, the strains grouped in four different clusters in which azole-resistant strains were located in clusters I and II (Fig 2).

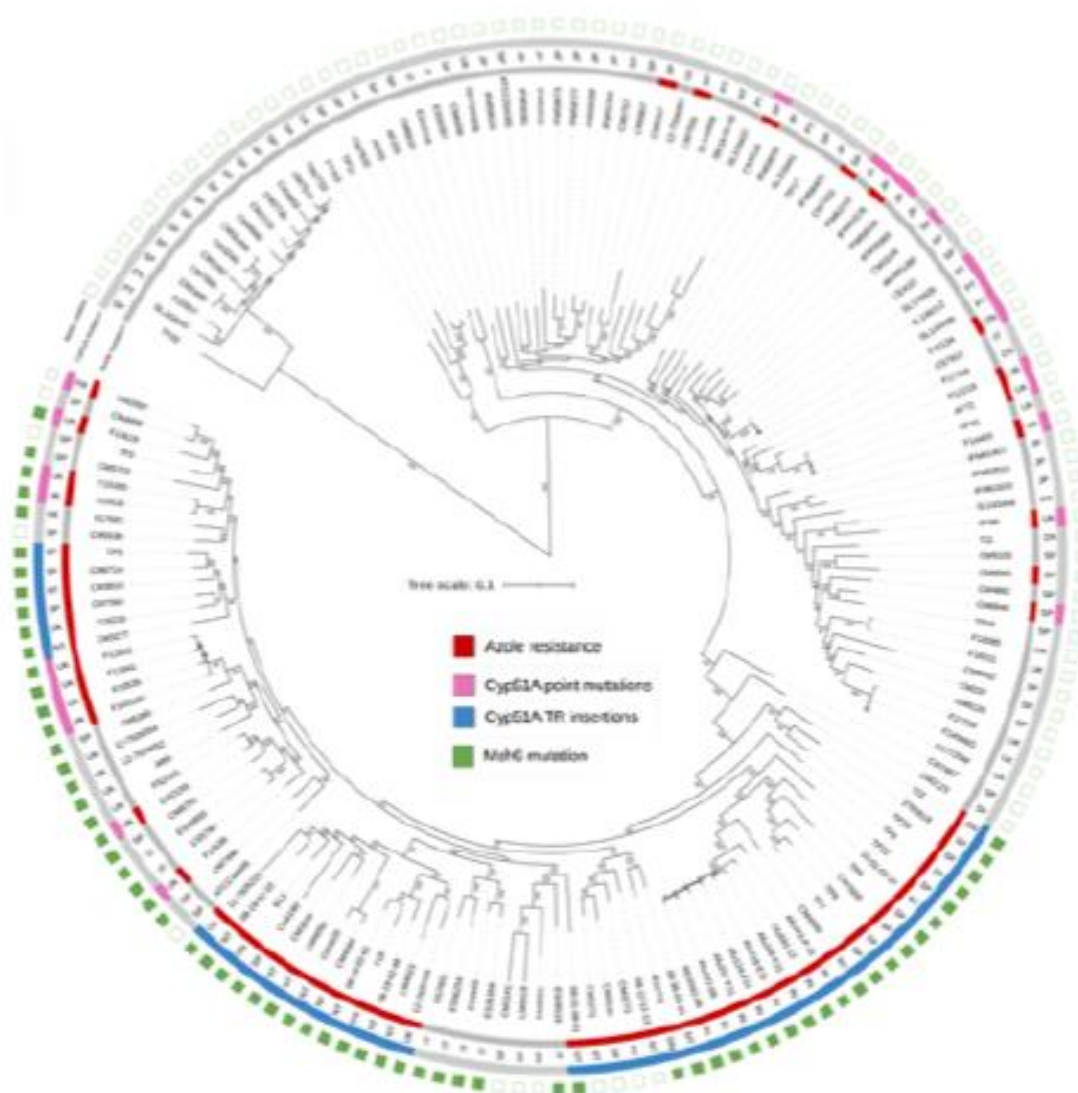


Fig. 2. Phylogenetic tree derived from whole genome sequencing of 163 *A. fumigatus* strains.

In blue, strains with TR34/L98H mutations; in green, Msh6 mutation (G240A).

Azole-resistant strains with point mutations in *cyp51A* were distributed among clusters I and II, while TR resistance mechanisms were only located in three subclusters within cluster II that only contained TR strains. In the present study, the MMR genes, *msh6*, *msh2*, *pms1* and *mlh1* were analyzed in the *A. fumigatus* genome collection. The mutations detected in these genes are shown in Table 1 together with the percentage of strains harboring them. The analysis showed that genes *msh2*, *pms1*, and *mlh1* have low genetic variability and do not seem to correlate with azole drug resistance. Several point mutations

were found in all genes. However, most of them were cluster related and more likely representative of the clade.

Table 1. Mutations detected in the WGS analysis of *msh6*, *msh2*, *pms1* and *mlh1* and percentage of strains harboring them. Mutation G240A, in bold, was the most prevalent.

Gene (Gene code)	Mutations	% of strains
<i>msh6</i> (Afu4g08300)	A55V	0.62
	V118A	0.62
	D121E	0.62
	G178A	1.86
	I183R	10.56
	G240A	42.86
	N289S	2.48
<i>msh2</i> (Afu3g09850)	A45T	3.73
	P329T	3.73
	E467D	0.62
	E812G	1.24
	A889E	0.62
<i>pms1</i> (Afu2g13410)	G286C	0.62
	P401A, V438A, K464R, Q611E, E87K, E760K	4.35
	E444G	2.48
	S758Y	1.24
	D1013Y	0.62
<i>mlh1</i> (Afu5g11700)	K310R	4.35
	S368N	4.35
	I510T	1.86
	A641S	4.35

Remarkably, a mutation in *msh6* leading to the substitution of a glycine (G) for an alanine (A) in position 240 (G240A) of the Msh6 protein was found in 42.8 % of the isolates, and only present in strains from cluster II. Moreover, almost all the strains harboring the TR₃₄/L98H azole resistance mechanism also had the G240A Msh6 mutation (Figure 2).

3.2. Construction and phenotypic characterization of *A. fumigatus* Δ *msh6* strains

As such a high proportion of the G240A-Msh6 mutation was detected (42%), mainly in azole resistant strains, we decided to investigate the potential contribution of *msh6* to the development of drug resistance in *A. fumigatus*. To this end, we deleted the entire *msh6* gene in the *akuB*^{KU80} strain. To eliminate the possibility of secondary mutations occurring during the construction of the knockout strains, we selected two independent biological replicate transformants to pursue all our phenotypic analyses (strains T3 and T6). To confirm the *msh6* gene deletion, the region was amplified and sequenced, confirming that the *ptrA* gene had replaced the *msh6* gene correctly. Both Δ *msh6* mutants were

morphologically indistinguishable from the parental strain, regarding macroscopic and microscopic morphology as well as colony radial growth (results not shown), demonstrating that *msh6* is not required for normal growth.

3.3. Deletion of *msh6* does not influence *A. fumigatus* azole susceptibility

E-tests were performed using ITC, VCZ and PSZ in both the $\Delta msh6$ and the *akuB^{KU80}* strains (Figure B1). Microdilution susceptibility assays were also performed with ITC, VCZ, PSZ and isavuconazole (IVZ). There was no difference in the MIC profile of the $\Delta msh6$ strains when compared with the parental strain (Table 2) showing that the deletion of *msh6*, in itself, has no direct impact in azole susceptibility.

Table 2. MIC ranges (EUCAST) to azole drugs for *akuB^{KU80}* and $\Delta msh6$ *A. fumigatus* strains

Strains	MIC ranges (mg/L)			
	ITC	VCZ	PSZ	IVZ
<i>akuB^{KU80}</i>	1 - 1	0.5 - 0.5	0.125 - 0.25	1 - 1
$\Delta msh6$ T3	0.5 - 1	0.5 - 1	0.125 - 0.25	0.5 - 1
$\Delta msh6$ T6	0.5 - 1	0.5 - 0.5	0.25 - 0.25	1 - 1

3.4. Deletion of *msh6* does not influence *A. fumigatus* virulence

To determine whether there were any differences in virulence between WT strain and $\Delta msh6$ mutants, the *Galleria mellonella* alternative model of infection was used. *A. fumigatus* $\Delta msh6$ mutants had similar virulence compared to their *akuB^{KU80}* parental strain with both 10^3 and 10^4 conidia/larvae as inoculum size (Figure 4).

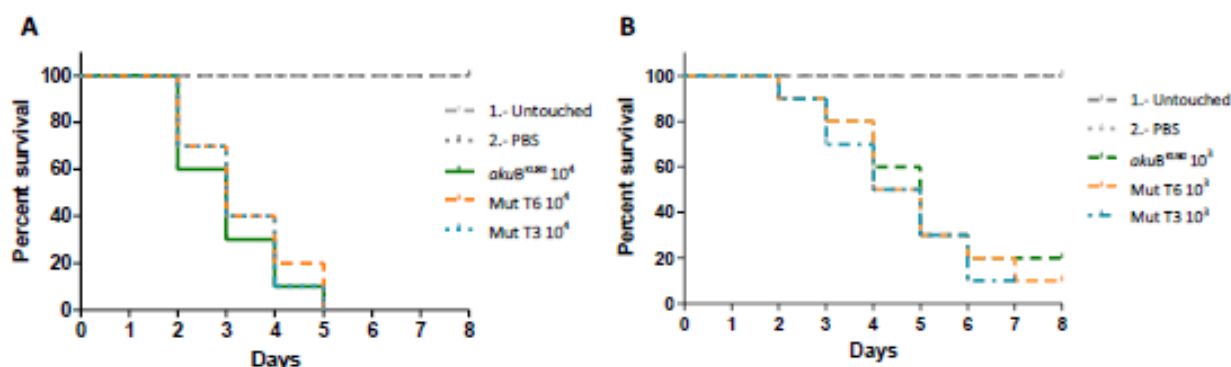


Figure 4. Survival curves of *G. mellonella* larvae inoculated with *akuB^{KU80}* and the $\Delta msh6$ (T3 and T6) *A. fumigatus* strains using 10^4 (A) and of 10^3 (B) conidia/larvae inocula. 20 larvae per isolate and group were used. Control groups, include untouched larvae, and larvae inoculated only with PBS. The experiment was repeated independently three times.

3.5. Deletion of *msh6* does not influence *A. fumigatus* growth in different stress conditions

Strains were subjected to growth at a range of different temperatures (37°C, 45°C, 50°C and 60°C) showing no differences between the parental and the $\Delta msh6$ strains. Strains were also subjected to oxidative stress with menadione at 0.04 mM and 0.05 mM as well as

cell wall stress with Congo Red at 10-25-50 µg/ml and Calcofluor white 10-100 µg/ml. No differences were observed in any of the conditions tested (data not shown).

3.6. Effects of $\Delta msh6$ deletion on *A. fumigatus* antifungal resistance development.

3.6.1. Development of resistance to azole drugs

A total of 109 conidia of the parental strain (akuB^{KU80}) and the $\Delta msh6$ strains (T3 and T6) were plated on high concentrations of three azole drugs: VCZ, PSZ, and PRZ. Derived mutant colonies were only found on MM + 2mg/L PSZ. There were no significant differences in the number of mutants obtained from each $\Delta msh6$ independent mutant (T3: 4.8 +/- 2.08; T6: 2.66 +/- 0.58) and the parental strain (3.75 +/- 4.5) in three independent experiments (p=0.8, one way ANOVA con Dunnett's multiple comparisons). No mutants grew on any plate containing VCZ or PRZ.

3.6.2. Development of resistance to non-azole drugs

Conidia of the parental strain (akuB^{KU80}), and both $\Delta msh6$ strains (T3 and T6), were plated on high concentrations of three non-azole antifungal drugs commonly used in crop protection, They all belong to different antifungal families, and target different genes.

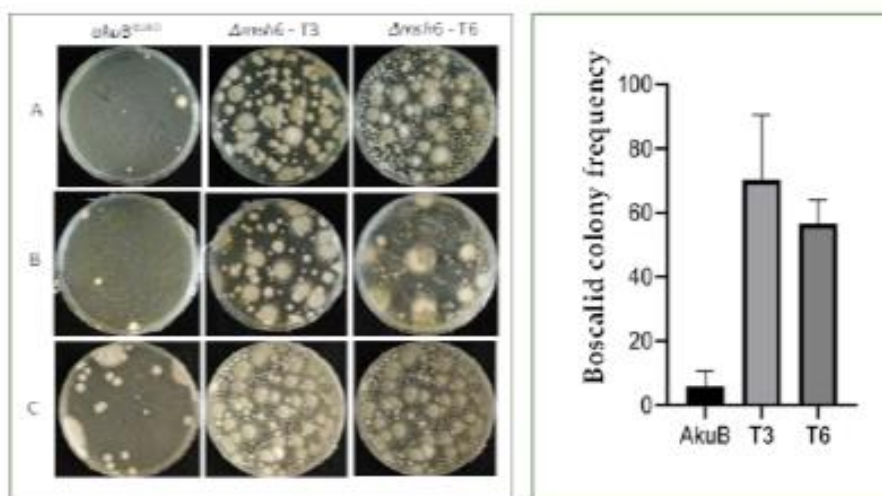


Figure 5. A. *akuB^{KU80}* and $\Delta msh6$ mutant strains (1×10^9 conidia) after 32 mg/L BCL exposure in MM incubated for 7 days at 37°C. Three independent experiments A, B and C (Left panel). B. CFUs grown in boscalid supplemented media. p<0.001 (one way ANOVA con Dunnett's multiple comparisons) (Right panel).

BCL was selected as the representative drug for SDHIs, BNY for MBCs and AZB for QoIs. Deletion of *msh6* in *A. fumigatus* led to the growth of significantly more resistant colonies after selection on BCL (WT: 5.8 + 4.85; T3: 70.1 + 20.48; T6: 56.6 + 7.23) and BNY (WT: 5.3 + 2.31; T3: 12 + 5.65; T6: 25 + 5.29). Antifungal selection revealed that the $\Delta msh6$ strains generated 10- and 2-fold more BCL- and BNY- resistant mutants, respectively,

when compared with the parental strain (Figure 5). No resistant mutants were obtained on AZB.

3.7. Genetic analysis of drug target genes

Analysis of the *cyp51A*, *benA* and *shdB* polymorphisms and amino acid substitutions found in our chosen set of 123 *A. fumigatus* mutant strains are shown in Table 3. All PSZ mutants were subjected to PCR amplification and sequencing of *cyp51A*. Cyp51A analysis revealed a substitution of a glycine (G) in position 54 for tryptophan (W) in 55 strains, and arginine (R) in 1 strain. Both mutations have been previously associated with high resistance to long-tailed azole drugs, such as PSZ [37, 38].

Table 3. Analysis of the *cyp51A*, *benA*, and *shdB* polymorphisms and amino acid substitutions found in our set of 123 *A. fumigatus* *msh6* mutant strains. Only polymorphisms involving non-synonymous mutations are shown. In bold amino acid substitutions that have been previously found in resistant strains.

Gene	Nucleotide position (cDNA)	Codon	Amino acid change	<i>aknB</i> ^{KU80}	Δ <i>msh6</i> -T3	Δ <i>msh6</i> -T6
<i>cyp51A</i>	g160t	Ggg/Tgg	G54W	16	31	8
	g160a	Ggg/Agg	G54R	0	1	0
<i>benA</i>	a593c	gAg/gCg	E198A	0	0	1
	g592c	Gag/Cag	E198Q	0	0	0
	g592a	Gag/Aag	E198K	0	8	0
	g594c	gag/gaC	E198D	0	3	3
	a593c	gAg/gTg	E198V	0	1	0
	a593g	gAg/gGg	E198G	2	0	0
	t599a	tTc/tCc	F200S	0	10	2
	t599a	tTc/tAc	F200Y	0	0	0
<i>shdB</i>	a809t	cAc/cTc	H270L	0	9	3
	c808t	Cac/Tac	H270Y	3	7	7
	a809g	cAc/cGc	H270R	0	8	0

Over 99 % of boscalid selected colonies displayed high-level of resistance to BCL (MICs >32 µg/ml) and 100% of them (37/37) had a mutation in the target gene (Table 3). PCR amplification and sequencing of these 37 BCL resistant isolates revealed an amino acid substitution of a histidine (H) in position 270 for leucine (L) in 12 strains, tyrosine (Y) in 17 strains, and arginine (R) in 8 strains, which seems to be associated with resistance to BCL.

All benomyl selected colonies displayed high-level of resistance to BNY (MICs >32 µg/ml). PCR amplification and sequencing of the *benA* gene was performed for all 30 *A. fumigatus* BNY resistant strains showing substitutions of a glutamic acid (E) for six different amino acids including alanine (A) in 1 strain, lysine (K) harboured by 8 strains, aspartic acid (D) in 6 strains, valine (V) in 1 strain or glycine

(G) harboured by 2 strains. Lastly, the amino acid substitution of a phenylalanine (F) 319
for a serine (S) in position 200 was present in 12 isolates. 320

4. DISCUSSION 321

The worldwide emergence of *A. fumigatus* azole resistance is an important 322
concern in the management of pathologies caused by this important fungal pathogen 323
[3, 9, 39]. In the agricultural setting, *A. fumigatus*, together with other fungal plant 324
pathogens, are exposed to selective pressure of DMI drugs and to non-azole 325
antifungals such as QoIs, SDHIs or MBCs, used to protect crops. In this setting, 326
multiresistant fungal strains are presumably being selected due to mutations on their 327
respective targets, *cyp51A*, *cytB*, *sdhB* and *benA* genes [8,14-17]. Based on a previous 328
A. fumigatus WGS analysis [18], we found that all genomes harboring the TR₃₄/L98H 329
Cyp51A alleles were grouped into three sub-clusters that included resistance to non- 330
azole antifungals. We hypothesized that genome instability could be a potential 331
cause for the development of azole resistance in *A. fumigatus*, related to the 332
phenomenon of multi drug resistance, as has been suggested before [19, 20]. One of 333
the pathways that recognizes and repairs mistakes and instabilities during DNA 334
replication is the MMR system [25, 40], a well conserved pathway among the phylum 335
Ascomycota [41]. It has been reported that deficiencies in MMR genes alter the proper 336
function of this pathway leading to errors in the reparation of mutations during cell 337
replication [21]. In this study, we investigated four *A. fumigatus* MMR genes: *msh2*, 338
msh6, *pms1* and *mlh1* to evaluate their possible implication in genetic instability and 339
thus their potential contribution to the development of antifungal resistance. Among 340
the MMR genes selected, *msh6* stands out as the gene that harbours the most 341
prevalent mutation, G240A, present in 42.8 % of the strains analyzed. We observed 342
msh6 variants in clinical and environmental *A. fumigatus* isolates investigated, which 343
contrasts with the 18.2% *msh2* variants found in *A. fumigatus* clinical isolates reported 344
previously [20]. Interestingly, we observed that all *msh6* variants grouped together 345
within Cluster II and, moreover, most of these strains also harboured a TR₃₄/L98H 346
azole resistance mechanism and several mutations leading to non-azole fungicide 347
resistance [8]. Based on this, we speculated that mutations in *msh6* could 348
contribute, to some extent, to the development of antifungal drugs multiresistance. 349

To evaluate the contribution of Msh6 with mutation development we deleted 350
the *msh6* gene in an *A. fumigatus* azole susceptible wild-type strain. Two Δ *msh6* 351
independent transformants, T3 and T6, were phenotypically characterized and 352
compared to their parental strain (*aktB*^{KLU80}). The phenotypic characterization 353
performed did not disclose any difference in growth under various cell stresses, 354
antifungal azole susceptibility or virulence in the alternative *Galleria mellonella* 355
animal model of infection. These results contrast with those previously obtained for 356
A. fumigatus *msh2* null mutants, which showed a reduction in virulence compared to 357
the same parental strain [20]. However, our results are in consonance with studies in 358
Candida glabrata and *Cryptococcus neoformans*, which demonstrated levels of 359
360

colonization and infection of *msh2* null mutants similar to those of the corresponding wild-type strains [21, 42, 43].

The deletion of *msh6* does not seem to cause a decrease in fitness. On the other hand, the abundance of strains found with mutations in *msh6* among clinical strains suggests that these changes could provide some benefits. Therefore, the potentially increased adaptative capacity to different situations, such as antifungal exposure or host immune system attack, could provide a benefit in certain conditions [27, 44–47]. Because all *msh6* mutated strains were located in a specific cluster, we decided to investigate if an alteration of the MMR pathway functions could derive in a mutator phenotype, with an increased mutation rate in comparison with their parental strain [29].

Since the development of antifungal resistance involves a major problem in the management and treatment of fungal infections, the implication of hypermutator strains has been studied in different human pathogens as well as the induction of antifungal resistance in *in vitro* conditions [20, 48]. To evaluate the implications of the *msh6* deletion in antifungal resistance development, we grew $\Delta msh6$ isolates and their parental strain (*akt1B^{KU80}*) under the pressure of azole and non-azole antifungal drugs. Azole drugs selection derived in mutant colonies which grew only on agar plates supplemented with PSZ, and not with VCZ or PCZ. However, the number of mutated isolates originated by *msh6* null mutants did not differ significantly from those of the wild type strain. Previous studies in other fungal pathogens showed mixed results regarding the implication of MMR genes in the development of azole resistance. In *Candida albicans*, the lack of MSH2 protein has been associated with an increment in the frequency of fluconazole resistant colony isolation [23]. However, the role of mutations in MSH2 in *C. glabrata* remains unclear considering that several studies did not find an association between *C. glabrata* isolates harboring MSH2 mutations and the acquisition of azole or echinocandin resistance [43, 49]; Nevertheless, other studies have reported the possible promotion of antifungal resistance due to the presence of mutations in MSH2 in *C. glabrata*. This could be possible if the MMR performed a limited and specific role in the acquisition of resistance to antifungals, as it is the case of *C. glabrata* [42]. Concerning the genus *Cryptococcus*, a study on MMR in *C. neoformans* demonstrated that the deficiency of MSH2, MLH1 and PMS1 triggered a faster development of resistance to antifungals, as fluconazole resistant colonies were isolated [21]. Lastly, it has been previously reported that the loss of the *msh2* gene in *A. fumigatus* is directly related to the development of resistant isolates after the exposure to posaconazole [20].

In our study, the analysis of mutation frequencies of *A. fumigatus* $\Delta msh6$ strains showed that the loss of *msh6* results in an increase in mutation rates in genes that confer resistance to the non-azole fungicides BCL and BNY. The $\Delta msh6$ mutants produced 10- times more BCL-resistant isolates, and 2- times more BNY-resistant isolates than the parental strain. Apart from the increased mutated rates obtained under these non-azole fungicide, a greater variety of amino acid substitutions were

selected. Under BNY pressure the most common β -tubulin *A. fumigatus* mutations E198A/Q/ and F200Y were identified in the selected mutants, as well as other mutations such as E198K/D/V/G, and F200S that have never been reported in *A. fumigatus* environmental isolates [8, 11, 12]. Similarly, under BCL pressure the common H270Y/R *sdhB* field mutations were identified in the laboratory mutants, together with H270S that have never been reported in *A. fumigatus* environmental isolates [8, 11]. This finding is in consonance with previous studies that reports that laboratory mutagenesis generates a wide variety of mutations, of which only a subset will be reported in the field [50].

However, we did not find mutants resistant to azole drugs other than posaconazole which makes us wonder whether this finding could be related to the conditions of the mutagenesis assay (very different of what happens in nature) or to additional mechanisms necessary to develop other mutations related to the azoles resistance. In addition, the multiple mutations in promoter and coding sequences of *cyp51A* responsible for multiazole resistance (TR₃₄/L98H or TR₄₆/Y121F/T289A) likely occur in natural environments in a 2 or 3-step sequential process, as it is known that single mutations (TR₃₄ or L98H separately and TR₄₆ or Y121F separately) slightly increase the MIC but do not confer complete resistance [36, 51]. Therefore, it would not be possible to isolate these mutants in one step with the high level of drug used.

5. Conclusions

The results obtained in this study support the hypothesis that the acquisition of antifungal resistance in *A. fumigatus* could -at least- partially be, driven by the genetic instability caused by alterations in the MMR. This hypothesis is also supported by similar findings reported in other fungal species, including *A. fumigatus* [20, 21, 23, 42]. Hence, all evidence suggests that an *A. fumigatus* hypermutator phenotype could provide an advantage in drug exposed environments, without being detrimental to its fungal fitness or virulence.

Author Contributions: Conceptualization, EM, LAF; methodology, JL, AR and IGJ, and; software, validation, JA and LAF.; formal analysis, IGJ, JL, LAF; investigation, IGJ, JL; resources, EM; data curation, IGJ, JA and LAF; writing—original draft preparation, JL, IGJ, LAF and EM; writing—review and editing, JA, LAF and EM; visualization, all; supervision, EM; project administration, EM; funding acquisition, EM. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI21CIII/00028). J. Lucio held a pre-doctoral fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria (F17CIII/00037). This Research is also supported by the Center for Biomedical Research in Infectious Diseases (CIBERINFEC-CB21/13/00105) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain.

Ethical review Committee approval: Not applicable.

Data Availability Statement: All strains constructed in this study are available upon request. All data necessary for confirming the conclusions presented in article are represented fully within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Appendix A

Table S1. Origin, year of isolation and geographical origin of the strains used in the NGS analysis. Mutations of the genes described in this work

Table S2. Primers for the construction of the $\Delta msh6$ deletion cassette.

Table S3. Primers used for sequencing of the $\Delta msh6$ deletion cassette

Appendix B.

Figure B1. Azole susceptibility tests (E-tests) performed on the *akuB^{KU80}* strain and the $\Delta msh6$ *A. fumigatus* strains T3 and T6.

References

- Patterson, T. F., Thompson, G. R., Denning, D. W., Fishman, J. A., Hadley, S., Herbrecht, R., Kontoyiannis D.P., Marr K. A., Morrison V.A., Nguyen M. H., Segal B.H., Steinbach W. J., Stevens D. A., Walsh T. J., Wingard. J. R., Young J.-A. H. Bennett, J. E. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, **2016**, 63(4), e1–e60. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>
- Verweij, P. E., Ananda-Rajah, M., Andes, D., Arendrup, M. C., Brüggemann, R. J., Chowdhary, A., Cornely, O.A., Denning, D.W., Groll, A.H., Izumikawa, K., Kullberg, B.J., Lagrou, K., Maertens, J., Meis, J.F., Newton, P., Page, I., Seyedmousavi, S., Sheppard, D.C., Viscoli, C., Warris, A., Donnelly, J. P. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resistance Updates*, **2015**, 21–22, 30–40. <http://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.001>
- Latgé, J.P.; Chamilos, G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *33*, e00140-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>
- Lepesheva, G. I., & Waterman, M. R. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, 1770(3), 467–477. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.018>
- Garcia-Rubio, R., Gonzalez-Jimenez, I., Lucio, J., & Mellado, E. *Aspergillus fumigatus* Cross-Resistance between Clinical and Demethylase Inhibitor Azole Drugs. *Applied and Environmental Microbiology*, **2021**, 87(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02539-20>
- Snelders, E., Huis In 't Veld, R.A.G., Rijs, A.J.M.M., Kema, G.H.J., Melchers, W.J.G., & Verweij, P.E. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Applied and Environmental Microbiology*, **2009**, 75(12), 4053–4057. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-09>
- Zhang, J., van den Heuvel, J., Debets, A.J.M., Verweij, P.E., Melchers, W.J.G., Zwaan, B.J., & Schoustra, S. E. Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **2017**, 284(1863), 20170635. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0635>

8. Gonzalez-Jimenez, I., Garcia-Rubio, R., Monzon, S., Lucio, J., Cuesta, I., & Mellado, E. Multiresistance to nonazole fungicides in *Aspergillus fumigatus* TR34/L98H Azole-resistant isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2021**, *65*(9). <https://doi.org/10.1128/AAC.00642-21>
9. Garcia-Rubio, R., Cuenca-Estrella, M., & Mellado, E. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs*, **2017**, *77*(6), 599–613. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0714-4>
10. Chowdhary, A., Sharma, C., & Meis, J. F. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, **2017**, *216* (suppl_3), S436–S444. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix210>
11. Fraaije, B., Atkins, S., Hanley, S., Macdonald, A., & Lucas, J. The Multi-Fungicide Resistance Status of *Aspergillus fumigatus* Populations in Arable Soils and the Wider European Environment. *Frontiers in Microbiology*, **2020**, *11*(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.599233>
12. Kang S.E., Sumabat L.G., Melie T., Mangum B., Momany M., Brewer M.T. Evidence for the agricultural origin of resistance to multiple antimicrobials in *Aspergillus fumigatus*, a fungal pathogen of humans, *G3 (Bethesda)*. **2022**, *12*(2):jkab427. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab427>
13. Hahn, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, **2014**, *7*(4), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
14. Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., & Gisi, U. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science*, **2006**, *62*(6), 465–472. <https://doi.org/10.1002/ps.1236>
15. Veloukas, T., Kalogeropoulou, P., Markoglou, A. N., & Karaoglanidis, G. S. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations. *Phytopathology*, **2014**, *104*(4), 347–356. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0208-R>
16. Sierotzki, H., & Scalliet, G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*, **2013**, *103*(9), 880–887. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW>
17. Vela-Corcía D, Romero D, de Vicente A, Pérez-García A. Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. *Sci Rep*. **2018**;8(1):7161. doi: 10.1038/s41598-018-25336-5.
18. Garcia-Rubio, R., Monzon, S., Alcazar-Fuoli, L., Cuesta, I., & Mellado, E. Genome-wide comparative analysis of *Aspergillus fumigatus* strains: The reference genome as a matter of concern. *Genes*, **2018**, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/genes9070363>
19. dos Reis, T.F., Silva, L.P., de Castro, P.A., Almeida de Lima, P B., do Carmo, R.A., Marini, M.M., da Silveira, J.F., Ferreira, B.H., Rodrigues, F., Malavazi, I., Goldman, G.H. The Influence of Genetic Stability on *Aspergillus fumigatus* Virulence and Azole Resistance. *G3 (Bethesda)*. **2018**,*8*(1):265-278. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300265>
20. dos Reis, T.F., Silva, L.P., de Castro, P.A., do Carmo, R.A., Marini, M.M., da Silveira, J.F., Ferreira, B.H., Rodrigues, F., Lind, A.L., Rokas, A., Goldman, G.H. The *Aspergillus fumigatus* Mismatch Repair MSH2 Homolog Is Important for Virulence and Azole Resistance. *mSphere*. **2019**, *4*(4):e00416-19. doi: 10.1128/mSphere.00416-19.
21. Boyce, K. J., Wang, Y., Verma, S., Shakya, V. P. S., Xue, C., & Idnurm, A. Mismatch repair of DNA replication errors contributes to microevolution in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *MBio*, **2017**, *8*(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00595-17>

22. Byun, S. A., Won, E. J., Kim, M. N., Lee, W. G., Lee, K., Lee, H. S., Uh, Y., Healey, K.R., Perlin, D.S., Choi, M.J., Kim, S.H., Shin, J. H. Multilocus sequence typing (MLST) genotypes of *Candida glabrata* bloodstream isolates in Korea: Association with antifungal resistance, mutations in mismatch repair gene (Msh2), and clinical outcomes. *Frontiers in Microbiology*, **2018**, 9(JUL), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01523>
23. Legrand, M., Chan, C. L., Jauert, P. A., & Kirkpatrick, D. T. Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, **2007**, 6(12), 2194–2205. <https://doi.org/10.1128/EC.00299-07>
24. Chatterjee, N., Walker, G-C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. **2017**, 58(5):235-263. doi: 10.1002/em.22087
25. Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., & Modrich, P. L. (2006). DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chemical Reviews*, **2006**, 106(2), 302–323. <https://doi.org/10.1021/cr0404794>
26. Larrea, A. A., Lujan, S. A., & Kunkel, T. A. SnapShot: DNA Mismatch Repair. *Cell*, **2010** 141(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.002>
27. Boyce, K. J. Mutators Enhance Adaptive Micro-Evolution in Pathogenic Microbes. *Microorganisms*, **2022**, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020442>
28. Phillips, M. A., Steenwyk, J. L., Shen, X. X., & Rokas, A. Examination of Gene Loss in the DNA Mismatch Repair Pathway and Its Mutational Consequences in a Fungal Phylum. *Genome Biology and Evolution*, **2021**, 13(10), 1–12. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab219>
29. Gambhir, N., Harris, S.D., Everhart, S.E. Evolutionary Significance of Fungal Hypermutators: Lessons Learned from Clinical Strains and Implications for Fungal Plant Pathogens. *mSphere*. **2022**, 7(3):e0008722. doi: 10.1128/msphere.00087-22.
30. Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., & Rodriguez-Tudela, J. L. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2008**, 52(4), 1244–1251. <https://doi.org/10.1128/AAC.00942-07>
31. Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A., Oakley, B.R. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc*. **2006**, 1(6):3111-20. doi: 10.1038/nprot.2006.405
32. Gomez-Lopez, A., Forastiero, A., Cendejas-Bueno, E., Gregson, L., Mellado, E., Howard, S. J., Livermore, J.L., Hope, W.W., Cuenca-Estrella, M. (2014). An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: the role of azole resistance. *Medical Mycology*, **2014**, 52(3), 311–319. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt022>
33. Pfaller, J.B., Messer, S.A., Hollis, R.J., Diekema, D.J., & Pfaller, M.A. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. *Journal of Clinical Microbiology*, **2003**, 41(3), 1126–1129. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1126-1129.2003>
34. Guinea, J., Meletiadis, J., Arikan-Akdagli, S., Kahlmeter, G., Arendrup, M. C., & (EUCAST), S. on A. S. T. (AFST) of the E. E. C. for A. S. T. (2022). EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.4 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for coridia forming moulds. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_EDef_9.4_method_for_susceptibility_testing_of_moulds.pdf
35. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2020). Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0, 2020. *Eucast*, (April), 0–8. Retrieved from <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals>

36. Mellado, E., Garcia-Effron, G., Alcázar-Fuoli, L., Melchers, W. J. G., Verweij, P. E., Cuenca-Estrella, M., & Rodríguez-Tudela, J. L. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, *51*(6), 1897–1904. <https://doi.org/10.1128/aac.01092-06>
37. Maru, P.A., Parmegiani, R.M., Wei, S.Q., Mendrick, C.A., Li, X., Loebenberg, D., DiDomenico, B., Hare, R.S., Walker, S.S., McNicholas, P.M. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14alpha-demethylase. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**, *47*(2):577-81. doi: 10.1128/AAC.47.2.577-581.2003.
38. Espinel-Ingroff A., Turnidge, J., Alastruey-Izquierdo, A., Dannaoui, E., Garcia-Effron, G., Guinea, J., Kidd, S., Pelaez, T., Sanguinetti, M., Meletiadis, J., Botterel, F., Bustamante, B., Chen, Y.C., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., Chrystanthou, E., Córdoba, S., Gonzalez, G.M., Guarro, J., Johnson, E.M., Kus, J.V., Lass-Flörl, C., Linares-Sicilia, M.J., Martín-Mazuelos, E., Negri, C.E., Pfaller, M.A., Tortorano, A.M. Posaconazole MIC Distributions for *Aspergillus fumigatus* Species Complex by Four Methods: Impact of cyp51A Mutations on Estimation of Epidemiological Cutoff Values. *Antimicrob Agents Chemother.* **2018**, *62*(4):e01916-17. doi: 10.1128/AAC.01916-17.
39. Warris, A. Azole-resistant aspergillosis. *Journal of Infection*, **2015**, *71*(S1), S121–S125. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.04.0235>
40. Gupta, D., & Heinen, C. D. The mismatch repair-dependent DNA damage response: Mechanisms and implications. *DNA Repair*, **2019**, *78*, 60–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.03.009>
41. Phillips, M.A., Steenwyk, J.L., Shen, X.X., Rokas, A. Examination of Gene Loss in the DNA Mismatch Repair Pathway and Its Mutational Consequences in a Fungal Phylum. *Genome Biol Evol.* **2021**, *13*(10):evab219. doi: 10.1093/gbe/evab219.
42. Healey, K. R., Zhao, Y., Perez, W. B., Lockhart, S. R., Sobel, J. D., Farmakiotis, D., Kontoyiannis, D.P., Sanglard, D., Taj-Aldeen, S.J., Alexander, B.D., Jimenez-Ortigosa, C., Shor, E., Perlin, D. S. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. *Nature Communications*, **2016**, *7*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms11128>
43. Bordallo-Cardona, M. Á., Agnelli, C., Gómez-Núñez, A., Sánchez-Carrillo, C., Bouza, E., Muñoz, P., Escribano, P., Guinea, J. MSH2 Gene Point Mutations Are Not Antifungal Resistance Markers in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2019**, *63*(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01876-18>
44. Billmyre, R. B., Clancey, S. A., & Heitman, J. (2017). Natural mismatch repair mutations mediate phenotypic diversity and drug resistance in *Cryptococcus deuterogattii*. *ELife*, **2017**, *6*, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.28802>
45. Buscaino, A. Chromatin-mediated regulation of genome plasticity in human fungal pathogens. *Genes*, **2019**, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/genes10110855>
46. Sundin, G. W., & Weigand, M. R. The microbiology of mutability. *FEMS Microbiology Letters*, **2007**, *277*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00901.x>
47. Verweij, P.E., Zhang, J., Debets, A.J.M., Meis, J.F., van de Veerdonk, F.L., Schoustra, S.E., Zwaan, B.J., Melchers, W.J.G. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management. *The Lancet Infectious Diseases*, **2016**, *16*(11), e251–e260. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30138-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30138-4)
48. Hokken, M.W J., Zwaan, B.J., Melchers, W.J.G., & Verweij, P. E. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **2019**, *132*, 103254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103254>

-
49. Singh, A., Healey, K. R., Yadav, P., Upadhyaya, G., Sachdeva, N., Sarma, S., Kumar, A., Tarai, B., Perlin, D.S., Chowdhary, A. Absence of azole or echinocandin resistance in *Candida glabrata* isolates in India despite background prevalence of strains with defects in the dna mismatch repair pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(6), 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00195-18>
50. Hawkins, N.J., Fraaije, B.A. Predicting Resistance by Mutagenesis: Lessons from 45 Years of MBC Resistance. *Front Microbiol.* 2016, 7:1814. doi: 10.3389/fmicb.2016.01814.
51. Snelders, E., Camps, S.M., Karawajczyk, A., Rijs, A.J., Zoll, J., Verweij, P.E, Melchers, W.J. Genotype-phenotype complexity of the TR46/Y121F/T289A cyp51A azole resistance mechanism in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol.* 2015, 82:129-35. doi: 10.1016/j.fgb.2015.06.001.

ANEXO VIII: Número de acceso en GenBank de las secuencias de Cyp51 (A, B y C) de *A. flavus*




Cepa	<i>cyp51s</i>	Nº acceso GenBank
CM7668	<i>cyp51A</i>	MT849811
CM8087	<i>cyp51A</i>	MT849810
CM8098	<i>cyp51A</i>	MT849809
CM9165	<i>cyp51A</i>	MT849808
CM9174	<i>cyp51A</i>	MT849807
CM9189	<i>cyp51A</i>	MT849806
CM9195	<i>cyp51A</i>	MT849805
CM9228	<i>cyp51A</i>	MT849804
CM9267	<i>cyp51A</i>	MT849803
CM9298	<i>cyp51A</i>	MT849802
CM9326	<i>cyp51A</i>	MT849801
CM9329	<i>cyp51A</i>	MT849800
CM9331	<i>cyp51A</i>	MT849799
CM9684	<i>cyp51A</i>	MT849798
TPH642	<i>cyp51A</i>	MT849797
TPH968	<i>cyp51A</i>	MT849796
TPH992	<i>cyp51A</i>	MT849795
TPH1004	<i>cyp51A</i>	MT849794
TPH1115	<i>cyp51A</i>	MT849793
TPH1179	<i>cyp51A</i>	MT849793
ATCC2004304	<i>cyp51A</i>	MT849812
CM7668	<i>cyp51B</i>	MT849771
CM8087	<i>cyp51B</i>	MT849772
CM8098	<i>cyp51B</i>	MT849773
CM9165	<i>cyp51B</i>	MT849774
CM9174	<i>cyp51B</i>	MT849775
CM9189	<i>cyp51B</i>	MT849776
CM9195	<i>cyp51B</i>	MT849777
CM9228	<i>cyp51B</i>	MT849778
CM9267	<i>cyp51B</i>	MT849779
CM9298	<i>cyp51B</i>	MT849780
CM9326	<i>cyp51B</i>	MT849781
CM9329	<i>cyp51B</i>	MT849782
CM9331	<i>cyp51B</i>	MT849783
CM9684	<i>cyp51B</i>	MT849784
TPH642	<i>cyp51B</i>	MT849785
TPH968	<i>cyp51B</i>	MT849786
TPH992	<i>cyp51B</i>	MT849787
TPH1004	<i>cyp51B</i>	MT849788
TPH1115	<i>cyp51B</i>	MT849789
TPH1179	<i>cyp51B</i>	MT849790
ATCC2004304	<i>cyp51B</i>	MT849791
CM7668	<i>cyp51C</i>	MT853225
CM8087	<i>cyp51C</i>	MT853226
CM8098	<i>cyp51C</i>	MT853227
CM9165	<i>cyp51C</i>	MT853228
CM9174	<i>cyp51C</i>	MT853229

CM9189	<i>cyp51C</i>	MT853230
CM9195	<i>cyp51C</i>	MT853231
CM9228	<i>cyp51C</i>	MT853232
CM9267	<i>cyp51C</i>	MT853233
CM9298	<i>cyp51C</i>	MT853234
CM9326	<i>cyp51C</i>	MT853235
CM9329	<i>cyp51C</i>	MT853236
CM9331	<i>cyp51C</i>	MT853237
CM9684	<i>cyp51C</i>	MT853238
TPH642	<i>cyp51C</i>	MT853239
TPH968	<i>cyp51C</i>	MT853240
TPH992	<i>cyp51C</i>	MT853241
TPH1004	<i>cyp51C</i>	MT853242
TPH1115	<i>cyp51C</i>	MT853243
TPH1179	<i>cyp51C</i>	MT853244
ATCC2004304	<i>cyp51C</i>	MT853245

ANEXO IX: Artículo publicado

Article

Point Mutations in the 14- α Sterol Demethylase Cyp51A or Cyp51C Could Contribute to Azole Resistance in *Aspergillus flavus*

Jose Lucio ¹, Irene Gonzalez-Jimenez ¹ , Olga Rivero-Menendez ¹, Ana Alastruey-Izquierdo ^{1,2} , Teresa Pelaez ³, Laura Alcazar-Fuoli ^{1,2} and Emilia Mellado ^{1,2,*} 

¹ Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, 28220 Madrid, Spain; jose.lucio@isciii.es (J.L.); irene.gonzalez@isciii.es (I.G.-J.); olgariveromenendez@gmail.com (O.R.-M.); anaalastruey@isciii.es (A.A.-I.); lalcazar@isciii.es (L.A.-F.)

² Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/CIII/0004/0003), ISCIII, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

³ Hospital Universitario Central de Asturias, Fundación para la Investigación Biosanitaria del Principado de Asturias (FINBA), Oviedo, 33011 Asturias, Spain; mtpelaez@gmail.com

* Correspondence: emellado@isciii.es

Received: 9 July 2020; Accepted: 13 October 2020; Published: 17 October 2020



Abstract: Infections caused by *Aspergillus* species are being increasingly reported. *Aspergillus flavus* is the second most common species within this genus causing invasive infections in humans, and isolates showing azole resistance have been recently described. *A. flavus* has three *cyp51*-related genes (*cyp51A*, *cyp51B*, and *cyp51C*) encoding 14- α sterol demethylase-like enzymes which are the target of azole drugs. In order to study triazole drug resistance in *A. flavus*, three strains showing reduced azole susceptibility and 17 azole susceptible isolates were compared. The three *cyp51*-related genes were amplified and sequenced. A comparison of the deduced Cyp51A, Cyp51B, and Cyp51C protein sequences with other protein sequences from orthologous genes in different filamentous fungi led to a protein identity that ranged from 50% to 80%. Cyp51A and Cyp51C presented several synonymous and non-synonymous point mutations among both susceptible and non-susceptible strains. However, two amino acid mutations were present only in two resistant isolates: one strain harbored a P214L substitution in Cyp51A, and another a H349R in Cyp51C that also showed an increase of *cyp51A* and *cyp51C* gene expression compared to the susceptible strain ATCC2004304. Isolates that showed reduced in vitro susceptibility to clinical azoles exhibited a different susceptibility profile to demethylation inhibitors (DMIs). Although P214L substitution might contribute to azole resistance, the role of H349R substitution together with changes in gene expression remains unclear.

Keywords: *Aspergillus flavus*; Cyp51s; azole resistance mechanisms; azole drugs; DMIs fungicides

1. Introduction

Aspergillus spp. are opportunistic fungi that cause both allergic and invasive syndromes. The genus *Aspergillus* contains approximately 175 species, but only a few of them have been associated with human disease [1]. The primary route of infection is characterized by the inhalation of conidia which, due to their small size, easily reach the pulmonary alveoli and cause local and invasive infections [2]. Among the wide range of aspergillosis manifestations, invasive aspergillosis (IA) is the most severe one and is linked to high morbidity and mortality rates in immunocompromised patients [3–5]. Besides the risk of immunosuppressed patients to *Aspergillus* infections, sporadic cases of invasive aspergillosis on immunocompetent hosts have also been reported [6,7].

In general, aspergillosis is mainly caused by *Aspergillus fumigatus*, followed by *A. flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans* [8]. *A. flavus* has a wide environmental distribution favored by the formation of conidia that are highly tolerant to adverse conditions and is considered an important pathogen that is responsible for several diseases in humans [9]. In Spain, the FILPOP study reported *A. fumigatus* as the most frequently isolated species (48.5%), followed by *A. flavus* (8.4%), *A. terreus* (8.1%), *Aspergillus tubingensis* (6.8%), and *A. niger* (6.5%) [10]. An updated study in 2018 showed an increase in the frequency of isolation of *A. fumigatus* (52.74%), followed by *A. niger* (5.27%), *A. flavus* (5.07%), and *A. terreus* (4.67%) [11]. These species distribution can vary from country to country. For instance, *A. flavus* is more prevalent in Asia, Africa and the Middle East and it is considered the most frequent species causing aspergillosis in those areas [12]. Moreover, outbreaks associated with *A. flavus* appear to be produced by single or closely related strains, in contrast to those associated with *A. fumigatus* [9].

The first-line antifungal treatment against aspergillosis is broad-spectrum azole drugs, although polyenes and echinocandins are also included as alternative or salvage therapy, respectively [13]. Triazole drugs target the 14- α sterol demethylase (Cyp51), an enzyme that plays a key role in the ergosterol biosynthesis pathway [14]. However, the treatment of *Aspergillus* infections has recently become increasingly complicated because some species are developing resistance to antifungal drugs worldwide [15]. In *A. fumigatus*, the development of azole resistance has been mainly attributed to two different routes: (i) an in vivo or in-host acquisition that can happen after prolonged azole therapy and (ii) an acquisition in the environmental setting due to use of demethylation inhibitors (DMIs) fungicides which have a similar structure to clinical azoles implying cross-resistance between both of them [16,17]. Besides the clinical use of antifungals to treat *A. flavus* in human infections, the use of azoles in agriculture raises the concern about *A. flavus* azole resistance related to the use of this class of antifungals in the fields since it is also an important crop associated pathogen [18]. Fungicides are traditionally used to avoid food contaminations, such as *A. flavus* and other fungi that can be harmful for humans due to their ability to produce large amounts of mycotoxins [19].

In contrast to *A. fumigatus*, information regarding antifungal resistance mechanisms in *A. flavus* is relatively scarce. *A. fumigatus* has two Cyp51 isoenzymes, Cyp51A and Cyp51B [20]. Azole resistance in this fungus has been associated with the presence of several *cyp51A* point mutations and variations in the promoter [16]. An interesting difference between *A. flavus* and other *Aspergillus* species is the existence of a third Cyp51 protein, the Cyp51C [21]. Recently, *A. flavus* isolates with in vitro azole resistance have been described and azole resistance mechanisms in these strains are being analyzed. To date, different *A. flavus* Cyp51 point mutations have been described [22–26], however their role in azole resistance cannot be assumed since most of them were eventually described in azole susceptible strains. To date, only one point mutation (Y319H) in *A. flavus* Cyp51C seems to be related to azole resistance although it needs further confirmation [25].

The objective of this work was to sequence the three Cyp51 paralogues in several azole susceptible and resistant *A. flavus* clinical strains and to analyze the expression of the three genes during fungal growth. We also analyzed if the specific mutations found in each Cyp51 protein could be responsible for their resistance phenotype to azole drugs. The susceptibility of these *A. flavus* strains to different imidazoles and triazoles commonly used in crop protection was also tested and the hypothetical link between the development of resistance in agriculture and in the clinical setting for *A. flavus* isolates is discussed.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Molecular Identification

Twenty *A. flavus* isolates obtained from clinical samples were analyzed (Table 1). Fourteen strains belonged to the Mycology Reference Laboratory collection (CM) and six strains were obtained from the Hospital Universitario Central de Asturias (TP). Sample origin and year of isolation of all the *A. flavus*

isolates are displayed in Supplementary Table S1. *A. flavus* ATCC2004304 was used as reference strain. Conidia from each strain were cultured in GYEP liquid medium (0.3% yeast extract, 1% peptone; Difco, Soria Melguizo, Madrid, Spain) with 2% glucose (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain) for 24 h at 37 °C. After mechanical disruption of the mycelium by vortex-mixing with glass beads, genomic DNA of isolates was extracted using the phenol-chloroform method [27]. Molecular identification was performed by PCR amplifying and sequencing ITS1-5.8S-ITS2 regions and a portion of the β -tubulin gene [28].

2.2. Antifungal Susceptibility Testing (AFST)

Microdilution testing was performed according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standard methodology [29,30]. *A. fumigatus* ATCC2004305 and *A. flavus* ATCC2004304 were used as quality control strains. Antifungal agents used in the study were amphotericin B (AmB) (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain), itraconazole (ITC) (Janssen Pharmaceutica, Madrid, Spain), voriconazole (VRC) (Pfizer SA, Madrid, Spain), posaconazole (POS) (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ, USA), isavuconazole (ISV) (Basilea Pharmaceutica, Basel, Switzerland), terbinafine (TBR) (Novartis, Basel, Switzerland), caspofungin (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA), micafungin (Astellas Pharma, Inc., Tokyo, Japan), and anidulafungin (Pfizer SA, Madrid, Spain). The final concentrations tested ranged from 0.03 to 16 mg/L for amphotericin B, terbinafine, and caspofungin; from 0.015 to 8 mg/L for itraconazole, voriconazole, and posaconazole; from 0.008 to 4 mg/L for anidulafungin; and from 0.004 to 2 mg/L for micafungin. Microdilution plates were incubated at 35 °C for 48 h in a humid atmosphere. Visual readings were performed at 24 and 48 h with the help of a mirror. The endpoint for amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, isavuconazole, and terbinafine was the antifungal concentration that produced a complete inhibition of visual growth at 24 and 48 h (MIC). For the echinocandins, the endpoint was the antifungal concentration that produced a visible change in the morphology of the hyphae compared with the growth control well (minimum effective concentration (MEC)). EUCAST has set breakpoints for the interpretation of antifungal susceptibility testing results, although they have only been set for itraconazole and isavuconazole for *A. flavus* strains (MICs of ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ susceptible and > 1 –2 Resistant). EUCAST breakpoint values set for other antifungals for *A. fumigatus* strains were used as a reference but taking into account that the epidemiological cut-off values (ECOFFs) [31] established for *A. flavus* strains are one dilution higher than for *A. fumigatus*: 0.5 mg/L for posaconazole (POS), and 4 mg/L for voriconazole (VRC). Strains were selected for further study if they were ITC resistant (ITC MIC > 1 mg/L).

2.3. Susceptibility Testing to 14- α Sterol Demethylase Inhibitors (DMIs)

Two imidazole drugs, prochloraz and imazalil, and five triazole drugs, metconazole, tebuconazole, epoxiconazole, difenoconazole, bromuconazole and myclobutanil (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, Spain), that belong to the 14- α sterol demethylation inhibitors (DMIs) and are frequently used to protect crops, were tested following the EUCAST methodology. The final concentrations of each azole drug tested ranged from 0.06 to 32 mg/L. The plates were incubated at 35 °C for 48 h in a humid atmosphere. Visual readings were performed at 24 and 48 h with the help of a mirror. The endpoint for all of them was the antifungal concentration that produced a complete inhibition of visual growth at 24 and 48 h (MIC).

2.4. PCR Amplification and Sequence Analysis of the *cyp51A*, *cyp51B* and *cyp51C* Genes

The *cyp51A*, *cyp51B* and *cyp51C* genes, including their promoter region, were amplified and sequenced using the primers described in Supplementary Table S2. PCR conditions for amplification of each *cyp51* gene were described before [32] although the annealing temperature varied depending on the primer combination. Specific conditions for *cyp51A* amplification were 1 cycle of 5 min at 94 °C and then 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 54 °C for F1 and R1, 55 °C for F2 and R2, F3 and R3, F4 and

R4, 2 min at 72 °C and, finally, 5 min at 72 °C. Specific conditions for *cyp51B* amplification were 1 cycle of 5 min at 94 °C and then 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 60 °C for F1, and R4, 2 min at 72 °C and, finally, 5 min at 72 °C. The parameters used for *cyp51C* amplification were 1 cycle of 5 min at 94 °C and then 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 58 °C for 1_F and 2_R, 54 °C for 3_F and 4_R, 52 °C for 5_F and 6_R, 54 °C for 7_F and 8_R, 2 min at 72 °C and, finally, 5 min at 72 °C. To exclude the possibility that any change identified in the sequences was due to PCR-induced errors, each isolate was independently analyzed twice.

2.5. RNA Isolation, Reverse Transcription and Quantitative PCR (RT-qPCR)

The *A. flavus* inocula were added to 100 mL of minimal medium broth [33] reaching a final concentration of 10^6 /mL total conidia and grown 18 h at 150 rpm at 37 °C. Then, mycelium was harvested using a funnel and miracloth paper (Calbiochem[®], Merck Millipore, Spain). Mycelial samples were blot dried, frozen in liquid nitrogen, and ground to powder using a pestle and a mortar. RNA was isolated from mycelial powder by using an RNeasy plant minikit (Qiagen, Madrid, Spain) and following manufacturer's instructions. cDNA was obtained through reverse transcription using the commercial ImProm-IITM Reverse Transcription System kit (Promega, Madison, WI, USA). The PCR reaction mixture was prepared following manufacturer's instructions (1 µg of cellular RNA, 1 µg/mL of the primers (dT), 4.5 µL of RNase-free water, 4 µL of reaction buffer ImProm-II (5×), 4 µL of MgCl₂, 1 µL of dNTPs, 0.5 µL of the ribonucleases inhibitor, rRNasin[®] (Promega, Madison, WI, USA), and 1 µL of reverse transcriptase, ImProm-IITM (Promega, Madison, WI, USA), in a total volume of 20 µL. The reverse transcription was performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) by using the following program parameters: 5 min at 25 °C, 60 min at 42 °C, and 15 min at 70 °C. cDNA was diluted in RNase-free water (1:5) for qPCR.

Quantitative PCR (qPCR) was performed to determine the differences in relative expression of *cyp51* genes between azole resistant and azole susceptible *A. flavus* isolates. The *A. flavus* β -tubulin gene was used as housekeeping gene. Specific primers for the qPCR (Supplementary Table S2) were designed and PCR conditions were standardized and optimized for each primer pair. After cDNA synthesis, qPCR mixtures were carried out with SensiMix SYBR-Hi carboxy-X-rhodamine (Bioline, Barcelona, Spain). The PCR conditions were 10 min at 95 °C and 40 cycles of 10 s at 95 °C, 5 s at 58 °C, and 30 s at 72 °C. Each assay was conducted in triplicates with RNA isolated from two biological replicas. Fold changes of gene expression were calculated using the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method for individual time points and normalized to the β -tubulin gene [34]. Fold changes in gene expression were calculated relative to *cyp51A* of the ATCC20044304 strain.

2.6. Sequence Computer Analysis

All sequence analyses were carried out using DNASTAR software package, DNASTAR[™] Lasergene Genomics Suite Software, (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA). Nucleotide sequences were analyzed using EditSeq and SeqMan and the amino acid sequences of the putative 14- α demethylase Cyp51A, Cyp51B, and Cyp51C proteins were deduced from nucleotide sequences using SeqBuilder.

2.7. Phylogenetic Analysis

Phylogenetic trees were obtained by maximum likelihood analysis [35] using InfoQuest[™] FP software, version 4.5 (Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA, USA). Deduced proteins sequence of Cyp51A *A. flavus* NRRL3357 (NCBI accession number XP_002375123); *A. flavus* AF70=MYA-384/AF70, (NCBI accession number KOC13200); *Aspergillus oryzae* RIB40 (NCBI accession number XP_001819419), Cyp51B (*A. flavus* NRRL3357 (NCBI accession number XP_002379130); *A. flavus* AF70 (NCBI accession number KOC13803) and *A. oryzae* RIB40 (NCBI accession number XP_001822241) and Cyp51C *A. flavus* NRRL3357 (NCBI accession number XP_002383931); *A. flavus* AF70, (NCBI accession number KOC15064) and *A. oryzae* RIB40 (NCBI accession number XP_001824687) were compared with the amino acid sequences derived from Cyp51 proteins from other filamentous fungi, including other *Aspergillus* species,

Penicillium spp., *Fusarium* spp., and other plant pathogens: *A. fumigatus* AfCyp51A; (NCBI accession number AAK73659); *A. fumigatus* AfCyp51B (NCBI accession number AAK73660); *A. terreus* AtCyp51A (NCBI accession number EAU33678); *A. terreus* AtCyp51B (NCBI accession number EAU36124); *Fusarium graminearum* FgCyp51A (NCBI accession number ESU09049); FgCyp51B (NCBI accession number EWZ31250) and FgCyp51C (NCBI accession number ESU17718); *Fusarium oxysporum* FoCyp51A (NCBI accession number RKK94077), FoCyp51B (NCBI accession number EWY82136) and FoCyp51C (NCBI accession number EWY82136); *Penicillium italicum* PiCyp51 (NCBI accession number CAA89824); *Penicillium digitatum* PdCyp51 (NCBI accession number CAD277993); *Oculimacula yallundae* OyCyp51 (NCBI accession number AAG44831); *Oculimacula aciformis* OaCyp51 (NCBI accession number AAF18468); *Neurospora crassa* NcCyp51 (NCBI accession number EAA34813.); *Erysiphe necator* EnCyp51 (NCBI accession number AAD55135).

3. Results

3.1. Antifungal Susceptibility Testing

Using the EUCAST methodology, all *A. flavus* strains but three were susceptible to azole drugs tested, showing some strain-dependent variations (Table 1). Three strains (CM7668, CM8087 and CM9326) were considered resistant to azole drugs with three different susceptibility profiles. There were no major differences in susceptibility to amphotericin B (AmB) except for one strain (CM8087) that could be considered AmB resistant. No differences were found in susceptibility to either echinocandins or terbinafine (results not shown).

Table 1. Antifungal susceptibility profile of *A. flavus* isolates for various antifungal drugs. AmB, amphotericin B; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; POS, posaconazole; ISV, isavuconazole. In bold the *A. flavus* azole resistant strains. * Marked strains were previously tested in a preceding work [36].

Strains	MICs Ranges (mg/L)				
	AmB	ITC	VRC	POS	ISV
ATCC2004304	1	0.5	2	0.125	1
CM7668 *	0.5	>8	0.25	1–2	0.5
CM8087	8–>16	4–8	8	0.5	8
CM9165	1	0.25	0.5	0.125	0.25
CM9174	2	0.5–1	1–4	0.125–0.25	2–4
CM9189	1	0.5	1	0.25	1
CM9195	1	0.25	1	0.125	1
CM9228	1	0.5	0.5	0.25	2
CM9267	2	0.5	1	0.25	1
CM9298	1	0.5	1	0.125	1
CM9326 *	1–2	4–8	8	1–2	>8
CM9329	2	0.5	1	0.25	1
CM9331	1	0.5	1	0.25	2
CM9684	0.5	1	>8	0.25	2
TP642	1	1	2	0.25	2
TP968	1	1–2	4	0.5–1	4
TP992	1	0.5	2	0.25	1
TP1004	1	1	4	0.5	4
TP1115	1	1	4	0.5	4
TP1179	1	1	4	0.5	4

Note: Isolates with ITC MIC > 1 mg/L were considered resistant and selected for further studies.

3.2. Susceptibility Testing to 14- α Sterol Demethylase Inhibitors (DMIs) Fungicides

A. flavus susceptibility to each DMI antifungal drug is presented in Table 2. All strains but three exhibited MIC values to DMI fungicides similar to those of the *A. flavus* wild type strain (ATCC2004304), which is considered as a reference strain for EUCAST antifungal susceptibility testing. Two strains (CM8087 and CM9326) had higher MIC values to all imidazole and triazole drugs and one strain (CM7668) could be considered as hyper-susceptible to all DMIs.

3.3. Sequence Analysis of *cyp51A*, *cyp51B* and *cyp51C* Genes

The three Cyp51 paralogues possess a different number of introns with different sizes. The GeneBank accession Numbers of all *A. flavus cyp51A*, *cyp51B* and *cyp51C* sequences are displayed in Supplementary Table S3.

3.3.1. *Aspergillus flavus* Cyp51A

Gene *cyp51A* is 1591 bp long, with one intron of 67 bp (from base 194 to base 260) and that translates into 507 aa. The *cyp51A* sequences from strain ATCC2004304, *A. flavus* NRRL3357 (GenBank: XM_002375082.1), *A. flavus* AF70, and *A. oryzae* RIB40, were used as reference for comparison. The first 18 bp (atgattctctcagcagc) encoding six amino acid (MIFSRS) were excluded from the *A. flavus* NRRL3357 sequence because they did not match the other sequences (AF70 or RIB40). Changes in the *cyp51A* full coding sequence and derived amino acid sequences are displayed in Table 3. Several synonymous and non-synonymous point mutations were found among both susceptible and non-susceptible strains. One azole resistant strain (CM7668) harbored a c641t base change, resulting in a P214L point mutation that was only present in this strain, previously described in a recent work [36].

Table 3. *Aspergillus fumigatus* Cyp51A analysis. The sequence of *A. fumigatus* NRRL 3357 type strain was used as Reference. In bold the *A. fumigatus* azole resistant strains.

<i>Aspergillus fumigatus</i> Cyp51A																		
Strains	A*	c132t	c165t	c342t	g390a	f546c	g595a	c641t	g723c	g738t	l303	f309	g966t	t329a	h355	l164c	c1368t	g1371a
		F44	P55	G114	K130	F182	A199T	P214L ¹	Y241	N246	L303	F309	K322N	T329A	H355	F388	N456	I456
CM07668	R		c165t		g390a	f546c		c641t								l164c		
CM8087	R		c165t		g390a	f546c								a985g		l164c		
CM8098	S		c165t		g390a	f546c								a985g		l164c		
CM9165	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
CM9174	S		c165t		g390a	f546c		g723c						a985g		l164c		
CM9189	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
CM9195	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
CM9228	S		c165t		g390a	f546c				g507c			g966t			l164c		
CM9287	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
CM9298	S	c132t	c165t	c342t	g390a	f546c						l927c				l164c	c1368t	
CM9326	R		c165t		g390a	f546c										l164c		
CM9329	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
CM9331	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
CM9684	S		c165t		g390a	f546c								a985g		l164c		
TPH642	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
TPH968	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
TPH992	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
TPH1004	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
TPH1115	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
TPH1179	S		c165t		g390a	f546c										l164c		
ATCC2004304	S		c165t		g390a	f546c	g595a								c1065t	l164c	c1368t	g1371a
<i>A. oryzae</i> R1B40	-		c165t		g390a	f546c	g595a								c1065t	l164c	c1368t	g1371a
<i>A. fumigatus</i> AF70	-		c165t		g390a	f546c			g738t							l164c	c1368t	
Protein		F44	P55	G114	K130	F182	A199T	P214L¹	Y241	N246	L303	F309	K322N	T329A	H355	F388	N456	I456

* A, azole drugs profile, S susceptible, R Resistant. ¹ This mutation was previously described in a recent work [36].

3.3.2. *Aspergillus flavus* Cyp51B

Gene *cyp51B* is 1740 bp long, with three introns: the first one of 54 bp (from base 247 to base 300), the second one of 58 bp (from base 499 to base 556) and the last one of 53 bp (from base 1616 to base 1668) that translates into 524 aa. *Cyp51B* sequences from strain ATCC2004304, *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* AF70 and *A. oryzae* RIB40 were used as reference sequences. Changes in the *cyp51B* full coding sequence and derived amino acid sequences are displayed in Table 4. This protein only harbored four synonymous mutations and showed a fully conserved amino acid sequence in all azole susceptible and resistant *A. flavus* strains.

Table 4. *Aspergillus flavus* Cyp51B analysis. The sequence of *A. flavus* NRRL3357 was used as reference. In bold the *A. flavus* azole resistant strains.

Strains	A *	<i>Aspergillus flavus</i> Cyp51B			
		c237t	c498t	t699c	a799g
		C79	I166	N233	K267
CM7668	R				
CM8087	R				
CM9165	S	c237t	c498t		a799g
CM9174	S				
CM9189	S		c498t		
CM9195	S		c498t		
CM9228	S		c498t		
CM9267	S				
CM9298	S		c498t		
CM9326	R		c498t		
CM9329	S				
CM9331	S		c498t		
CM9684	S			t699c	
YPH642	S				
YPH968	S				
YPH992	S				
YPH1004	S				
YPH1115	S				
YPH1179	S				
ATCC2004304	S				
<i>A. oryzae</i> RIB40	-				
<i>A. flavus</i> AF70	-		c498t		a799g
Protein		C79	I166	N233	K267

* A, azole drugs profile, S susceptible, R, Resistant

3.3.3. *Aspergillus flavus* Cyp51C

Gene *cyp51C* is 1612 bp long, with one 70 bp intron (from base 197 to base 266) and translates into 513 aa. *Cyp51C* sequences from strain ATCC2004304, *A. flavus* NRRL3357, *A. flavus* AF70 and *A. oryzae* RIB40 were used as reference. Changes in the *cyp51C* full coding sequence and derived amino acid sequences are displayed in Table 5. Several synonymous and non-synonymous point mutations were found among both susceptible and non-susceptible strains. One azole resistant strain (CM9326) showed an a1046g base change resulting in a H349R point mutation that was only present in this strain, previously described in a recent work [36].

Table 5. *Aspergillus flavus* Cyp51C analysis. The sequence of *A. flavus* NRRL3357 (Type strain) was used as Reference. In bold the *A. flavus* azole resistant strains.

Strains	A *	<i>Aspergillus flavus</i> Cyp51C																		
		M51T	G59G	S240A	R236ST	D254N	D294G	F276T	D285V	A292A	S298S	M605I	L326	L348	H349R ¹	S386	S399I	F42I	N423D	V485V
CM7668	R	t161c	c174g	t718g	g740t	g760a	g761g	d826a	a853g	t876g	t894a	g915a	c978t	a1044g	a1046g	c1158t	g1190t	a1263g	a1267g	a1455g
CM8057	R	t161c	c174g	t718g																
CM9165	S	t161c	c174g	t718g																
CM9174	S	t161c	c174g	t718g																
CM9189	S	t161c	c174g	t718g																
CM9195	S	t161c	c174g	t718g																
CM9228	S	t161c	c174g	t718g	g740t															
CM9257	S	t161c	c174g	t718g																
CM9296	S	t161c	c174g	t718g																
CM9326	R	t161c	c174g	t718g																
CM9329	S	t161c	c174g	t718g																
CM9331	S	t161c	c174g	t718g	g760a															
CM9654	S	t161c	c174g	t718g																
TPH642	S	t161c	c174g	t718g																
TPH968	S	t161c	c174g	t718g																
TPH992	S	t161c	c174g	t718g																
TPH004	S	t161c	c174g	t718g																
TPH1115	S	t161c	c174g	t718g																
TPH1179	S	t161c	c174g	t718g																
ATCC **	S	t161c	c174g	t718g	g760a															
RB-90 **	-	t161c	c174g	t718g																
A170	-	t161c	c174g	t718g	g760a															
Protein		M51T	G59G	S240A	R236ST	D254N	D294G	F276T	D285V	A292A	S298S	M605I	L326	L348	H349R ¹	S386	S399I	F42I	N423D	V485V
												g915a								

* A, azole drugs profile, S susceptible, R, Resistant. ** Reference strain *A. flavus* ATCC2004304. *** *A. oryzae*. ¹ This mutation was previously described in a recent work [36].

3.4. *Aspergillus flavus* *cyp51* Genes Expression

RT-PCR amplification was initially conducted to show that all *cyp51* genes were expressed during hyphal growth (Supplementary Figure S1). Then, a quantitative PCR (qPCR) was performed to determine differences in relative expression of *cyp51* genes between azole resistant (CM7668, CM8087 and CM9326) and the azole susceptible *A. flavus* ATCC2004304 strains (Figure 1). The expression of *cyp51A* was relatively similar between the strain ATCC2004304 and CM7668 and CM8087 strains. However, a significant increase of *cyp51A* expression was observed in the CM9326 isolate ($p < 0.001$). No differences of gene expression for the *cyp51B* were observed between all four isolates. Notably, the *cyp51C* gene was less expressed among all the strains (fold change of gene expression < 500) compared to *cyp51A* or *cyp51B*. Although *cyp51C* was expressed in very low levels, we observed a significant increase of gene expression for all strains relative to the ATCC2004304 (Figure 1).

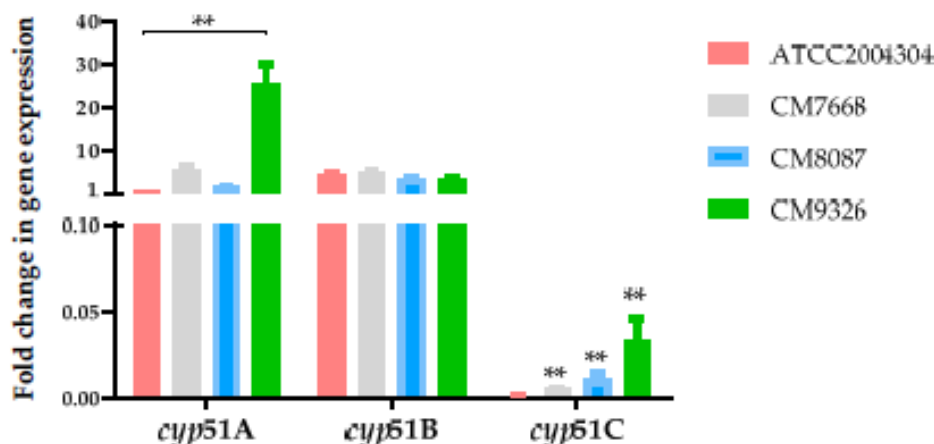


Figure 1. Fold change in gene expression of *cyp51A*, *cyp51B* and *cyp51C* in the ATCC2004304, CM7668, CM8087 and CM9326 *A. flavus* strains. Gene expression values are represented as bar plots with mean +SD. P-values were calculated using the Mann–Whitney U test, p-values of statistical tests are shown within the graphs. ** $p < 0.001$.

3.5. Sequence Analysis: Alignments and Similarity

The deduced 507 amino-acid protein encoded by the 1521-bp coding sequence of *A. flavus* *cyp51A* gene was compared to the known complete amino acid sequences of different fungal Cyp51 proteins including *Aspergillus* species, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., and other plant pathogens. The strongest identities were shown with *A. terreus* Cyp51A (80.59%), *A. fumigatus* Cyp51A (77.60%), *A. flavus* Cyp51C (77%), *Penicillium* spp. Cyp51 (70%), *Fusarium* spp. Cyp51s (68%), and *A. flavus* Cyp51B (58%). Homology with other plant pathogens, such as *N. crassa*, *O. yallundae*, *O. acufiformis*, *E. necator*, *Venturia inaequalis*, and *Venturia nashicola*, was around 58%.

The deduced 524 amino-acid protein encoded by the coding sequence of *A. flavus* *cyp51B* gene was compared to the known complete amino acid sequences of fungal Cyp51s. A strong identity was shown with *A. terreus* Cyp51B (84%), *A. fumigatus* Cyp51B (84%), *P. italicum* Cyp51 (78%), *Fusarium* spp. Cyp51s (63%), *A. flavus* Cyp51A (58%), and *A. flavus* Cyp51C (57%), while a range between 59% and 61% was shown with *N. crassa*, *O. yallundae*, *O. acufiformis*, *E. necator*, *V. inaequalis*, and *V. nashicola*.

The deduced 513-amino-acid protein encoded by the coding sequence *A. flavus* *cyp51C* gene was compared to the known complete amino acid sequences of fungal Cyp51s. A strong identity was shown with *A. fumigatus* Cyp51A (78%), *A. flavus* Cyp51A (77.56%), *A. terreus* Cyp51A (74.71%), *Penicillium* spp. Cyp51 (68%), *Fusarium* spp. Cyp51s (66%), *A. flavus* Cyp51B (60%), and *A. fumigatus* Cyp51B (60%). Identity to other plant pathogens ranged between 55% and 57%.

3.6. Phylogenetic Analysis

The phylogenetic tree derived from the comparison of Cyp51's protein sequences from *A. flavus* with those from other *Aspergillus* spp. and other fungal pathogens is shown in Figure 2. Well defined clusters could be detected for the Cyp51B-derived proteins and for the Cyp51A-derived proteins. However, the *A. flavus* Cyp51C sequences fall in a sub-cluster within the Cyp51A cluster. Interestingly, *Fusarium* spp. Cyp51C formed an independent cluster from Cyp51A or Cyp51B proteins.

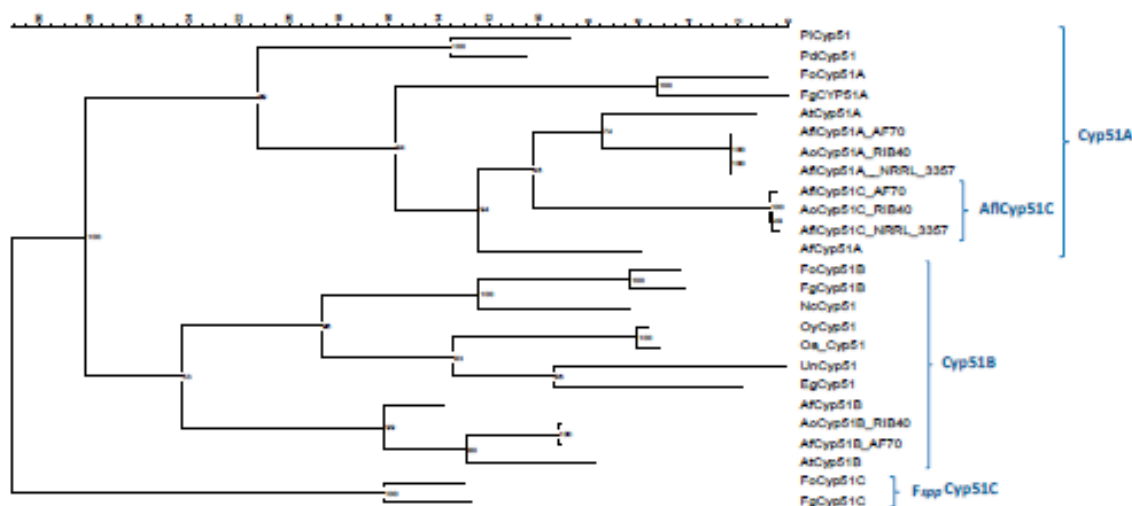


Figure 2. Phylogenetic tree obtained by maximum likelihood analysis. The bootstrap consensus tree was inferred from 2000 replicates to represent the phylogeny. The deduced amino acid sequence of the *A. flavus* Cyp51A, Cyp51B and Cyp51C; *A. oryzae* Cyp51A, Cyp51B and Cyp51C; *A. fumigatus* AfCyp51A and AfCyp51B; *A. terreus* AtCyp51A and AtCyp51B; *F. graminearum* FgCyp51A, FgCyp51B and FgCyp51C; *F. oxysporum* FoCyp51A, FoCyp51B and FoCyp51C; *P. italicum* PiCyp51 and *P. digitatum* PdCyp51; *O. yallundae* OyCyp51 and *O. acufiformis* OaCyp51; *N. crassa* NcCyp51; *E. graminis* EgCyp51; and *U. necator* UnCyp51.

4. Discussion

The emergence of *A. fumigatus* azole resistance is becoming an important issue worldwide [16]. Less frequently, cases of azole resistance in *A. flavus* have started to be described, originating a similar concern as *A. flavus* is the second most common *Aspergillus* spp., causing invasive infections in immunocompromised patients and the most frequent isolated species in some regions of the globe [12]. The extensive and prolonged use of azole drugs in immunocompromised patients has been reported as the main cause of the selection of azole resistant *A. fumigatus* strains [37]. Moreover, the agricultural industry uses pesticides, mainly azole fungicides, to optimize food production, and several studies have suggested an environmental route of *A. fumigatus* azole resistance through the exposure to azole fungicides in agriculture [38]. Although a similar phenomenon has never been described for *A. flavus*, this is an important issue because *A. flavus* produces aflatoxin which contaminates food and livestock feed resulting in significant annual crop losses internationally [39]. For this reason, fungicides, including azole fungicides (DMIs), are commonly used for crop protection [40,41]. Therefore, both the antifungal clinical use to treat *A. flavus* human infections and the use of azoles in agriculture raise the concern about *A. flavus* azole resistance emergence. Regardless of the route of development of azole resistance, the undesirable consequence of that event would be treatment failure [42].

Azole susceptibility in clinical and environmental *A. flavus* strains has been evaluated in several studies, although percentages of azole resistance are quite variable depending on the country and the study [12]. This variability could be due to the criteria used to establish susceptibility or resistance. According to EUCAST [31], *A. flavus* clinical breakpoints to azoles have only been established for

itraconazole (ITC) (isolates are considered resistant with ITC MIC > 1 mg/L) and isavuconazole (ISV) (isolates are considered resistant with ISV MIC > 2 mg/L). ECOFFs are used for the rest of antifungals, and in general they are considered one step higher than for *A. fumigatus*: 0.5 mg/L for posaconazole (POS), and 4 mg/L for voriconazole (VRC). We considered azole resistance only if resistance to ITC was present. Considering these criteria in our study, only three of the *A. flavus* strains showed a reduced in vitro susceptibility to ITC. However, their susceptibility profile was quite different: the CM7668 strain was resistant to ITC and POS but not to VRC or ISV; strain CM9326 was resistant to all azole drugs and strain CM8087 was resistant to all azoles as well as Amphotericin B (AmB) (Table 1). Because azole resistance development has also been related to the use of DMIs in the field, we tested the most frequently used drugs to protect crops: imidazoles and triazoles (Table 2). Cross resistance between clinical azoles and DMIs was shown in the strains CM8087 and CM9326, which had elevated MICs to all the DMIs evaluated. However, the strain CM7668 showed lower MICs for all DMIs tested. This result indicates that different azole resistance mechanisms might be operating in these strains.

Following what has been established for *A. fumigatus*, one of the most studied species regarding amino acid substitutions in Cyp51 proteins, we studied the Cyp51 proteins in *A. flavus*. A key difference between *A. flavus* and other *Aspergillus* species is the existence of a third paralog in *A. flavus*, named *cyp51C* [24]. In contrast, other *Aspergillus* spp. and most filamentous fungi possess two Cyp51 proteins, Cyp51A and Cyp51B, although some species have only one [43]. Phylogenetic analysis shows that Cyp51B enzymes and all Cyp51s of those species with only one enzyme form a clear sub-group in the phylogenetic tree (Figure 2). Another subgroup contains all Cyp51As and includes *A. flavus* Cyp51C. This Cyp51C is relatively similar to *A. flavus* Cyp51A (77%) and it has been described in previous phylogenetic studies as a second Cyp51A [43]. The existence of this third paralog in *A. flavus* could explain why *A. flavus* has higher MICs to all azole drugs, compared to *A. fumigatus*, as the inhibition of the three enzymes would be needed. Recent studies have shown that *Fusarium* spp. also have three Cyp51 paralogues (Cyp51A, -B, and -C), with Cyp51C being unique to the genus [44,45]. However, *Fusarium* spp. Cyp51C represents a complete different subgroup in the phylogenetic tree (Figure 2) [43]. In fact, it has recently been demonstrated that *Fusarium graminearum* Cyp51C does not encode a 14- α sterol demethylase [44].

In order to study azole drug resistance in *A. flavus*, the three genes encoding 14- α sterol demethylase enzymes (*cyp51A*, *cyp51B*, and *cyp51C* genes) were sequenced in all *A. flavus* strains included in this study and their deduced amino acid sequences were compared. We used the sequence of the *A. flavus* type strain (NRRL3357) as the reference sequence, because it was the first strain with the whole genome sequence [46]. Sequences from *A. flavus* (AF70) and *A. oryzae* (RIB40) were also included to see if the differences found between the sequences of the different Cyp51s in all the *A. flavus* clinical strains could correspond to very closely related species, such as *A. oryzae*, or different *A. flavus* morphotypes [47]. However, that was not the case. Several amino acid replacements were detected in Cyp51A and Cyp51C but none were found in Cyp51B. Previous studies have described different mutations in all three genes: *cyp51A*, *cyp51B*, and *cyp51C*. The initial studies [23] focused on mutations in Cyp51A and Cyp51B in spontaneous mutant strains obtained after voriconazole exposure. Although different mutations in both proteins were found (Y132N, K197N, D282E, M288L, and T469S in Cyp51A, and two combined mutations H399P/D411N and T454P/T486P in Cyp51B), these substitutions have been recently found in different *A. flavus* isolates regardless of their susceptibility to azoles, which makes their implication in drug resistance highly unlikely. Similarly, our Cyp51B results showed no amino acid changes in any of the *A. flavus* isolates, except for a few polymorphisms responsible for synonymous mutations (Table 4).

Cyp51A turns out to be highly polymorphic with several synonymous and non-synonymous point mutations (A199T, K332N, and T329A) that were found among azole susceptible and non-susceptible strains, therefore excluding their possible implication in azole resistance. However, one strain (CM7668) resistant only to ITC and POS harbored a c641t base change resulting in a P214L point mutation that was only present in this strain. This mutation is located at the equivalent position of P216L in *A. fumigatus* Cyp51A, a mutation that has been confirmed to be linked to azole resistance by gene replacement [48].

The amino acid P216 is a conserved amino acid within the fungal kingdom Cyp51s. Its role in azole resistance has been explored in Cyp51 homology models and results suggest that the alteration of this residue could be affecting the antifungal-enzyme interaction [49]. A previous homology model proved the interaction of P216L with POS but not with VRC, indicating that mutations in this region might play a role in POS resistance [49]. *A. fumigatus* strains with P216L mutation are resistant to itraconazole and posaconazole but not to voriconazole [50,51]. This peculiar azole susceptibility pattern is similar to the azole susceptibility phenotype exhibited by our *A. flavus* isolate which carries a P214L alteration. The location of the P214L substitution in Cyp51A of *A. flavus* strain CM7668, together with the similarity to the *A. fumigatus* azole susceptibility profile of strains with the P216L Cyp51A mutation, as well as the protein homology studies, highly suggest that this mutation is responsible for the azole resistance shown by this strain. Also, the hypersusceptibility to DMIs shown by this strain (Table 2) seems to indicate that the P214L mutation was not selected in the environment. A limitation of the present study was that clinical data were not collected and we cannot know if the patient was previously treated with ITC or POS, information which would be interesting in the study of the resistance mechanisms. Due to this lack of data, it is impossible to know if the development of azole resistance is related to an in-host acquisition or if this occurred before. However, previous reports *A. fumigatus* Cyp51A P214L mutated in patients treated with ITC will support this *in vivo* selection after ITC or POS treatment [48].

The other very polymorphic gene was *A. flavus cyp51C* with several synonymous and non-synonymous point mutations that were found among both susceptible and non-susceptible strains, and therefore excluding their possible implication in azole resistance. Several mutations found in this study were previously described in other studies, such as M54T, S240A, D254N, I285V, and N423D [24–26], while other substitutions are novel, including D254G, P276T, S399I, and a mutation responsible for a stop codon (R250_{ST}). However, one strain (CM9326) resistant to all azole drugs harbored an a1064g base change resulting in a H349R point mutation that was only present in this strain (Table 5). How this mutation could be connected with the interaction of the azole drugs and the enzyme Cyp51C remains unclear. To date, only one point mutation (Y319H) in *A. flavus* Cyp51C suggests a relation to azole resistance although its role still needs further confirmation [25,26]. In fact, studies of homology modeling and molecular dynamic simulations showed its distant location from the iron porphyrin complex and its lack of effect on the docking of the azoles at the binding site and therefore its doubtful relevance in azole resistance [52].

Gene expression analysis (Figure 1) showed that *cyp51A* and *cyp51B* are predominantly expressed among all the strains compared to *cyp51C*, suggesting that 14- α sterol demethylase activity can be mainly attributed to Cyp51A and Cyp51B. These findings are supported by recent studies of the basal expressions of *A. flavus cyp51s* showed that *cyp51A* and *cyp51B* expression levels were greater than that of *cyp51C*, with an extremely low gene expression that can be strain-dependent [52]. Interestingly, the CM9326 strain showed higher gene expression levels of *cyp51A* and *cyp51C* than the reference strain ATCC2004304. Since the expression of *cyp51C* is at minimal detectable levels for all the strains, these results suggest an association between the *cyp51A* gene expression and the CM9326 azole resistance phenotype. Further experiments would be necessary to explore the role of the Cyp51C Y319H mutation in azole resistance alone or in combination with the *cyp51A* gene expression. Currently, one limitation of this study is that genetic manipulation of *A. flavus* is not fully developed yet, hence we cannot prove the implication of the Cyp51C Y319H mutation or increased Cyp51A expression in azole resistance.

One *A. flavus* strain (CM8087) with a susceptibility profile of resistance to all azoles did not show any amino acid change in any of the three enzymes, or their expression, that could explain or suggest an azole resistant mechanism. Other mechanisms, such as the upregulation of azole target (Cyp51s) or multidrug efflux transporters (ABC (ATP-binding cassette)/MFS (major facilitator superfamily)) that could lead to decreased drug concentrations within the fungal cell are starting to be explored [53]. The *cyp51A*, *cyp51B*, or *cyp51C* expression levels in *A. flavus* do not seem to be related to VRC resistance. In fact, the expression profiles of these genes barely vary among WT and non-WT strains, even after

exposure to azoles [54]. Moreover, some studies on basal and voriconazole-induced expression of various efflux pump genes showed low basal expression irrespective of the azole susceptibility of the isolate [54]. Only a possible role of the multidrug efflux pump Cdr1B overexpression in *A. flavus* azole has been recently proposed [54]. Additionally, this strain (CM8087) was also resistant to AmB and therefore a different resistant mechanism would be expected. Further experiments will be needed to explore other resistance mechanisms that could explain this particular susceptibility profile. Cross resistance between azoles and AmB has been better analyzed in yeast. For instance, in *Candida tropicalis*, a bypass in the ergosterol biosynthesis pathway may develop as a result of mutations in sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (ERG3) together with Erg11/Cyp51 mutations, resulting in cross resistance to azoles and AmB [55]. In general, the ergosterol biosynthesis pathway is more complex in filamentous fungi and in particular, it has not been studied in *A. flavus* yet. Although, to date, it would be difficult to search for this kind of resistance mechanism in *A. flavus*, this possibility deserves consideration in further research.

5. Conclusions

In conclusion, antifungal resistance mechanisms in *A. flavus* isolates can be relevant in the clinical and in the environmental setting. The results of this study suggest that these mechanisms can be associated to *A. flavus* Cyp51A or Cyp51C mutations or are related to an increase of *cyp51A* gene expression. However, the role of these genes variations and their contribution to antifungal resistance needs to be further investigated.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4425/11/10/1217/s1>, Table S1: Clinical *Aspergillus flavus* isolates: sample origin and year of isolation. Table S2: Primers used for *Aspergillus flavus* *cyp51A*, *cyp51B* and *cyp51C* DNA amplification and sequencing and RT-PCR from RNA. Table S3: GenBank Accession Numbers of all *A. flavus* *cyp51A*, *cyp51B* and *cyp51C*. Figure S1: *Aspergillus flavus* *cyp51* genes expression.

Author Contributions: E.M. conceived and designed the experiments. J.L., I.G.-J. and O.R.-M. performed the experiments. E.M., A.A.-I., L.A.-F. and T.P. analyzed the data. J.L., I.G.-J., L.A.-F. and E.M. drafted the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI18CIII/00045) and also by Plan Nacional de I+D+i 2013–2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/CIII/0004/0003), co-financed by European Development Regional Fund ERDF “A way to achieve Europe”, Operative program Intelligent Growth 2014–2020. J.L. holds a predoctoral fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria (F17CIII/00037).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Richardson, M.; Lass-Flörl, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 5–24. [CrossRef] [PubMed]
2. Paulussen, C.; Hallsworth, J.E.; Álvarez-Pérez, S.; Nierman, W.C.; Hamill, P.G.; Blain, D.; Rediers, H.; Lievens, B. Ecology of aspergillosis: Insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 296–322. [CrossRef]
3. Low, C.Y.; Rotstein, C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med. Rep.* **2011**, *3*, 14. [CrossRef] [PubMed]
4. Nivoix, Y.; Velten, M.; Letscher-Bru, V.; Moghaddam, A.; Natarajan-Amé, S.; Fohrer, C.; Lioure, B.; Bilger, K.; Lutun, P.; Marcellin, L.; et al. Factors Associated with Overall and Attributable Mortality in Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *47*, 1176–1184. [CrossRef] [PubMed]
5. Taccone, E.S.; Van den Abeele, A.M.; Bulpa, P.; Misset, B.; Meersseman, W.; Cardoso, T.; Paiva, J.A.; Blasco-Navalpotro, M.; De Laere, E.; Dimopoulos, G.; et al. AspICU Study Investigators. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: Clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit. Care* **2015**, *19*, 7. [CrossRef]

6. Samarakoon, P.; Soubani, A. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: A report of five cases and systematic review of the literature. *Chron. Respir. Dis.* **2008**, *5*, 19–27. [[CrossRef](#)]
7. Garcia-Giraldo, A.M.; Mora, B.L.; Loaiza-Castaño, J.M.; Cedano, J.A.; Rosso, F. Invasive fungal infection by *Aspergillus flavus* in immunocompetent hosts: A case series and literature review. *Med. Mycol. Case Rep.* **2018**, *23*, 12–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Krishnan, S.; Manavathu, E.K.; Chandrasekar, P.H. *Aspergillus flavus*: An emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* **2009**, *52*, 206–222. [[CrossRef](#)]
9. Hedayati, M.; Pasqualotto, A.C.; Warn, P.A.; Bowyer, P.; Denning, D.W. *Aspergillus flavus*: Human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **2007**, *153*, 1677–1692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Alastruey-Izquierdo, A.; Mellado, E.; Peláez, T.; Pemán, J.; Zapico, S.; Alvarez, M.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M.; FILPOP Study Group. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 3380–3387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Alastruey-Izquierdo, A.; Alcazar-Fuoli, L.; Rivero-Menéndez, O.; Ayats, J.; Castro, C.; Garcia-Rodriguez, J.; Goterris-Bonet, L.; Ibáñez-Martínez, E.; Linares-Sicilia, M.J.; Martín-Gómez, M.T.; et al. The FILPOP2 Project from GEMICOMED (SEIMC) and REIPI. Molecular Identification and Susceptibility Testing of Molds Isolated in a Prospective Surveillance of Triazole Resistance in Spain (FILPOP2 Study). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e00358–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Rudramurthy, S.M.; Paul, R.A.; Chakrabarti, A.; Mouton, J.W.; Meis, J.F. Invasive Aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, Diagnosis, Antifungal Resistance, and Management. *J. Fungi* **2019**, *5*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ullmann, A.J.; Aguado, J.M.; Arikan-Akdagli, S.; Denning, D.W.; Groll, A.H.; Lagrou, K.; Lass-Flörl, C.; Lewis, R.E.; Muñoz, P.; Verweij, P.E.; et al. Diagnosis and Management of Aspergillus Diseases: Executive Summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS Guideline. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, e1–e38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lepesheva, G.I.; Waterman, M.R. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1770*, 467–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chowdhary, A.; Sharma, C.; Meis, J.F. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S436–S444. [[CrossRef](#)]
16. Garcia-Rubio, R.; Cuenca-Estrella, M.; Mellado, E. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs* **2017**, *77*, 599–613. [[CrossRef](#)]
17. Zhang, J.; van den Heuvel, J.; Debets, A.J.M.; Verweij, P.E.; Melchers, W.J.G.; Zwaan, B.J.; Schoustra, S.E. Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. *Proc. Biol. Sci.* **2017**, *284*, 20170635. [[CrossRef](#)]
18. Klich, M.A. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Mol. Plant. Pathol.* **2007**, *8*, 713–722. [[CrossRef](#)]
19. Varga, J.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud. Mycol.* **2011**, *69*, 57–80. [[CrossRef](#)]
20. Mellado, E.; Diaz-Guerra, T.M.; Cuenca-Estrella, M.; Rodriguez-Tudela, J.L. Identification of two different 14 α -sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 2431–2438. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, J.; Li, L.; Lv, Q.; Yan, L.; Wang, Y.; Jiang, Y. The Fungal CYP51s: Their Functions, Structures, Related Drug Resistance, and Inhibitors. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Choi, M.J.; Won, E.J.; Joo, M.Y.; Park, Y.J.; Kim, S.H.; Shin, M.G.; Shin, J.H. Microsatellite typing and resistance mechanism analysis of voriconazole-resistant *Aspergillus flavus* isolates in South Korean hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01610–18. [[CrossRef](#)]
23. Krishnan-Natesan, S.; Chandrasekar, P.H.; Alangaden, G.J.; Manavathu, E.K. Molecular characterisation of *cyp51A* and *cyp51B* genes coding for P450 14 α -lanosterol demethylases A (CYP51Ap) and B (CYP51Bp) from voriconazole-resistant laboratory isolates of *Aspergillus flavus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2008**, *32*, 519–524. [[CrossRef](#)]
24. Liu, W.; Sun, Y.; Chen, W.; Liu, W.; Wan, Z.; Bu, D.; Li, R. The T788G mutation in the *cyp51C* gene confers voriconazole resistance in *Aspergillus flavus* causing aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2598–2603. [[CrossRef](#)]

25. Paul, R.A.; Rudramurthy, S.M.; Meis, J.F.; Mouton, J.W.; Chakrabarti, A. A Novel Y319H Substitution in CYP51C Associated with Azole Resistance in *Aspergillus flavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6615–6619. [CrossRef] [PubMed]
26. Sharma, C.; Kumar, R.; Kumar, N.; Masih, A.; Gupta, D.; Chowdhary, A. Investigation of Multiple Resistance Mechanisms in Voriconazole-Resistant *Aspergillus flavus* Clinical Isolates from a Chest Hospital Surveillance in Delhi, India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01928-17. [CrossRef] [PubMed]
27. Tang, C.M.; Cohen, J.; Holden, D.W. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 1663–1671. [CrossRef]
28. Alcazar-Fuoli, L.; Mellado, E.; Alastruey-Izquierdo, A.; Cuenca-Estrella, M.; Rodriguez-Tudela, J.L. *Aspergillus* section *Fumigati*: Antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 1244–1251. [CrossRef]
29. Arendrup, M.C.; Cuenca-Estrella, M.; Lass-Flörl, C.; Hope, W.W. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-APST). EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 248–250. [CrossRef]
30. Arendrup, M.C.; Cuenca-Estrella, M.; Lass-Flörl, C.; Hope, W.W. Breakpoints for antifungal agents: An update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida spp.* and triazoles against *Aspergillus spp.* *Drug Resist. Updat.* **2013**, *16*, 81–95. [CrossRef]
31. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs for Antifungal Agents, Version 10.0. 2020. Available online: <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/> (accessed on 16 April 2020).
32. Diaz-Guerra, T.M.; Mellado, E.; Cuenca-Estrella, M.; Rodriguez-Tudela, J.L. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 1120–1124. [CrossRef]
33. Cove, D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *113*, 51–56. [CrossRef]
34. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108. [CrossRef]
35. Hess, J.; Goldman, N. Addressing inter-gene heterogeneity in maximum likelihood phylogenomic analysis: Yeasts revisited. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22783. [CrossRef] [PubMed]
36. Rivero-Menendez, O.; Soto-Debran, J.C.; Medina, N.; Lucio, J.; Mellado, E.; Alastruey-Izquierdo, A. Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Testing, and Mechanisms of Azole Resistance in *Aspergillus* Species Received within a Surveillance Program on Antifungal Resistance in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00865-19. [CrossRef]
37. Tashiro, M.; Izumikawa, K.; Hirano, K.; Ide, S.; Mihara, T.; Hosogaya, N.; Takazono, T.; Morinaga, Y.; Nakamura, S.; Kurihara, S.; et al. Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 4870–4875. [CrossRef] [PubMed]
38. Berger, S.; El Chazli, Y.; Babu, A.E.; Coste, A.T. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1024. [CrossRef]
39. Nierman, W.C.; Yu, J.; Fedorova-Abrams, N.D.; Losada, L.; Cleveland, T.E.; Bhatnagar, E.; Bennett, J.W.; Dean, R.; Payne, G.A. Genome Sequence of *Aspergillus flavus* NRRL 3357, a Strain That Causes Aflatoxin Contamination of Food and Feed. *Genome Announc.* **2015**, *3*, e00168-15. [CrossRef] [PubMed]
40. Chowdhary, A.; Kathuria, S.; Xu, J.; Meis, J.F. Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003633. [CrossRef]
41. Hollomon, D. Does Agricultural Use of Azole Fungicides Contribute to Resistance in the Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*? *Pest. Manag. Sci.* **2017**, *73*, 1987–1993. [CrossRef] [PubMed]
42. Verweij, P.E.; Chowdhary, A.; Melchers, W.J.; Meis, J.F. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, 362–368. [CrossRef]
43. Hawkins, N.J.; Cools, H.J.; Sierotzki, H.; Shaw, M.W.; Knogge, W.; Kelly, S.L.; Kelly, D.E.; Fraaije, B.A. Paralog re-emergence: A novel, historically contingent mechanism in the evolution of antimicrobial resistance. *Mol. Biol. Evol.* **2014**, *7*, 1793–1802. [CrossRef]

44. Fan, J.; Urban, M.; Parker, J.E.; Brewer, H.C.; Kelly, S.L.; Hammond-Kosack, K.E.; Fraaije, B.A.; Liu, X.; Cools, H.J. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. *New Phytol.* **2013**, *198*, 821–835. [CrossRef]
45. Zheng, B.; Yan, L.; Liang, W.; Yang, Q. Paralogous Cyp51s Mediate the Differential Sensitivity of *Fusarium Oxysporum* to Sterol Demethylation Inhibitors. *Pest. Manag. Sci.* **2019**, *75*, 396–404. [CrossRef]
46. Payne, G.A.; Nierman, W.C.; Wortman, J.R.; Pritchard, B.L.; Brown, D.; Dean, R.A.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Machida, M.; Yu, J. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Mol. Mycol.* **2006**, *44*, S9–S11. [CrossRef] [PubMed]
47. Gilbert, M.K.; Mack, B.M.; Moore, G.G.; Downey, D.L.; Lebar, M.D.; Joardar, V.; Losada, L.; Yu, J.; Nierman, W.C.; Bhatnagar, D. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* L-morphotype strain NRRL 3357 (type) and S-morphotype strain AF70. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0199169. [CrossRef] [PubMed]
48. Camps, S.M.; van der Linden, J.W.; Li, Y.; Kuijper, E.J.; van Dissel, J.T.; Verweij, P.E.; Melchers, W.J. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: A case study and review of the literature. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 10–16. [CrossRef] [PubMed]
49. Xiao, L.; Madison, V.; Chau, A.S.; Loebenberg, D.; Palermo, R.E.; McNicholas, P.M. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 568–574. [CrossRef] [PubMed]
50. Dabas, Y.; Xess, I.; Bakshi, S.; Mahapatra, M.; Seth, R. Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* from Immunocompromised Hosts in India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02264–17. [CrossRef]
51. Ballard, E.; Melchers, W.J.G.; Zoll, J.; Brown, A.J.P.; Verweij, P.E.; Warris, A. In-host microevolution of *Aspergillus fumigatus*: A phenotypic and genotypic analysis. *Fungal Genet. Biol.* **2018**, *113*, 1–13. [CrossRef]
52. Rudramurthy, S.M.; Seyedmousavi, S.; Dhaliwal, M.; Chakrabarti, A.; Meis, J.F.; Mouton, J.W. Pharmacodynamics of Voriconazole against Wild-Type and Azole-Resistant *Aspergillus flavus* Isolates in a Nonneutropenic Murine Model of Disseminated Aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *61*, e01491–16. [CrossRef] [PubMed]
53. Paul, R.A.; Rudramurthy, S.M.; Dhaliwal, M.; Singh, P.; Ghosh, A.K.; Kaur, H.; Varma, S.; Agarwal, R.; Chakrabarti, A. Magnitude of voriconazole resistance in clinical and environmental isolates of *Aspergillus flavus* and investigation into the role of multidrug efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01022–18. [CrossRef] [PubMed]
54. Pérez-Cantero, A.; López-Fernández, L.; Guarro, J.; Capilla, J. Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: Update and recent advances. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2020**, *55*, 105807. [CrossRef]
55. Forastiero, A.; Mesa-Arango, A.C.; Alastruey-Izquierdo, A.; Alcazar-Fuoli, L.; Bernal-Martinez, L.; Pelaez, T.; Lopez, J.F.; Grimalt, J.O.; Gomez-Lopez, A.; Cuesta, I.; et al. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 4769–4781. [CrossRef] [PubMed]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO X: Participación en otras publicaciones relacionadas con la Tesis

- Gonzalez-Jimenez I, **Lucio J**, Cuesta I, Amich J, Sanchez Arroyo R, Alcazar-Fuoli L, and Mellado E. Cyp51B mutations contribute to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. J. Fungi 2020, 6, 315; doi:10.3390/jof6040315. IF:5.8 Microbiology 31/136 (Q1)
- Gonzalez-Jimenez I., **Lucio J.**, Roldan A, Alcazar-Fuoli L. and Mellado E. Are point mutations in HMG-CoA reductases (Hmg1 and Hmg2) a step towards azole resistance in *Aspergillus fumigatus*? Molecules, 2021, 26(19):5975. doi: 10.3390/molecules26195975. IF: 4.1. Pharmaceutical Science (Q1); Infectious Diseases (Q2)
- Gonzalez-Jimenez I, Garcia-Rubio R, Monzon S, **Lucio J**, Cuesta I, and Mellado E. Multi-resistance to n-azole fungicides in *Aspergillus fumigatus* TR34/L98H azole resistant isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2021. 17;65(9):e0064221. doi: 10.1128/AAC.00642-21. IF: 4.9 Microbiology (Q1)
- Gonzalez-Jimenez I, **Lucio J**, Menendez Fraga MD, Pelaez T, and Mellado E. Hospital environment as a source of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains with G448S and TR34/L98H mutations. J Fungi (Basel) 2021 Jan 2;7(1):E22. doi: 10.3390/jof7010022. IF: 5.8 Microbiology 31/136 (Q1)
- Garcia-Rubio R, Gonzalez Jimenez I, **Lucio J**, and Mellado E. Characterization of *Aspergillus fumigatus* cross-resistance between clinical and DMI azole drugs. Appl Environ Microbiol. 2021 87 (5): e02539-20. doi: 10.1128/AEM.02539-20. IF:4.7 Biotechnology and Applied Microbiology 37/166 (Q1).

ANEXO XI: Participación en comunicaciones a congresos nacionales e internacionales

- Gonzalez-Jimenez I, Garcia-Rubio R, Monzon S, **Lucio J**, Cuesta I, and Mellado E. *Aspergillus fumigatus* azole resistant (TR34/L98H) isolates are multi-resistant to different non-azole fungicides. 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID 2021), 9-12 Julio, 2021, Viena (Austria). Poster
- Iglesias-Cabezas MJ, **Lucio J**, González-Jiménez I, Román N, Estopiña-Antolí M , Ayats F, Buitrago MJ and Mellado E. Isolation of *Aspergillus fumigatus* with Y121H or Y121F single Cyp51A mutations after isavuconazole or voriconazole treatment. 10th Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis. 1-2 Febrero, 2022. Poster
- Gonzalez-Jimenez I, **Lucio J**, Roldan A, Alcazar-Fuoli L, and Mellado E. The *Aspergillus fumigatus* DNA mismatch repair system and its relation with azole resistance. 10th Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis. 1-2 Febrero, 2022. Poster
- García-Gutiérrez L, Baena Rojas B, Ruiz M, Mellado E, **Lucio J**, C. Ruiz-Gaitán A, Pemán J, Cuétara-García M-S, Peris D & Martin-Sanchez P-M. Mycospatialomics: caracterización del microbioma de ambientes hospitalarios para prevenir las infecciones fúngicas invasivas. XXIX Congreso Sociedad Española de Microbiología. Burgos, 25-28 junio 2023.
- García-Gutiérrez L, Baena Rojas B, Ruiz MT, **Lucio J**, Hernández Egidio S, C. Ruiz-Gaitán A, Pemán J, Cuétara-García MS, Mellado E & Martin-Sanchez PM. Environmental surveys for the risk assessment of invasive fungal infections in Spanish hospitals. 11th Trends in Medical Mycology. 20-23 October 2023, Athens, Greece. Poster

ANEXO XII: Comunicaciones como primer autor a congresos nacionales e internacionales

- **Lucio J, Gonzalez-Jimenez I, Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Pelaez T, Alcazar-Fuoli L and Mellado E.** Point Mutations in the 14 α -Sterol Demethylase Cyp51A or Cyp51C could contribute to azole resistance in *Aspergillus flavus*. 9th Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis. 27-29 Febrero, Luga, Suiza, 2020. Póster
- **Lucio J, González-Jiménez I, Monteiro MC and Mellado E.** Identification of Off-Patent Compounds that present antifungal activity against azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID 2021), 9-12 Julio, 2021, Viena (Austria). Póster
- **Lucio J, Gonzalez-Jimenez I, Mellado E.** A mutation in the Class III Histidine-Kinase Bos1 is responsible for *Aspergillus fumigatus* dicarboximide resistance. 10th Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis. 1-2 Febrero, 2022. Póster
- **Lucio J, Gonzalez-Jimenez I, Ca-Pascual S, Roldan A, Amich J, Alcazar-Fuoli L and Mellado E.** The *Aspergillus fumigatus* DNA mismatch repair msh6 gene and its relation with antifungal resistance development. 11th Trends in Medical Mycology. 20-23 October 2023, Athens, Greece. Póster
- **Lucio J, Ca-Pascual S, Hernandez-Egido S, Roldan A, Cuetara M, and Mellado E.** Distribution of *Aspergillus* Species and Prevalence of Azole Resistance in Clinical and Environmental Samples from a Spanish Hospital 11th Trends in Medical Mycology. 20-23 October 2023, Athens, Greece. Póster

INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus is an opportunistic mold, source of a broad spectrum of pathologies called aspergillosis. Among the clinical manifestations of *A. fumigatus* infections, invasive aspergillosis (IA) is the most severe pathology due to its high morbidity and mortality rates. The mainstay of treatment for aspergillosis are broad-spectrum triazoles, including itraconazole (ITC), voriconazole (VCZ), posaconazole (POS) and isavuconazole¹. These drugs target the 14- α sterol demethylase (Cyp51A), an enzyme that plays a key role in the ergosterol biosynthesis pathway².

The success of treatments depends on the efficacy of the antifungal drugs and the current repertoire of antifungal drugs which is limited. In addition, the global increase of triazole resistance isolates is threatening the management and treatment of aspergillosis patients³. Although the number of cases of azole resistant *A. fumigatus* recovered from clinical samples is still limited, azole resistance mechanisms continue to spread worldwide threatening the effectiveness of this important antifungal class.

Developing new antifungal therapies is a slow, exhaustive and expensive process. New approaches are often chosen to develop novel antifungal agents, such as drug repurposing. Drug repurposing is the identification of new therapeutic uses for drugs that are already approved. This new approach is more affordable than novel drug discovery, because drugs mechanism of action, their target and their clinical safety have been already well characterized⁴. Besides that, combination therapies, which can expand the antifungal spectrum, improve therapeutic efficacy and reduce adverse effects. Synergistic drug combinations are a very useful method to treat fungal diseases⁵.

In this study, we have screened the Prestwick Chemical Library⁶, a commercially available library of 1,280 drugs, aiming for the identification of bioactive drugs against azole susceptible and resistant *A. fumigatus* strains and to evaluate the in vitro synergistic activity of some active drugs with voriconazole.

MATERIAL AND METHODS

Thirty-four *A. fumigatus* strains were used in this study. Six azole-susceptible strains and twenty-eight azole-resistant isolates with known azole resistance mechanisms, including different single point mutations in the *cyp51A* gene, and tandem repeat insertions in the *cyp51A* promoter combined with point mutations (Table 1).

We screened the Prestwick chemical library, which contains 1,280 off-patent compounds. Using the 96-well microtiter plate-based, the effect of the library compounds was tested on three azole-susceptible and one azole-resistant *A. fumigatus* strains.

Selected active compounds were tested with the 34 *A. fumigatus* strains to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MICs), following EUCAST reference method.

Synergism for in vitro activity combined with voriconazole was tested using the checkerboard assay. The interaction was determined by the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI), defining interactions as synergistic (FICI \leq 0.5), indifferent (FICI>0.5-4) or antagonistic (FICI>4).

CONCLUSIONS

Thirty-eight compounds of the Prestwick library present activity inhibiting *A. fumigatus* growth.

CIE, FLU, AUR and LIR showed stronger in vitro antifungal activity against the *A. fumigatus* strains. Combination of voriconazole with FLU and AHH showed in vitro synergistic interaction.

Further studies need to be done to identify the mechanism action behind these interactions and to evaluate the in vivo interaction of these compounds.

FUNDING

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (PIS PI18CII/00045) and Plan Nacional de I+D+i 2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Instituto de Economía, Industria y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/011/0004/0003), co-financed by European Development Regional Fund ERDF "A way to achieve Europe". Operative program Intelligent Growth 2014-2020. I. Lucio holds a predoctoral fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria (P17CII/00057).

RESULTS

Table 1. MIC ranges of *A. fumigatus* isolates to clinical antifungal drugs and selected compounds. *A. fumigatus* isolates are grouped based on their azole (AZL) susceptibility profile and their Cyp51A azole resistance mechanisms.

Cyp51A modifications	MIC ranges (mg/mL)									
	MICs to clinical antifungals					MICs to Prestwick library compounds				
	ITC	VCZ	POS	CIE	FLU	ATO	AUR	LIR	AHH	
AZL-Susceptible	0.25-0.5	0.125-0.5	0.06-0.125	1	8-16	32-64	4-8	0.25-1	32-64	
VT (6)										
AZL-Resistant:										
Point mutations:										
G54 (4)	>8	0.25-0.5	1- >8	0.5-1	8-16	64	2-4	0.25-1	16-64	
M220 (4)	>8	0.25-1	0.25-2	1	8-16	64-64	4-8	0.5-1	32-64	
G4485 (7)	1-2	>8	0.25-1	1	4-16	32-64	4	0.25	64	
AZL-Resistant:										
TR integrations:										
TR34/L98H (8)	>8	4-8	0.5-1	1	4-8	>64	4-8	0.25-1	32-64	
*TR34/L98H (2)	>8	4-8	0.5-1	1	8	64	8	0.5	64	
TR46/Y121F/T289A (3)	2-4	4- >8	0.5	1	8	64-64	4-16	0.5	32-64	

* TR34/L98H/S297T/F495I; F495I tandem repeat (TR) integration in the *cyp51A* promoter in combination, or not, with single point mutations. ITC: itraconazole; VCZ: voriconazole; POS: posaconazole; CIE: Cidopirox ethanolate; FLU: Fluvestatin; ATO: Atravastatin; AUR: Aurafinof; LIR: Liranafate; AHH: R(-)-Apomorphine hydrochloride hemihydrate

SYNERGISTIC INTERACTION WITH VORICONAZOLE

We evaluated the interaction of selected compounds: Cidopirox ethanolate (CIE), Fluvestatin (FLU), Atravastatin (ATO), Aurafinof (AUR), Liranafate (LIR) and R(-)-Apomorphine hydrochloride hemihydrate (AHH) in combination with VCZ, using azole susceptible and resistant *A. fumigatus* isolates (Table 2).

Strains with the azole showed and indifferent synergistic activity when tested with any group of isolates. VCZ + CIE or VCZ + AHH showed FICI values close to 0.5 indicating a possible synergistic interaction against these groups of isolates.

The combination of VCZ + FLU was synergistic with strains with TR34s or G4485. Finally the combination VCZ + AUR was only active when tested against strains with the resistance mechanism TR46/Y121F/T289A.

The basis of the synergistic interaction of these compounds, with independent mechanisms of action, need to be explored.

CONTACT INFORMATION

Jose Lucio Vicente

Phone: +34 91 8223661 e-mail: jose.lucio@isciii.es

Corresponding Author: Emilia Mellado, emellado@isciii.es

INITIAL SCREENING FOR INHIBITORS OF *A. FUMIGATUS*

Thirty-eight active compounds inhibit *A. fumigatus* growth by >90%. Six of them were selected: Cidopirox ethanolate (CIE), Fluvestatin (FLU), Atravastatin (ATO), Aurafinof (AUR), Liranafate (LIR) and R(-)-Apomorphine hydrochloride hemihydrate (AHH).

The susceptibility was tested with a collection of azole resistant *A. fumigatus* strains with different azole resistance mechanisms (Table 1). Six azole susceptible *A. fumigatus* strains, Cyp51A wild type, were used as references to determine ranges of activity for each compound.

ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING

All Cyp51A-VT strains were susceptible to the clinical azole tested. Those *A. fumigatus* isolates harboring the G54 mutation were resistant to ITC and POS and susceptible to VCZ. Azole resistant isolates with M220 were resistant to ITC, showing variable MICs to VCZ and POS. Strains harboring G4485 mutations were resistant to VCZ, with variable MICs to ITC and POS. All the strains harboring a tandem repeat (TR) insertion in the *cyp51A* promoter showed resistance to all the clinical azoles tested (Table 1).

The ranges of *A. fumigatus* strains susceptibility to each selected compound are also presented in Table 1. There was no differences in the susceptibility to any compound tested among all strains tested. There were differences in compounds activity being CIE and LIR the more active compounds while ATO and AHH showed the highest MICs.

Table 2. Fractional inhibitory concentration index (FICI) for the combination of voriconazole and each selected compound.

Cyp51A modifications	FICI					
	VCZ + CIE	VCZ + FLU	VCZ + ATO	VCZ + AUR	VCZ + LIR	VCZ + AHH
WT	1-1.031	0.479-0.750	1	1.002-1.004	1.008-1.016	0.670-0.750
G54	1	0.407-0.500	0.750	0.750	1	0.750
M220	1.016-1.031	0.625-0.750	1	1-1.002	1	0.563-0.625
G4485	1.031	0.375-0.508	ND*	1	1	0.625
TR34/L98H	1	0.375-0.500	ND*	1.002	1	ND*
TR34/L98H/S297T/F495I	0.531	0.500-0.563	1	1.002	1.016	0.520-0.563
TR46/Y121F/T289A	0.508	1	ND*	0.563	ND*	0.285-0.500

ND*: Not determined; VCZ: voriconazole; CIE: Cidopirox ethanolate; FLU: Fluvestatin; ATO: Atravastatin; AUR: Aurafinof; LIR: Liranafate; AHH: R(-)-Apomorphine hydrochloride hemihydrate

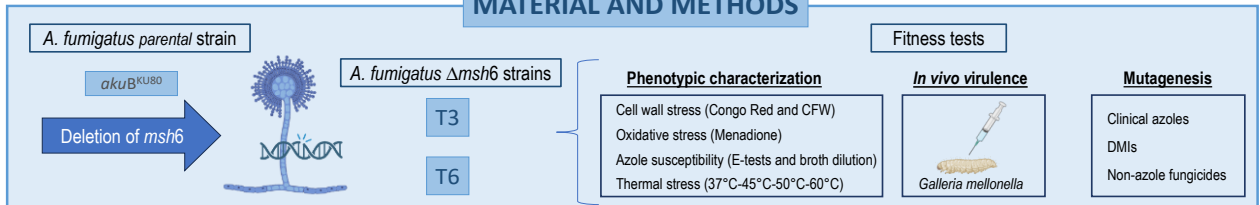
REFERENCES

- Ullmann AJ, Aguado JM, Arken-Aldagil S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. Clin Microbiol Infect. 2018;24:e1-83.
- Odds FC, Brown AJP, Gow NAH. Antifungal agents: Mechanisms of action. Trends Microbiol. 2003;11(6):272-9.
- Lestrade PA, Meis JF, Meichers WGS, Verweij HE. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2019;25(7):799-806.
- Kim JH, Cheng LW, Chan KY, Tam CC, Mahony N, Friedman M, et al. Antifungal drug repurposing. Antibiotics. 2020;9(11):1-29.
- Struelens SK, Fosso MY, Ganeva-Toulikova S. A combination approach to treating fungal infections. Sci Rep. 2015;5:1-11.

INTRODUCTION

One of the systems responsible for the recognition and repair of the errors occurring during cell replication is the DNA mismatch repair (MMR) system. Two major protein complexes constitute the MMR pathway: MutS, which recognizes the mismatch, and MutL, which correct the strand with the mistake. Here, we investigate four genes of the *A. fumigatus* MMR system, *msh2*, *msh6*, *pms1*, and *mlh1*, and their possible relation with azole resistance. We examined the MMR gene variations in 168 *A. fumigatus* genomes including azole-susceptible and resistant strains. The *msh6* (AFu4g08300), *msh2* (AFu3g09850), *pms1* (AFu2g13410) and *mlh1* (AFu5g11700) genes were analyzed. Results show that genes *msh2*, *pms1*, and *mlh1* had low genetic variability with only a few mutations detected in some strains, unrelated to their azole susceptibility phenotype. In contrast, the *msh6* gene had a nonsynonymous mutation (G240A) harbored by 42% of the strains, all of them closely related in the phylogenetic tree and with most of them also harboring the TR₃L98H azole resistance mechanism in the *cyp51A* gene. In this work, the gene *msh6* was deleted in an *akuB*^{KU80} *A. fumigatus* strain and the Δ *msh6* isolates were subjected to different fitness tests, azole susceptibility, and virulence assays using the *Galleria mellonella* alternative infection model, showing no differences compared with the *akuB*^{KU80} parental strain in any of the tests. Mutagenesis experiments were carried out exposing wild-type (WT) *msh6* and Δ *msh6* strains to different concentrations of three azole drugs, posaconazole and prochloraz and other non azole antifungal drugs used in crop protection, benomyl, boscalid and azoxystrobin.

MATERIAL AND METHODS



RESULTS

Phenotypic characterization

To characterize the *A. fumigatus* Δ *msh6* strains (T3 and T6), their growth under various stressors was compared to their parental wild-type strain (*akuB*^{KU80}). T3 and T6 showed no differences in growth at different temperatures (Fig 1A), nor upon being exposed to Congo Red or CFW (Fig 1B). T3 and T6 showed no change in azole susceptibility compared to *akuB*^{KU80} (Fig 2 and Table 1).

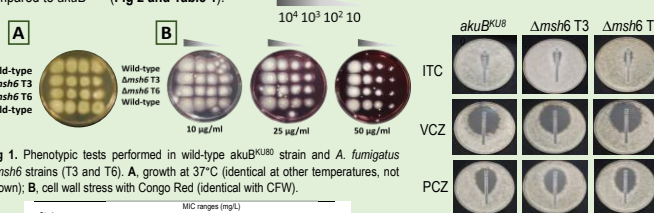


Fig 1. Phenotypic tests performed in wild-type *akuB*^{KU80} strain and *A. fumigatus* Δ *msh6* strains (T3 and T6). A, growth at 37°C (identical at other temperatures, not shown). B, cell wall stress with Congo Red (identical with CFW).

Strains	ITC	MIC ranges (mg/L)			NZ
		VZC	PCZ	VZC	
<i>akuB</i> ^{KU80}	1-1	0.5-0.5	0.125-0.25	1-1	
Δ <i>msh6</i> T3	0.5-1	0.5-1	0.125-0.25	0.5-1	
Δ <i>msh6</i> T6	0.5-1	0.5-0.5	0.25-0.25	1-1	

Table 1. MIC ranges (EUCAST) to azole drugs of *akuB*^{KU80} and Δ *msh6* *A. fumigatus* strains (T3 and T6).

Fig 2. Azole susceptibility tests (E-tests) performed on the *akuB*^{KU80} strain and the Δ *msh6* *A. fumigatus* strains (T3 and T6). ITC: Itraconazole, VZC: Voriconazole, POS: Posaconazole.

in vivo virulence

To determine whether there were any differences in virulence, the parental strain (Δ *akuB*^{KU80}), and the generated Δ *msh6* (T3 and T6) mutant strains, were tested in the *G. mellonella* alternative model of infection (Fig 3). *A. fumigatus* Δ *msh6* mutants had similar virulence size compared to their *akuB*^{KU80} parental strain independently of the inoculum size.

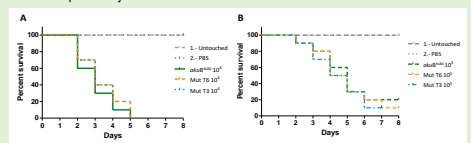


Fig 3. Survival curves of *G. mellonella* infected with 10^4 (A) and 10^5 (B) conidia per larvae of parental *A. fumigatus* strain (*akuB*^{KU80}) and *A. fumigatus* Δ *msh6* strains (T3 and T6). 20 larvae per group were incubated at 37°C. Each experiment was performed in duplicate at least 3 times and the results are shown as mean values. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software package (version 11.0) (SPSS Inc., USA). Kaplan-Meier survival curves were analyzed by using a log-rank (Mantel-Cox) test for significance. A p value < 0.01 was considered significant.

Mutagenesis experiments

The *akuB*^{KU80} wild type strain and the T3 and T6 Δ *msh6* strains were exposed to different concentrations of clinical azoles, DMI and non-azole fungicides supplemented in Minimal Medium agar plates to analyze if under pressure of these antifungals, the rate of resistant isolates was higher in *A. fumigatus* Δ *msh6* strains (Figure 3).

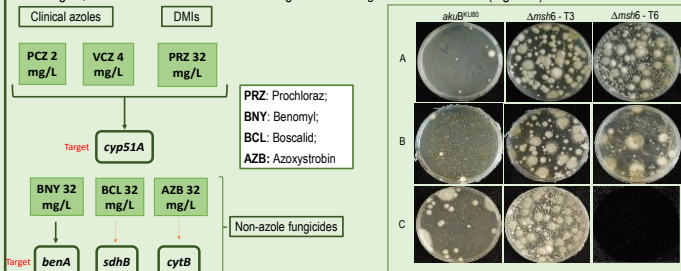


Fig 3. The parental *akuB*^{KU80} and the mutants Δ *msh6* (T3 and T6) strains (1×10^6 conidia) after boscalid exposure (MM + 32 mg/L) incubated for 7 days at 37°C. Three independent experiments (A, B) and C).

All obtained resistant colonies were isolated, subjected to PCR amplification of the corresponding target gene and sequenced. We found BNY resistant isolates harboring H270Y/L/R mutations in the *sdhB* gene in *akuB*^{KU80}, T3 and T6. And recovered several BCL resistant isolates harboring E198A/K/D/V/G and F200S mutations in the *BenA* gene in the *akuB*^{KU80}, T3 and T6.

Table 2: Analysis of the *Cyp51A*, *benA*, and *sdhB* polymorphisms and amino acid substitutions found in our set of 205 *A. fumigatus* *msh6* mutant strains.

Gene	Nucleotide position (codon)	Codon	Amino acid change	<i>akuB</i> ^{KU80}	Δ <i>msh6</i> -T3	Δ <i>msh6</i> -T6
<i>Cyp51A</i>	g160a	CggTgg	GS4W	16	31	8
	g160a	GggAgg	GS4R	0	1	0
	a593c	gAggCg	E198A	0	0	1
	g592c	GagCag	E198Q	0	0	0
	g592a	GagAag	E198K	0	8	0
	g594c	gaggAc	E198D	0	3	3
<i>benA</i>	a593c	gAggTg	E198V	0	1	0
	a593g	gAggGg	E198G	2	0	0
	1599a	lTcAcC	F200S	0	10	2
1599a	lTcAcA	F200Y	0	0	0	
a809f	cAcAcTc	H270L	0	9	3	
c808t	CacTAc	H270Y	3	7	7	
a809g	cAcAcGc	H270R	0	8	0	

CONCLUSIONS

The lack of *msh6* caused no apparent increase in the mutation rate to azole antifungals. In contrast, the Δ *msh6* strains generated 10- and 2-fold more boscalid, and benomyl-resistant mutants, respectively, showing a great variety of different mutations in each antifungal target genes. This study suggests a possible link between *Msh6* alterations and the development of *A. fumigatus* antifungal resistance.

REFERENCES

- Latge JP. *Clin Microbiol Rev.* 2019. 33:e00140-18.
- Garcia-Rubio R. *Drugs.* 2017. 77(6):599-613.
- Gonzalez-Jimenez I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021. 65(9)
- Garcia-Rubio R. *Genes (Basel).* 2018. 9(7):363.
- Boyce K. J. *Microorganisms.* 2022. 10(2)

FUNDING

This research was funded by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS P121CI100028). J. Lucio held a predoctoral fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria (F17CI100037). This Research is also supported by the Center for Biomedical Research in Infectious Diseases (CIBERINFEC-CB21/13/00105) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain.

CONTACT INFORMATION

Emilia Mellado
emellado@isciii.es

Distribution of *Aspergillus* Species and Prevalence of Azole Resistance in clinical and environmental Samples from a Spanish Hospital

P252

LUCIO J¹, CANO-PASCUAL S¹, HERNANDEZ-EGIDO S³, ROLDAN A², CUETARA M³ and E. MELLADO^{1,2}

¹Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain.

²Center for Biomedical Research in Network in Infectious Diseases (CIBERINFEC-CB21/13/00105), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

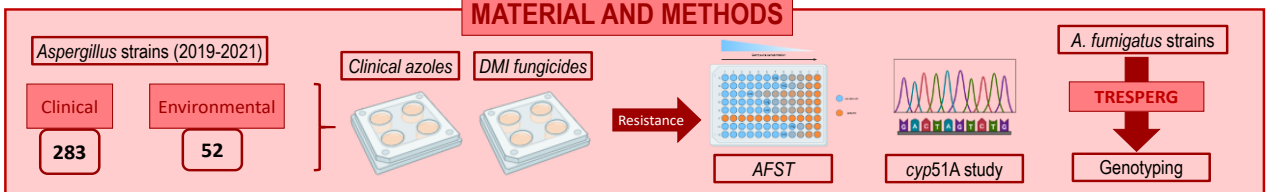
³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Severo Ochoa, Leganés, Madrid, Spain.



INTRODUCTION

Aspergillus species stand out as major opportunistic fungal pathogens, causing a broad spectrum of clinical manifestation, named aspergillosis (1). Since the last decade, the ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) has recommended epidemiological surveillance studies to keep updated locally azole susceptibility information due to the global increase of reports of azole-resistant *Aspergillus* spp. strains, especially *A. fumigatus* (2, 3). Although some methods for antifungal susceptibility testing (AFST) are used globally and are validated and standardized, they are available only in specialized centers and they are a time-consuming procedure, so it is useful in surveillance studies to employ screening methods, more affordable, simpler and faster to detect resistance to azoles, such as the 4-well screening method, a well known described method with an expanded version described and validated by our group to detect *A. fumigatus* azole-resistant strains, although it has to be confirmed by ASFT and *cyp51A* amplification and sequencing (4, 5). Besides, *A. fumigatus* genotyping is a very useful methodology to study population diversity and genetic relatedness of different isolates, both clinical and environmental, which has a huge impact in epidemiological studies (6). The aims of this study were to determine the *Aspergillus* species distribution and azole resistance prevalence in the isolates during this 3-year prospective surveillance study in a Spanish Hospital.

MATERIAL AND METHODS



RESULTS

Aspergillus spp strains

Among the *Aspergillus* strains recollected during the 3-year study period, *A. fumigatus* was the predominant species (174 isolates, 51.94%) followed by *A. niger* (50 isolates, 14.93%), *A. terreus* (32 isolates, 9.55%) and *A. flavus* (28 isolates, 8.36%), among other less frequent species (Table 1).

Table 1. *Aspergillus* species, number and percentages (%) of strains isolated by the 3 years study period.

<i>Aspergillus</i> species	No. of strains isolated (%)									
	2019		2020		2021		C		E	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
<i>A. fumigatus</i>	39 (41.05)	5 (5.3)	34 (35.8)	5 (5.3)	86 (45.5)	25 (17.2)	139 (41.5)	35 (10.45)		
<i>A. niger</i>	13 (13.7)	0	13 (13.7)	0	14 (8.65)	9 (6.2)	40 (11.9)	10 (3)		
<i>A. terreus</i>	8 (8.4)	0	13 (13.7)	1 (1.05)	10 (6.5)	0	31 (9.25)	1 (0.3)		
<i>A. flavus</i>	12 (12.6)	1 (1.05)	12 (12.6)	0	3 (2.1)	0	27 (8.1)	1 (0.3)		
<i>A. nidulans</i>	3 (3.2)	0	5 (5.3)	1 (1.05)	7 (4.8)	2 (1.4)	15 (4.5)	3 (0.9)		
<i>A. lentulus</i>	6 (6.3)	0	5 (5.3)	0	0	0	11 (3.3)	0		
<i>A. calidoustus</i>	2 (2.1)	0	0	0	1 (0.7)	0	3 (0.9)	0		
<i>A. carneus</i>	1 (1.05)	0	0	0	0	0	1 (0.3)	0		
<i>A. unguis</i>	1 (1.05)	0	2 (2.1)	0	0	2 (1.4)	3 (0.9)	2 (0.6)		
<i>A. candidus</i>	2 (2.1)	0	0	0	0	0	2 (0.6)	0		
<i>A. versicolor</i>	1 (1.05)	0	1 (1.05)	0	1 (0.7)	0	3 (0.9)	0		
<i>A. fumigatiifinis</i>	0	0	1 (1.05)	0	0	0	1 (0.3)	0		
<i>N. udagawae</i>	0	0	2 (2.1)	0	1 (0.7)	0	3 (0.9)	0		
<i>A. ochraceus</i>	0	0	0	0	3 (2.1)	0	3 (0.9)	0		
<i>A. sydowii</i>	0	0	0	0	1 (0.7)	0	1 (0.3)	0		
Total	88 (92.6)	7 (7.4)	88 (92.6)	7 (7.4)	107 (73.8)	38 (26.2)	283 (84.5)	52 (15.5)		

Azole susceptibility study

Only two *A. fumigatus* strains, one clinical and the other environmental, grew in all wells supplemented with clinical azole drugs and in the agar wells supplemented with the DMIs metronazole and epoxiconazole, a pattern that we have previously reported as a possible underlying azole resistance mechanism Cyp51A (TR_L/L98H or TR_L). Azole resistance was confirmed through AFST (MICs: >8 mg/L to itraconazole, 4 mg/L to voriconazole, 0.5 mg/L to posaconazole and 8 mg/L to isavuconazole). The rest of strains tested were considered azole-susceptible, thus prevalence of azole-resistant *A. fumigatus* was 1.15% (2 of 174 *A. fumigatus* strains). Amplification and sequencing of *cyp51A* revealed that these two azole-resistant *A. fumigatus* strains harbored a TR_L/L98H azole resistance mechanism.

Genotypic variability

Table 2. Genotypes shared between clinical and environmental *A. fumigatus* isolates.

Strain ID	Date of isolation	Source	TRESPERG typing			
			CSP	MP2	CFEM	ERG
H122	06/03/2020	Clinical	l01	m5.3	c08B	e07
H287	21/07/2021	Environmental	l01	m5.3	c08B	e07
H285	19/07/2021	Environmental	l03	m1.1	c05A	e07
H293	02/08/2021	Clinical	l03	m1.1	c05A	e07
H296	11/08/2021	Clinical	l03	m1.1	c05A	e07
H33	15/05/2019	Clinical	l03	m1.1	c08A	e07
H76	28/10/2019	Clinical	l03	m1.1	c08A	e07
H203	16/02/2021	Environmental	l03	m1.1	c08A	e07
H333	13/12/2021	Environmental	l03	m1.1	c08A	e07
H225	01/04/2021	Environmental	l03	m1.3	c08A	e09
H232	13/04/2021	Clinical	l03	m1.3	c08A	e09
H213	02/03/2021	Clinical	l03	m2.3	c07	e06
H283	19/07/2021	Environmental	l03	m2.3	c07	e06
H137	23/06/2020	Environmental	l04A	m1.1	c12	e15
H140	06/07/2020	Clinical	l04A	m1.1	c12	e15
H20	02/03/2019	Clinical	l04A	m1.3	c08A	e07
H108	12/02/2020	Clinical	l04A	m1.3	c08A	e07
H192	25/01/2021	Environmental	l04A	m1.3	c08A	e07
H141	15/07/2020	Clinical	l04A	m1.3	c08B	e07
H217	19/03/2021	Clinical	l04A	m1.3	c08B	e07
H230	08/04/2021	Clinical	l04A	m1.3	c08B	e07
H274	09/07/2021	Environmental	l04A	m1.3	c08B	e07
H96	07/01/2020	Environmental	l04A	m3.4	c20	e11
H97	03/01/2020	Clinical	l04A	m3.4	c20	e11
H278	12/07/2021	Environmental	l09	m5.3	c10	e07
H279	24/06/2021	Clinical	l09	m5.3	c10	e07
H282	19/07/2021	Environmental	l09	m5.3	c10	e07

Excluding some genotypes, 136 *A. fumigatus* isolates were included in the final genotypic analysis. A total of 99 different genotypes were identified according to the TRESPERG typing assay. The TRESPERG results showed a very diverse population with 72.73% of the total genotypes, being represented as a single genotype, with identical diversity regardless the origin, clinical or environmental (52.9%). Among the genotypes that were not unique, ten genotypes were shared between clinical and environmental strains, even between clinical isolates from different patients and environmental surveillance collected in different days (Table 2).

The genotypic diversity was graphically represented in Figure 1, in figure 1B, the genotypic diversity of azole-susceptible and azole-resistant isolates from this study was compared with a collection of TR_L/L98H azole-resistant *A. fumigatus* isolates which shown that azole-resistant isolates were highly related and grouped together in close clusters.

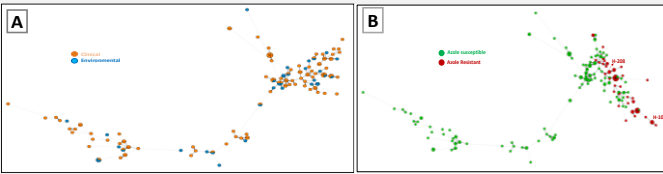


Figure 1. Minimum spanning tree (MST) showing the genotypic diversity *A. fumigatus* isolates from clinical (in orange) and environmental origin (in blue) (A), and the genotypic diversity of azole-susceptible (green) and azole-resistant (red) *A. fumigatus* isolates (B).

CONCLUSIONS

Resistance of the human pathogenic fungus *A. fumigatus* to azole drugs is rising. However, the link between patient infections and their potential acquisition from Hospital environmental sources remain vague. In this study, we found that *A. fumigatus* genotypes were highly diverse in both settings, emphasizing the highly mixed nature of *A. fumigatus* populations. However, identical clonal genotypes were found to occur both in the clinical isolates and in the environmental sampling, suggesting that patients hospitalized in different parts of the same hospital can be infected with the same strain as every patient might inhale the same spore population. The isolation of azole-resistant strains from a patient and from the hospital environment is an interesting finding, encouraging more analysis of clinical and environmental sources to detect azole resistance in *A. fumigatus*.

CONTACT INFORMATION

Emilia Mellado : emellado@isciii.es

FUNDING

This research was funded by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS P12/CIII/00028). J. Lucio held a predoctoral fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria (F17/CIII/00037). This Research is also supported by the Center for Biomedical Research in Infectious Diseases (CIBERINFEC-CB21/13/00105) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain.

REFERENCES

1. Latge JP. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 33:e00140-18.
2. ECDC. *Eur Cent Dis Control Tech Rep*. Online, February 28, 2013
3. Wiederhold NP. *Curr Opin Infect Dis*. 2020; 33(4):290-297.
4. Linden J. *Mycoses*. 2009; 52:19.
5. Lucio J. *Mycoses*. 2022; 65(2):178-185
6. Garcia-Rubio R. *Front Microbiol*. 2018; 9(JUL):1-9

