

Identificación de especies de *Neocosmospora* asociadas a micosis humanas usando MALDI-TOF.

Marcela Gutiérrez-Pardo¹, Marcela Guevara-Suarez², Claudia Parra-Giraldo³, Adriana Marcela Celis-Ramírez¹

¹ Grupo Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá D.C., Colombia.

² Laboratorio de Micología y Fitopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá D.C., Colombia.

³ Unidad de Proteómica y Micosis Humanas, Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

Resumen

Algunas especies de fusaria que se encuentran en los géneros *Fusarium* y *Neocosmospora* se han reportado como saprofitos de suelo asociados a enfermedades en plantas, animales y humanos, donde el rango de infección puede incluir desde infecciones superficiales como onicomicosis y queratitis hasta infecciones diseminadas. En los últimos años, las infecciones ocasionadas por estos géneros han incrementado, con una alta tasa de falla terapéutica. Por otra parte, la clasificación taxonómica actual es controversial haciendo igualmente difícil la correcta identificación de estos hongos. Con lo cual implementar otros métodos además de los que actualmente se utilizan con los acercamientos convencionales mediante el uso de criterios morfológicos y la identificación molecular son necesarios para hacer el diagnóstico oportuno de estas infecciones de forma acertada y rápida. Es por esto, que el MALDI-TOF es una alternativa novedosa para el diagnóstico de estas infecciones, sin embargo, debido a dichos cambios taxonómicos dentro de este grupo de hongos, es importante la actualización de las bases de datos de las mismas. El objetivo del presente estudio fue caracterizar un grupo de aislamientos clínicos de *Neocosmospora* usando MALDI-TOF. Para ello, se procedió a hacer una confirmación molecular de la subunidad ARN polimerasa (RPB2) para los aislamientos a evaluar y posteriormente se realizó el protocolo de MALDI-TOF para su identificación. Entre los resultados obtenidos, se encuentra que MALDI-TOF tuvo un nivel de concordancia aceptable estadísticamente con la identificación molecular ya que esta identificó a nivel de complejo al que pertenecían los aislamientos. Sin embargo, y dado las inconsistencias obtenidas en este estudio, es necesario llevar a cabo análisis adicionales que permitan asertivamente actualizar las bases de datos de MALDI-TOF.

Introducción

Los géneros *Fusarium* y *Neocosmospora* pertenecen al Phylum *Ascomycota*, las especies de estos dos géneros tienen caracteres micro morfológicos similares por lo cual son conocidos como especies fusaria. Se caracterizan por ser saprofitos de suelo y se han reportado como fitopatógenos de cultivos de importancia agrícola donde la principal enfermedad asociada es la marchitez vascular (Valencia, 2009). Sin embargo, en humanos varias especies se han asociado a infecciones superficiales y oportunistas. En individuos inmunocompetentes se han reportado en casos de onicomicosis y queratitis mientras que, en pacientes inmunocomprometidos, especialmente neutropénicos, puede generar infecciones diseminadas (Diepeningen et. al 2014).

Durante años, el género *Fusarium* ha sido clasificado en complejos de especies, donde los más comunes en infecciones a humanos han sido: *Fusarium chlamydosporum* (FCSC),

Fusarium fujikuroi (FFSC), *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), *Fusarium oxysporum* (FOSC) y *Fusarium solani* (FSSC), (Guarro, 2013). En algunos de estos complejos se aceptaban clasificaciones adicionales con el fin de evidenciar la diversidad genética en estos, por ejemplo: los clados de FSSC, era nombrados con un número seguido de letras en minúsculas para distinguir especies y haplotipos multilocus (FSSC 5a) (O'Donnell et.al, 2008). Varios de estos clados fueron renombrados y asumieron la categoría de especie: FSSC 1 (*F. Petroliphilum*), FSSC 2 (*F. keratoplasticum*), FSSC 3+4 (*F. falciforme*) (Al-Hatmi et.al, 2018).

No obstante, *Fusarium* ha tenido una reclasificación de los complejos teniendo en cuenta los análisis filogenéticos con diferentes marcadores moleculares, los cuales han revelado que es un grupo polifilético (Lombard et al. 2015). Uno de los principales cambios taxonómicos en el género se realizó en el complejo de especies de *F. solani*, el cual fue reclasificado en el género *Neocosmospora*, esta clasificación es controvertida y aunque esta aceptada por MYCOBANK, algunos estudios clínicos siguen designado las especies como FSSC. Actualmente, el género *Neocosmospora* incluye aproximadamente 17 especies donde las especies frecuentemente reportadas corresponden a *N. falciformis* (*F. falciforme*), *N. keratoplastica* (*F. keratoplasticum*), *N. petroliphila* (*F. petroliphilum*) y *N. solani* (*F. solani*); más varias especies filogenéticas que actualmente se encuentran sin nombre (Sandoval-Denis et al. 2018).

En Colombia, son pocos los estudios que evalúan la prevalencia de fusaria asociadas a infecciones en humanos. Uno de los primeros estudios en realizar identificación a nivel de especie fue realizado por Castro y colaboradores (2009), en el cual de un total de 128 aislamientos se identificaron en tres especies: *F. solani* (actualmente *Neocosmospora*), *F. oxysporum* y *F. verticillioides* (Castro et al. 2009). Posteriormente Guevara-Suárez y colaboradores (2016) realizaron una nueva caracterización de especies asociadas a pacientes con onicomicosis, este estudio incluyó una caracterización multilocus permitiendo la identificación de especies que anteriormente no habían sido asociadas en nuestro país, tales como: *F. keratoplasticum* (ahora *Neocosmospora keratoplastica*), *F. petroliphilum* (ahora *Neocosmospora petroliphila*) (Guevara-Suárez et al, 2016).

Lograr la delimitación e identificación morfológica de especies en *Neocosmospora* y los géneros relacionados es una tarea difícil, especialmente entre las especies patógenas humanas (Sandoval-Denis et al. 2018) y sumado a la controversia con la clasificación taxonómica se hace necesario buscar alternativas a la identificación tradicional de los laboratorios clínicos (examen morfológico) que permitan una identificación asertiva de especies. Aunque las técnicas moleculares son útiles, estas pueden llegar a ser costosa y dispendiosa. Por ello, es necesario implementar y estandarizar métodos que permitan la detección rápida y eficiente para dar un diagnóstico oportuno a pacientes con infecciones causadas por hongos filamentosos.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (acrónimo en inglés MALDI-TOF), es una técnica que se basa en las huellas digitales espectrales de las proteínas que varían entre microorganismos, donde algunos picos son específicos del género, otros de la especie y en algunas ocasiones de la subespecie (Maldonado, et.al 2017). Para especies como *Fusarium* se ha reportado la caracterización aislamientos obtenidos de muestras clínicas, donde los resultados de la espectrometría de masas y la identificación molecular coincidieron en cinco de los seis casos y se obtuvieron en una hora, lo que convierte esta técnica en una herramienta valiosa para identificar aislamientos clínicos de *Fusarium* a nivel de especie

(Marinach-Patrice et al., 2009). Sin embargo, dado el cambio taxonómico mencionado anteriormente, es importante actualizar las bases de datos de MALDI-TOF con el objetivo de tener mejor sensibilidad y especificidad en el momento de hacer la identificación.

El objetivo de este estudio fue caracterizar aislamientos clínicos de *Neocosmospora* provenientes de muestras de pacientes con onicomycosis en Colombia mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF.

Metodología

1. Aislamientos y condiciones de cultivo

Los aislamientos correspondientes a las especies de fusaria provenientes de muestras de pacientes con onicomycosis, fueron reactivados a partir del cepario del grupo de investigación Celular y Molecular de microorganismos patógenos (CeMoP) de la Universidad de los Andes. Para este estudio los aislamientos trabajados fueron: *N. falciformis*: (LEMM 110148) y (LEMM 110266). *N. keratoplastica*: (LEMM 121472), (LEMM 121340), (LEMM 110157), (LEMM 121607), (LEMM 110107), (CIB 8) y (CIB 10). *N. lichenicola*: (LEMM 122004). *N. petrophila*: (LEMM 121371) y (LEMM 110676). *N. metavorans*: (CIB 9) del complejo de especies *F. solani* (Formalmente *N. solani*) y del complejo *F. oxysporum* (CIB 5), (CIB 31), (LEMM 110358) Y (LEMM 110787) (Guevara-Suárez et al., 2016).

Los aislamientos se encontraban conservados en frascos con agua destilada estéril, los cuales se reactivaron colocando un fragmento conservado en medio Potato Dextrosa Agar (PDA; Becton Dickinson, Estados Unidos) suplementado con cloranfenicol. Los cultivos fueron incubados a 25°C por 7 días en oscuridad.

2. Confirmación de los aislamientos de Fusaria (*Fusarium* y *Neocosmospora*).

Extracción ADN

Para obtener el ADN de los aislamientos evaluados, se tomó con cuchilla estéril el micelio en tubos eppendorf y se sometió a lisis mecánica mediante perlas de vidrio por 40 segundos. Conforme al protocolo de Cenis se realizaron las siguientes modificaciones: Se añadieron 300 ul de Acetato de Sodio 3M, cloroformo/ isopropanol (relación 1:2) y se realizaron dos lavados de etanol al 70% de 1 ml y 400 ul respectivamente. Finalmente, en 100 ul de H₂O PCR se resuspendió el producto obtenido y fue llevado a -20°C para su posterior uso (Cenis, 1992).

Secuenciación ADN

Con el fin de confirmar que las muestras pertenecían a las especies de *Neocosmospora* anteriormente mencionadas, se realizó una identificación molecular basada en la segunda subunidad del ARN polimerasa (RPB2) con los primers F5 (GGGGWGAYCAGAAGAAGGC) /7CR (CCCATRCGCTTGYYTTRCCAT) (Acevedo, 2013).

La reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) comprende una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94 °C por

45 s, hibridación a 55 °C por 1 min, extensión de 72 °C por 1 min y una elongación final de 72 °C por 10 min con los primers RPB2-5F y RPB2-7CR. A continuación, los productos obtenidos se enviaron al GenCore de la Universidad De Los Andes (Cra 1 N.º 18 A 10 - Bloque A). La edición de secuencias de los aislamientos con el programa Geneious prime 2019.2 (www.geneious.com). Seguido a esto se realizó un análisis filogenético usando Máxima Verosimilitud (ML) (www.ngphylogeny.fr), teniendo como soporte de las ramas un bootstrap de 1000.

3. MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight)

Para la identificación de los aislamientos mediante la tecnología MALDI-TOF, los aislamientos se cultivaron agar Sabouraud (Oxoid, Reino Unido) durante 48 horas a 25°C, de donde se tomó con escobillón estéril los conidios que se pasaron a un tubo de vidrio con 4 mL de caldo Sabouraud. Estos tubos fueron colocados en un rotor por 48 horas a 14000 rpm. Para la extracción de material fúngico se siguió el protocolo establecido por Bruker con modificaciones de Prieto-Núñez 2018, donde una vez secó el pellet se agregó 100 ul ácido fórmico y 100 ul de acetonitrilo.

4. Análisis estadístico (Kappa de Cohen)

Para comparar los resultados obtenidos mediante la identificación molecular y MALDI-TOF, se tomaron los complejos a los que pertenecían los aislamientos (FSSC y FOFC) y que fueron arrojados por ambos métodos y se utilizó el índice estadístico Kappa de Cohen el cual mide la concordancia de los resultados obtenidos mediante dos métodos diferentes, donde más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia de los datos evaluados, por el contrario, mientras más cercano a -1, mayor es el grado de discordancia (Cerdeira, Villarreal. 2008).

$$K = \frac{p_1 - p_e}{1 - p_e}$$

De la comparación entre los dos métodos tenemos 12 variables, las cuales corresponden a 6 de análisis molecular y 6 al análisis mediante MALDI-TOF. Las variables de entrada corresponden al complejo al que pertenece cada aislamiento para observar así la concordancia entre ambos métodos.

Resultados

De un total de 17 aislamientos escogidos, solamente 16 pudieron ser identificados molecularmente. Para el aislamiento faltante no obtuvimos una amplificación de la región de interés, por lo que no se realizó su identificación. La Tabla 1 muestra los resultados de la secuenciación junto con su con un respectivo porcentaje de similitud con las especies de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

A partir de estas secuencias, el análisis filogenético obtenido se muestra en la Figura 1, el cual fue evaluado mediante un análisis de máxima verosimilitud. Por último, la Figura 2 muestra el dendrograma de los datos obtenidos mediante MALDI-TOF de las 6 especies evaluadas. La Tabla 1 contiene la comparación entre los resultados moleculares y los de MALDI-TOF, los cuales muestran el complejo de las especies evaluadas tales como *F.solani* y *F.oxysporum*. La distinción del índice de Kappa de Cohen entre estos dos métodos se

realizó en base a la similitud del complejo donde 5 de los 6 aislamientos concordaron con lo esperado. Estas similitudes son de acuerdo a proteínas detectadas por el espectrómetro de masas que son propias de género y especie. Los aislamientos de fusaria (*Fusarium* y *Neocosmospora*) identificados por esta técnica fueron 6 de las 17 iniciales.

Tabla 1. Identificación molecularmente de los aislamientos evaluados mediante la amplificación de la región RPB2 y el resultado obtenido mediante MALDI-TOF.

Muestra	Código	Porcentaje de similitud	ID NCBI	ID Guevara-Suarez et al. (2016)	ID MALDI-TOF
F1	LEMM 121371	100.00%	<i>Fusarium petrophilum</i> strain JMRC: NRZ: 0086	<i>Fusarium petrophilum</i>	<i>Fusarium solani</i>
F2	LEMM 110676	99.00%	<i>Fusarium petrophilum</i> strain JMRC: NRZ: 0575	<i>Fusarium petrophilum</i>	<i>Fusarium solani</i>
F3	LEMM 122004	100.00%	<i>Fusarium petrophilum</i> strain JMRC: NRZ: 0086	<i>Fusarium lichenicola</i>	<i>Fusarium solani</i>
F4	CIB 9	99.65%	<i>Fusarium metavorans</i> strain NRRL: 43717	<i>Fusarium metavorans</i>	—
F5	LEMM 110148	100.00%	<i>Fusarium falciforme</i> strain FsDAG44	<i>Fusarium falciforme</i>	—
F6	LEMM 110266	99.42%	<i>Fusarium falciforme</i> strain ATS4.1	<i>Fusarium falciforme</i>	—
F7	LEMM 121472	99.00%	<i>Fusarium solani</i> isolate MAV	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	—
F8	CIB 10	99.86%	<i>Fusarium solani</i> isolate MAV	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	—
F9	LEMM 121340	99.65%	<i>Fusarium solani</i> isolate MAV	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	—
F10	LEMM 110157	99.54%	<i>Fusarium solani</i> isolate MAV	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
F11	CIB 8	99.87%	<i>Fusarium oxysporum</i> strain FoDAG38	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	—
F12	LEMM 121607	99.33%	<i>Fusarium solani</i> isolate MAV	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	—
F14	CIB 5	99.39%	<i>Fusarium oxysporum</i> strain CBS 133023	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
F15	CIB 31	99.76%	<i>Fusarium oxysporum</i> strain FoDAG38	<i>Fusarium oxysporum</i>	—
F16	LEMM 110358	99.18%	<i>Fusarium sp.</i> FSSC strain JMRC: NRZ: 0233	<i>Fusarium oxysporum</i>	—
F17	LEMM 110787	97.24%	<i>Fusarium solani</i> isolate MAV	<i>Fusarium oxysporum</i>	—
S.E	43941	—	<i>Fusarium solani sensu stricto</i>	—	<i>Fusarium solani</i>

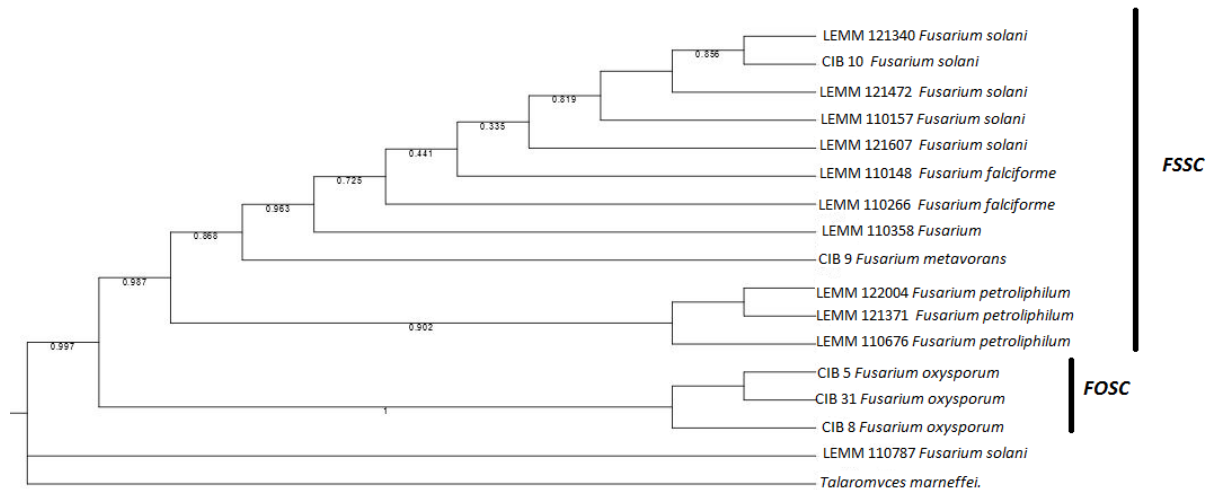


Figura 1. Árbol filogenético basado en la región RPB2 que muestran la relación filogenética de los aislamientos evaluados en este estudio mediante el método de Máxima Verosimilitud (ML), con un soporte de las ramas significativo >70% (0.07). Como outgroup *Talaromyces marneffei* ATCC 18224 (002153105.1).

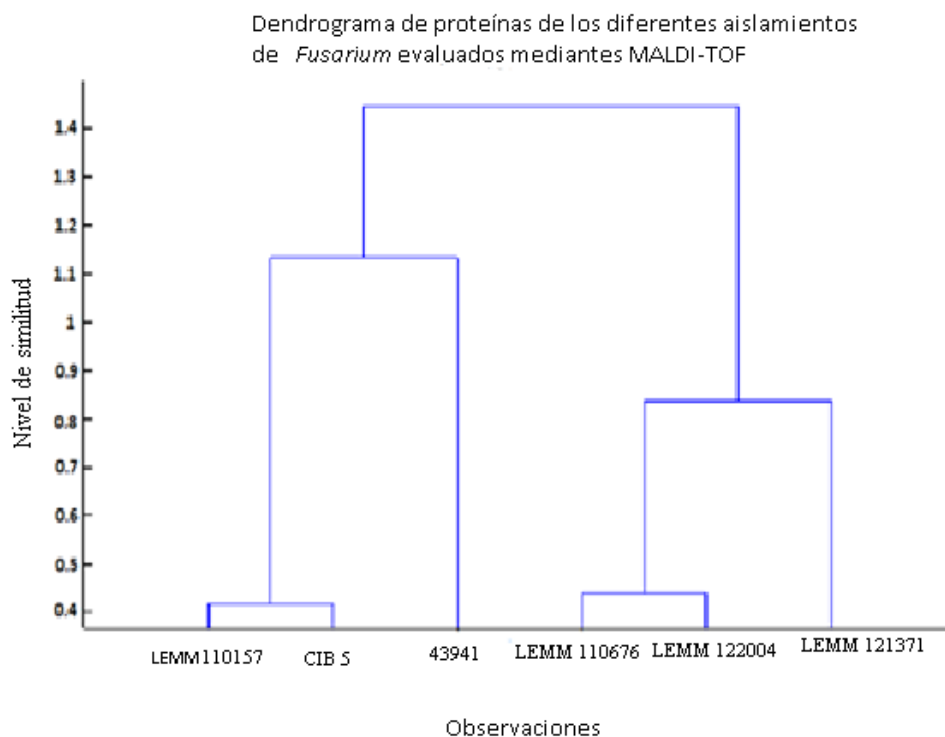


Figura 2. Dendrograma de proteínas de los aislamientos de fusaria analizados mediante MALDI-TOF. En el eje X se encuentran los aislamientos evaluados y en el eje Y el nivel de similitud de las proteínas, donde entre menor es el valor de este nivel mayor es la relación entre las observaciones. Los aislamientos identificados mediante esta técnica fueron: 1. *N. solani* (110157) 2. *N. petrophilum* (110676) 3. *N. petrophilum* (121371) 4. *N. petrophilum* (122004) 5. *N. solani* (43941) y 6. *Fusarium oxysporum* (CIB 5).

Discusión

La secuenciación de los aislamientos evaluados permitió observar que 16 de los 17 aislamientos fueron identificados mediante la región RPB2, que como se muestra en la tabla

1, presentan porcentajes de similaridad con la base de datos NCBI entre un 97%-100%. Para el aislamiento correspondiente a LEMM 121607 no se obtuvo una amplificación correcta y por ende no hubo identificación. Lo anterior pudo ser posible debido a la calidad de ADN obtenido, ya que, para lograr una adecuada amplificación, se debe garantizar una extracción y purificación correcta del ADN que proporcione resultados confiables (Monroy-Vaca et.al, 2014).

El árbol filogenético que se obtuvo a partir de la amplificación de la región RPB2 (977 pb) para cada uno de los aislamientos, permitió la identificación de los aislamientos en relación a los complejos previamente establecidos. Sin embargo, en el caso del aislamiento LEMM 110787 hubo discordancias en la identificación, previamente había sido identificado como *F. oxysporum*. Sin embargo, mediante la identificación molecular realizada en el presente estudio, este aislamiento fue identificado como *F. solani*. Adicionalmente, este aislamiento se encuentra relacionado de manera más estrecha con *Fusarium oxysporum* que con el complejo *Neocosmospora solani*. A pesar de que estas especies se encuentran relacionadas filogenéticamente, la distinción entre complejos se ha basado en grandes diferencias genéticas, derivadas de un origen filogenético diferente de estos (Hena-Hena et.al, 2018). Por lo cual, los resultados obtenidos son incongruentes, debido posiblemente a errores en la manipulación de los aislamientos (contaminación), con lo cual es necesario plantear nuevos análisis que permitan reportar resultados confiables.

MALDI-TOF por otro lado, mostró ser una herramienta eficaz en la identificación del complejo al que pertenecían los 6 aislamientos evaluados, debido a que el índice Kappa de Cohen fue igual a 2.16 (aceptable). Sin embargo, a pesar de que es una técnica que permite identificar aislamientos en un menor tiempo los resultados obtenidos dependen directamente de la disponibilidad de bases de datos asociada a los aislamientos, además de la adecuada extracción de proteínas para los aislamientos. Por ello, es necesario nutrir las bases de datos con las que se están comparando las proteínas aisladas teniendo en cuenta la reubicación taxonómica de FSSC en el género *Neocosmospora*, permitiendo así mejorar el diagnóstico de infecciones asociadas con este hongo.

El dendrograma muestra las asociaciones entre los aislados ya que las proteínas evaluadas corresponden a un conjunto de proteínas conservadas entre especies que son afectadas en un grado mínimo por las condiciones ambientales del cultivo (Maldonado et.al, 2017). Este análisis permitió establecer las relaciones entre los aislamientos LEMM 122004, LEMM 121371 y LEMM 110676, los cuales corresponden a *Neocosmospora petrophila* que pertenecen al complejo *Fusarium solani* (*N. solani*) como se observa en la filogenia de igual manera. No obstante, la relación observada entre el aislamiento CIB 5 y LEMM 110157 arrojada por el dendrograma no concuerda con lo obtenido molecularmente, este resultado puede ser debido a la similitud de los espectros de estas y las bases de datos con las que son comparadas (Prieto-Núñez, 2018).

En un estudio realizado por Triest y colaboradores en el 2015, se resalta la importancia de tener una biblioteca actualizada y con mayor información para tener una identificación más precisa respecto a la especie y no solamente a su complejo. La biblioteca usada por Triest, incluyó varias especies de este género, lo que permitió identificar *Fusarium keratoplasticum* (*N. keratoplastica*) y *Fusarium falciforme* (*N. falciformis*) como *Fusarium solani* (*N. solani*) y no solamente como *Fusarium* (*Neocosmospora* actualmente) (Triest, D et.al,2015).

En conclusión, los aislamientos que se identificaron mediante técnicas moleculares y el uso del espectrometría de masas MALDI-TOF mostraron un grado de concordancia estadísticamente aceptable entre ellos, así MALDI-TOF es una técnica valiosa que permite identificar aislamientos en un tiempo más corto. Este trabajo permitió tener un acercamiento de diversos aislamientos de muestras clínicas en Colombia a esta tecnología, resaltando así la necesidad de mejorar las bases de datos con las que se trabaja para que la identificación de estos hongos no sea solamente del complejo al que pertenecen sino de especie. Además, de acuerdo a las inconsistencias que fueron obtenidas durante este estudio, es necesario llevar a cabo nuevos análisis que permitan tener conclusiones más acertadas.

Referencias

- Acevedo, Y. (2013). Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras clínicas. Universidad Nacional de Colombia.
- Al-Hatmi, A. Ahmed, S. Diepeningen,, A. Drogari-Apiranthos, M. Verweij, P. Meis, J. G Sybren de Hoog. *Fusarium metavorans* sp. nov.: The frequent opportunist ‘FSSC6’
- Castro López, N. Casas, C. Sopo, L. Rojas, A. Del portillo, P. Cepero de García, MC. Restrepo, S. (2009). *Fusarium* species detected in onychomycosis in Colombia. *Mycoses*. Vol 52, 350-356.
- Cenis, J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, Vol. 20, No. 9.
- Cerda, J. Villarroel, L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría* 54-58.
- Diepeningen, A. D., Al-Hatmi, A. M., Brankovics, B., & Hoog, G. S. (2014). Taxonomy and Clinical Spectra of *Fusarium* Species: Where Do We Stand in 2014?
- Guarro, J (2013). Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Vol 32, 1491–1500.
- Guevara-Suárez, M. Cano-Lira, J. Cepero de García, MC. Sopo, L. De Bedout, C. Cano LE. García, AM. Motta, A. Amézquita, A. Cárdenas, M. Espinel-Ingroff, A. Guarro, J. Restrepo, S. Celis, A. (2016). Genotyping of *Fusarium* isolates from onychomycoses in Colombia: Detection of two new species within the *Fusarium solani* species complex and in vitro antifungal susceptibility testing. *Mycopathologia*. Vol 181, 165-174.
- Henao-Henao, E. Hernandez-Medina, C. Salazar-Gonzalez, C. Velasco-Belalcazar, M. Gómez-López, E. (2018). Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia. *Agron. Mesoam* vol.29 n.1
- Maldonado, N. Robledo, C. Robledo, J. (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*; 22(1):35-45.

Marinach- Patrice, C.Lethuillier, A. Marly, A. Brissas, J. Gene, J. Symoens, F. Datry, A. Guarro, J., Mazier, D, Hennequin, C.(2009). Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates.

Monroy-Vaca, E. Hernández-Andreu, C. Díaz-Rodríguez, R. Martínez-Machín, G. Illnaih Zaragozaí, M. Perurena-Lancha, M. (2014). Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *Histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. Vaccimonitor vol.23 no.2

Lombard, L., Van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, 80, 189-245.

O' Donnell,K. Sutton, D. Fothergill, A. McCarthy, D. Rinaldi, M. Brandt, M. Zhang, N. Geiser. D. (2008). Molecular Phylogenetic Diversity, Multilocus Haplotype Nomenclature, and In Vitro Antifungal Resistance within the *Fusarium solani* Species Complex. *Journal of Clinical Microbiology*.

Prieto-Nuñez, N. (2018). Establecimiento de Protocolos Operativos Estándar (POE) para la Identificación de hongos filamentosos patógenos para el humano relacionados con los filos Ascomycota y Mucoromycota por la tecnología MALDI-TOF /MS. Universidad Pontificia Javeriana. Unidad de Investigación en Proteómica y Micosis Humanas.

Sandoval-Denis, M. Crous, P. W. (2018). Removing chaos from confusion: assigning names to common human and animal pathogens in *Neocosmospora*.

Triest, D. Stubbed, D. De Cremer, K. Piérard, D. Normand, A. Piarroux, R. Detandt, M. Hendrickx, M. (2015). Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Molds of the *Fusarium* Genus. *Journal of Clinical Microbiology*.

Valencia, M. (2009). Caracterización enzimática de cepas de *Fusarium* aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas. Pontificia Universidad Javeriana.