



# 16<sup>th</sup> Infocus

NOVIEMBRE 15 - 17 DE 2018

Santiago de Cali, Colombia

HOTEL INTERCONTINENTAL

# Identificación por secuenciación y por espectrometría de masas MALDI-TOF y evaluación de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de aislamientos clínicos de *Neoscytalidium* spp.

**Flórez-Muñoz Sindy V<sup>1</sup>, Gómez-Velásquez Juan C<sup>2</sup>, Loaiza Díaz Natalia<sup>2</sup>, Soares Célia<sup>3</sup>, Lima Nelson<sup>3</sup>, Mesa-Arango Ana Cecilia<sup>1</sup>**

1. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Grupo de Investigación Dermatológica (GRID), Cra 51D-# 62-29 Oficina 303, Edificio Manuel Uribe Ángel, Medellín Colombia.
2. Laboratorio Clínico Prolab. S.A.S. calle 19 A #44-25, piso 2, Medellín Colombia.
3. Micoteca da Universidade do Minho, CEB-Centro de Engenharia Biológica, Campus de Gualtar, Braga, Portugal.

Email: [sindy.florez@udea.edu.co](mailto:sindy.florez@udea.edu.co)

## Introducción

*Neoscytalidium* spp. son hongos dematiáceos, queratinofílicos que habitan en suelo y plantas. La taxonomía de este género ha sido problemática y constantemente revisada. Actualmente se reconocen las especies *N. novaehollandiae*, *N. orchidacearum* y *N. dimidiatum*, ampliamente distribuidos en regiones tropicales y subtropicales. Aunque estas especies son generalmente fitopatógenas, estudios han demostrado la implicación de *N. dimidiatum* en infecciones de piel, uñas, tejido celular subcutáneo y extracutáneo. La identificación de estos hongos se ha basado en la observación de las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos *in vitro*, lo que puede conducir a errores. Como alternativa se puede considerar la secuenciación y la espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF; esta última se utiliza con éxito en la identificación de bacterias y levaduras debido a la rapidez y costo-efectividad. Sin embargo, en la identificación de hongos filamentosos aún presenta inconvenientes. Por otro lado, *N. dimidiatum* es poco sensible a diferentes antifúngicos de uso clínico. Considerando lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar aislamientos clínicos de *Neoscytalidium* spp. por secuenciación y por EM MALDI-TOF y evaluar la susceptibilidad *in vitro* a tres antifúngicos.

## Materiales y métodos

La identificación de especie se llevó a cabo amplificando y secuenciando la región no codificante ITS-1+5.8SADNr+ITS-2 de 26 aislamientos de *Neoscytalidium* spp. recolectados entre 2016 y 2017 en el laboratorio clínico Prolab S.A.S. (Medellín-Colombia). Las secuencias se compararon con la base de datos BLASTN y un análisis filogenético

empleando MEGA v7. Para la identificación por EM MALDI-TOF, se fabricó el espectro de referencia, usando el sistema Microflex (Bruker, Daltonics, Alemania) empleando extracto protéico de micelio de 72 horas de crecimiento de la cepa *N. dimidiatum* MUM 17.21. La identificación de género se hizo con una puntuación entre 1,700 y 1,999, de especie >2,00 y no identificación <1,700. La susceptibilidad antifúngica se evaluó de acuerdo al protocolo del Comité Europeo para la Evaluación de la Susceptibilidad Antifúngica para hongos filamentosos. Anfotericina B e itraconazol se evaluaron en un rango de concentración entre 16 µg/mL y 1 µg/mL; terbinafina entre 4 µg/mL y 0,25 µg/mL.

### **Resultados**

De acuerdo a los resultados de la secuenciación, los 26 (100%) aislamientos fueron identificados como *N. dimidiatum*, con una identidad >99%. En el análisis filogenético, todos los aislamientos fueron asociados al clado de la secuencia *ex-tipo* de *N. dimidiatum*, con un soporte de rama de 70 %. Por EM MALDI-TOF, 25 (96%) aislamientos fueron identificados como *N. dimidiatum* y 1 (4%) como *Neoscytalidium* spp. El 54% de los aislamientos mostraron valores de CMI a terbinafina  $\leq 0,25$  µg/mL y a anfotericina B el 23%  $\leq 1$  µg/mL, mientras que para itraconazol el 96% fue  $\geq 16$  µg/mL.

### **Conclusiones**

La identificación por secuenciación confirmó que *N. dimidiatum* fue la única especie aislada en este trabajo. EM MALDI-TOF demostró ser un método adecuado para la identificación de *N. dimidiatum* debido a que solo un aislamiento no se correspondió con la secuenciación. Este aislamiento será estudiado con mayor detalle utilizando otros marcadores (calmodulina y beta-tubulina). Los resultados de las CMI indican que terbinafina fue el antifúngico más efectivo *in vitro* para *N. dimidiatum*

### **Agradecimientos**

CODI-UDEA proyecto 2604 y Laboratorio clínico Prolab S.A.S.