



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de
Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus*
fumigatus por AFLP”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A

OSCAR NAVA RAMÍREZ



DIRECTORA DE TESIS: M en C. ESPERANZA DUARTE ESCALANTE

MÉXICO, D. F.

AGOSTO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Nava
Ramírez
Oscar
57 65 38 89
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099240099

2. Datos del tutor

M. en C.
Esperanza
Duarte
Escalante

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Joaquín
Cifuentes
Blanco

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María del Rocío Alicia
Reyes
Montes

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
María Cristina Julia
Pérez
Reyes

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Elva
Bazán
Mora

7. Datos del trabajo escrito.

Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus fumigatus* por AFLP.
61 p
2010

Agradecimientos a:

La DGAPA, por el financiamiento del proyecto “Modo de reproducción y variación genética de aislados del hongo *Aspergillus fumigatus* obtenidos en México y otros países de Latinoamérica” (IN-224706-3).

Comité sinodal:

Presidente:	Dr. Joaquín Cifuentes Blanco
Vocal:	Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes
Secretario: Tutor	M. en C. Esperanza Duarte Escalante
Suplente:	M. en C. María Cristina Julia Pérez Reyes
Suplente:	Biól. Elva Bazán Mora

El presente trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio de Micología Molecular bajo la dirección de la M. en C. Esperanza Duarte Escalante y la asesoría de la Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Directora

M. en C. Esperanza Duarte Escalante

Asesora

Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes

AGRADECIMIENTOS

➤ A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. Gracias por la grata experiencia que resulto aprender en tus aulas, estudiar en tu biblioteca y recorrer tus pasillos; gracias por los excelentes docentes que proporcionaste para mi formación ética y profesional, así como las excelentes personas con las que entable amistad dentro de tus muros. Gracias por todo.

➤ A mis profesores de la carrera de Biología. Gracias a todos aquellos que me enseñaron a esforzarme más allá del mínimo, a aquellos que con paciencia y disposición entregaron tiempo extra de su tiempo para atender dudas y dejar claro lo que se trataba de explicar, a los que ampliaron los horizontes de mi curiosidad e imaginación, a los que me enseñaron a darle el enfoque humano a la rígida teoría y a aquellos de quien verdaderamente se disfrutaba entrar a clase, gracias a todos aquellos que me introdujeron en este basto y complejo mundo de la biología.

➤ A mi directora de tesis, M. en C. Esperanza Duarte Escalante por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo, por todos sus consejos y observaciones así como la adecuada dirección del mismo. Pero sobre todo gracias por enseñarme que comprender un poco mejor como trabaja la naturaleza es la recompensa del arduo trabajo en el laboratorio. Gracias por todo.

➤ A la Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes jefa del Laboratorio de Micología Molecular por el apoyo brindado en esta tesis y permitirme trabajar en su laboratorio. Gracias.

➤ A los miembros de mi comité sinodal Dr. Joaquín Cifuentes Blanco, M. en C. María Cristina Julia Pérez Reyes y Biól. Elva Bazán Mora, por todos los consejos y

recomendaciones hechas en la escritura y estructura de la tesis. Muchas gracias por su apoyo y por su disposición para formar parte de mi sinodio.

➤ A la Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro del Instituto de Ciencias de la Atmósfera, por integrarme como alumno de su taller y sobre todo, gracias por permitirme continuar hacia la culminación de mi carrera. Sin su apoyo esto quizás no hubiera sido posible.

➤ A la QFB. María Guadalupe Frías de León por sus consejos técnicos durante el trabajo experimental, así como a la Biól. Monzerrat Zavala Hernández, a quienes ante todo agradezco su amistad.

➤ A los miembros de los laboratorios de Micología Básica (Amelia y Hortensia) y Micología Medica (Blanca y Erica), gracias de verdad principalmente por su amistad y por su puesto por sus asesorías técnicas cuando me encontraba sin saber que hacer en medio de instrumentos que no sabía manejar.

DEDICADO A:

❖ Mi Mamá, Leticia Ramírez García y mi Papá, Manuel Nava García

Gracias, gracias por todo, por haberme dado la vida, por cuidarme, por apoyarme, todo se los debo a ustedes, en mis éxitos y fracasos siempre han estado ahí y se que seguirán ahí hasta que la vida lo permita. Gracias padres. Sigamos unidos que buenos momentos nos esperan.

❖ Mi abuelita Consuelo Ramírez García

Por enseñarme que no importa que la vida no juegue a nuestro favor, no debemos dejarnos vencer por las adversidades, que el esfuerzo propio es el camino hacia la superación personal y que alcanzar nuestros objetivos es lo que verdaderamente nos da valor como personas. Muchas gracias por todo, pero sobre todo gracias por su amor maternal.

❖ A mis abuelos María del Carmen García Hernández y José Guadalupe Nava Flores

Fue poco el tiempo que tuve la oportunidad de convivir con ustedes, sin embargo donde quiera que estén, les dedico este esfuerzo.

❖ Al resto de mi Familia

A mi hermana, tíos, tías, primos, primas, así como a la nueva generación que viene detrás de mí, este esfuerzo se los dedico a todos ustedes.

❖ A mis amigos de la Facultad

Que hubieran sido estos años sin su grata compañía. Gracias a mis amigos de biología, y por supuesto a mis camaradas de matemáticas, actuarial, física y ciencias de la computación.

“La ventaja de las emociones consiste en extraviarnos y la ventaja de la Ciencia, es no conmovernos”

“Hoy en día la gente conoce el precio de todo, pero no sabe el valor de nada”

Oscar Wilde en “El Retrato de Dorian Gray”



ÍNDICE

RESUMEN	9
SUMMARY	10
ANTECEDENTES	11
Nomenclatura del género <i>Aspergillus</i>	11
<i>Aspergillus fumigatus</i> , biología y patología	13
Problemática	14
Tipificación genotípica para <i>A. fumigatus</i>	17
PLANTEAMIENTO	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO PRINCIPAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Aislados	26
Obtención de cultivos monospóricos	28
Confirmación fenotípica para <i>A. fumigatus</i>	28
Extracción de DNA genómico	29
AFLP	30
Análisis de datos	32
RESULTADOS	34
Confirmación fenotípica de <i>A. fumigatus</i>	34
Extracción de DNA genómico	35
AFLP	36

Análisis de datos	38
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
PÁGINAS WEB	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fuente y origen geográfico de aislados de <i>A. fumigatus</i>	26
Tabla 2. Polimorfismo, número efectivo de alelos, diversidad genética y heterocigocidad esperada de los aislados de <i>A. fumigatus</i>	38
Tabla 3. Estructura reproductiva de los aislados de <i>A. fumigatus</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción macro y micromorfológica del aislado MM-10	34
Figura 2. Cuantificación de DNA para cultivos monospóricos de <i>A. fumigatus</i>	35
Figura 3. Patrón polimórfico obtenido por AFLP con los oligonucleótidos E-AA/M-CTG	37
Figura 4. Dendograma de distancia genética generada por UPGMA para aislados clínicos y ambientales de <i>A. fumigatus</i>	40
Figura 5. Red de haplotipos AFLP de aislados de <i>A. fumigatus</i> generados por Median-joining	42

RESUMEN

Cincuenta y cinco aislados clínicos y ambientales de *Aspergillus fumigatus* de México, Argentina, Francia y Perú fueron analizados para determinar su variabilidad genética, sistema reproductivo y su nivel de diferenciación usando marcadores de Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP). El nivel de la variabilidad genética se determinó midiendo el porcentaje de loci polimórficos, el número efectivo de alelos, heterocigocidad esperada y mediante la realización de la prueba del índice de asociación (I_A). El grado de diferenciación y variación genética fue determinado usando análisis de varianza molecular a tres niveles. Usando las distancias genéticas pareadas, fue construido un dendograma para detectar las relaciones genéticas entre los alelos. Finalmente, fue construida una red de haplotipos para determinar las relaciones geográficas entre ellos. Los resultados indican que los aislados clínicos tienen mayor variabilidad genética que los aislados ambientales. El I_A de los aislados clínicos y ambientales sugieren una estructura poblacional recombinante. La diferenciación genética entre los aislados y el dendograma sugieren que los grupos de los aislados son diferentes. La red de haplotipos demostró que la mayoría de los aislados están agrupados de acuerdo a su origen geográfico.

SUMMARY

Fifty-five clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates from Mexico, Argentina, France and Peru were analyzed to determine their genetic variability, reproductive mode system and level of differentiation using amplified fragment length polymorphism markers (AFLP). The level of genetic variability was assessed by measuring the percentage of polymorphic loci, number of effective alleles, expected heterozygosity and by performing an association index test (I_A). The degree of genetic differentiation and variation was determined using analysis of molecular variance at three levels. Using the paired genetic distances, a dendrogram was built to detect the genetic relationship among alleles. Finally, a network of haplotypes was constructed to determinate the geographic relationship among them. The results indicate that the clinical isolates have greater genetic variability than the environmental isolates. The I_A of the clinical and environmental isolates suggests a recombining population structure. The genetic differentiation among isolates and the dendrogram suggest that the groups of isolates are different. The network of haplotypes demonstrates that the majority of the isolates are grouped according to geographic origin.

ANTECEDENTES

Nomenclatura del género *Aspergillus*

La primera descripción de *Aspergillus* fue hecha en 1729; y proporcionó una información escasa pero efectiva del género. Posteriormente, varios taxa comenzaron a ser descritos. Una de las primeras revisiones del género *Aspergillus*, aceptó 69 especies divididas en 11 grupos, basándose en la morfología colonial y las características del conidióforo y la cabeza aspergilar. Más tarde, se aceptaron 77 especies con 10 variedades colocadas en 14 grupos. En el tratado monográfico “The Genus *Aspergillus*”, Raper y Fennell (1965), aceptaron 132 especies subdivididas en 18 grupos. A partir de este mismo año, varios taxa comenzaron a ser descritos.

Por definición, *Aspergillus* es un género asexual (anamorfo), sin embargo algunas especies de *Aspergillus* producen también estados sexuales (teleomorfo), por lo que se esperaría que, una vez que el estado teleomorfo es encontrado, el nombre anamorfo no debería seguir siendo usado. Sin embargo, esto no es práctico en un género tan grande como *Aspergillus*, que además, está integrado por varias especies de interés industrial. Así que actualmente, las especies con estados teleomorfos tienen dos nombres aceptados formalmente por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN), y el nombre de *Aspergillus* solo debe ser usado cuando se refiere al estado asexual o estado anamorfo. Samson *et al.* (2007) sugieren algunos aspectos a considerar en la descripción y determinación de nuevas especies, entre éstos se encuentran:

* Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus fumigatus* por AFLP

- Incluir aspectos moleculares, morfológicos, fisiológicos y datos ecológicos para describir nuevas especies de *Aspergillus*.
- Los medios utilizados para la descripción deben ser con base en medios recomendados por la Comisión Internacional de *Penicillium* y *Aspergillus* (agar-extracto de malta y agar-Czapek).
- Los nombres de nuevas especies deben ser registrados en MycoBank (www.MycoBank.org).
- El uso de nombres duales es necesario, el uso de un solo nombre de eso común, dependerá del estado (teleomorfo o anamorfo) que sea observado.

Por otro lado, al asignar nombre a los hongos, los micólogos tienen que seguir las reglas del ICBN, si alguna de las reglas no se cumple, la propuesta del nombre para una nueva especie no será aceptada. Raper and Fennell (1965) subdividieron a *Aspergillus* en “grupos”, una clasificación infragenérica, sin el estatus bajo la nomenclatura del ICBN. Para adecuarse a los requerimientos del ICBN, Gams *et al.* (1985) realizaron cambios en la nomenclatura, por lo que el uso del término “grupos” fue sustituido por los términos “subgéneros” y “secciones”. En este contexto, el estado anamorfo del hongo *Aspergillus fumigatus*, está descrito de la siguiente manera, de acuerdo a Klich (2002).

Subgénero *Fumigati* – uniseriado, vesículas predominantemente piriformes, conidios de color verde oscuro o gris.

Section *Fumigati* – conidios de color verde grisáceos a verde azulados.

Asimismo, la clasificación del estado anamorfo de *A. fumigatus* es de la siguiente:

Reino *Fungi*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Pezizomycotina*, Clase *Eurotiomycetes*, Orden *Eurotiales*, Familia *Mitosporic Trichocomaceae* (www.mycobank.org).

***Aspergillus fumigatus*, biología y patología**

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, por lo que pueden ser aisladas de una gran variedad de sustratos. *Aspergillus fumigatus* Fresenius (1863), uno de los miembros de este género, es un hongo filamentoso con presencia ubicua en la naturaleza. Su nicho ecológico es el suelo, donde sobrevive y crece, especialmente cerca de vegetación en descomposición; en condiciones naturales juega un papel importante en la degradación aeróbica de material orgánico y en el reciclaje de las fuentes de carbono y nitrógeno (Latgé, 1999). Esta especie es termotolerante y es capaz de crecer entre los 12 y los 57 °C. Además produce un importante número de metabolitos específicos que poseen efectos antibióticos como las esfingofunginas, y tóxicos, como la gliotoxina y el verrucolgeno (Bial - Arístegui; 2002). Al mismo tiempo, es un patógeno humano importante que puede causar diversos cuadros clínicos, entre los que se encuentran la aspergilosis, aspergiloma y aspergilosis invasiva (AI); ésta última, usualmente fatal, particularmente en pacientes inmunocomprometidos (Rinyu *et al*; 1995). *A. fumigatus* presenta un ciclo biológico simple, caracterizado por una gran capacidad de esporulación que resulta en una alta concentración de conidios (1-100 conidios/m³) en el aire (Latgé, 2001); estos son dispersados por las corrientes de aire exponiendo a todos los animales terrestres, incluidos los humanos, a inhalar las esporas. El pequeño tamaño de los conidios (2-3 µm),

* Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus fumigatus* por AFLP

les permite permanecer en suspensión en el medio ambiente durante un gran periodo de tiempo, y pueden llegar a los alvéolos pulmonares humanos (Abarca, 2000). En individuos inmunocompetentes, la inhalación de los conidios rara vez tiene efectos adversos, debido a que son eliminados de manera eficiente por el sistema inmune (Wright *et al.*; 2004). Sin embargo, por lo que concierne a hospederos inmunocomprometidos; particularmente pacientes con un trasplante de órgano, algún tipo de leucemia o personas infectadas por el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), estos mecanismos pueden no ser suficientes para la eliminación de todos los conidios (Warris *et al.*, 2001). En estos pacientes el hongo puede invadir los pulmones y prácticamente cualquier órgano produciendo un daño severo. En realidad, la mayoría de los pacientes que sufren de AI mueren a pesar de recibir un tratamiento antifúngico agresivo lo que puede resultar en una alta tasa de mortalidad entre el 30 y 90% (Lumbreras y Gavalda; 2003). Aunado a la ineficiente respuesta inmune por parte del hospedero, la alta tasa de mortalidad observada en las infecciones causadas por *A. fumigatus*, se debe también a la propia capacidad de virulencia del microorganismo y a las dificultades para establecer un diagnóstico correcto, particularmente en las primeras etapas de la enfermedad (Del Palacio *et al.*, 2003).

Problemática

En los últimos años, los miembros del género *Aspergillus* han ganado importancia como patógenos oportunistas, debido principalmente al incremento del número de pacientes inmunocomprometidos. Entre este grupo de pacientes, *A. fumigatus* es el hongo

* Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus fumigatus* por AFLP

que más ha prevalecido, causando la mayoría de las muertes por infecciones invasivas, a pesar de que sus esporas solo constituyen una pequeña proporción de todas las esporas aéreas encontradas en los hospitales (aproximadamente 0.3%); éstas son capaces de generar alrededor del 90% de las infecciones sistémicas debidas a *Aspergillus* (Brakhage y Langfelder; 2002). Es por eso que la identificación a nivel de especie de estos hongos es cada vez más importante, ya que algunas especies de *Aspergillus* pueden presentar una mayor virulencia y una respuesta distinta a la terapia antifúngica (Abarca, 2000). Por ejemplo, el voriconazol es un antifúngico que exhibe un rango diferente de efectividad contra infecciones fúngicas; una adecuada explotación de sus propiedades contra *Aspergillus* requiere de un diagnóstico clínico rápido y exacto (Hope *et al.*; 2005). Sin embargo, la ausencia de sintomatología específica así como de ensayos diagnósticos rápidos que detecten estas infecciones, ha constituido uno de los mayores problemas en el tratamiento de estos pacientes. Desafortunadamente, la identificación de este hongo con base en métodos morfológicos requieren de un tiempo de incubación adecuado (5 días o más) para evaluar las características macro y microscópicas, y se hace necesario un conocimiento mínimo sobre la taxonomía del género *Aspergillus*, el cual comprende más de 130 especies, de las cuales, sólo *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. terreus* provocan la mayoría de los casos de AI (Henry *et al.*, 2000).

Estas dificultades, sin embargo, han impulsado importantes progresos en el conocimiento de la genética de *A. fumigatus*, como lo muestran los estudios de su genoma, el cual, no ha sido totalmente caracterizado, pero su tamaño se estima alrededor de 30-35 Mb (<http://tigr.org/>), cercano al de *A. nidulans* (Brody y Carbon, 1989). *A. fumigatus*, presenta

* Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus fumigatus* por AFLP

cinco bandas de DNA cromosomal que están en un rango de 1.7 a 4.8 Mb reveladas por electroforesis de campo pulsado (Tobin *et al.*, 1997), que es similar al genoma de *A. nidulans* (Amaar y Moore, 1998). Estos avances ampliaron el conocimiento acerca del modo de reproducción de *A. fumigatus*; no obstante que esta especie se consideraba que tenía una reproducción asexual; presentaba características típicas de la reproducción sexual de los hongos heterotálicos euascomycetes, como el modo de reproducción recombinante, revelado por meta-análisis, así como la expresión de genes relacionados con el sexo y la presencia de genes de compatibilidad (*mating*) MAT-1-1 alfa y MAT-2-1 grupo de alta movilidad. Estos hallazgos condujeron finalmente a encontrar un ciclo sexual completamente funcional correspondiente al estado teleomorfo denominado *Neosortoria fumigata* (O’Gorman *et al.*, 2009). También se han logrado avances en la identificación y epidemiología molecular, como son los trabajos que se han llevado a cabo para examinar las características fenotípicas y genotípicas, las cuales han mostrado la variabilidad de los aislados de *A. fumigatus*. Matsuda *et al.* (1992), caracterizaron aislados de este hongo mediante la técnica de MLEE (Electroforesis de Enzimas Multilocus) para su fenotipificación y encontraron un alto grado de biodiversidad en aislados de *A. fumigatus*, agruparon 34 aislados en 14 electrotipos, mediante el uso de cinco sistemas de enzimas polimórficas. De la misma manera, Rodríguez *et al.* (1996) estudiaron 63 aislados de *A. fumigatus* procedentes de tres hospitales en diferentes áreas geográficas y ocho cepas, utilizaron diecinueve sistemas de enzimas polimórficas para la caracterización fenotípica, y encontraron diversidad genética entre los tres sitios de muestreo, dedujeron además que el modo de reproducción del hongo era clonal, sugerido por la existencia de

* Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus fumigatus* por AFLP

genotipos multilocus fijos, lo que significa deficiencia de heterocigocidad de un locus a otro y de una muestra a otra. Más recientemente (datos no publicados), Frías de León (2009), utilizó cincuenta y cinco aislados de *A. fumigatus* de diferente origen geográfico, los mismos utilizados en este estudio (Tabla 1), con el fin de determinar variabilidad fenotípica entre ellos. Después de realizar cuatro pruebas fenotípicas (macro y micromorfología, tamaño de los conidios, termotolerancia a 28, 37 y 48 °C y susceptibilidad a los antifúngicos Anfotericina B, Itraconazol y Voriconazol), los resultados mostraron que todos los aislados exhibieron macro y micromorfología típicas para la especie, sin embargo, se destacaron observaciones asociadas al origen geográfico. Los aislados de Perú (PE) resultaron ser termo-resistentes a 28 y 48 °C, en contraste con los aislados de Argentina (AR), México (MX) y Francia (FR), que presentaron mayor resistencia a 48 °C. Los aislados de PE y AR presentaron los conidios más grandes, mientras que los mismos aislados de PE, se distinguieron por presentar las vesículas más anchas. Particularmente, los aislados de AR (9272, 8571, 6578) y FR (Af-8, Af-26, Af-29, Af-35 y Af-41) mostraron resistencia a ambos azoles, mientras que en ninguno de los aislados procedentes de MX y PE, se encontró resistencia a antifúngicos. Ningún aislado fue resistente a Anfotericina B.

Tipificación genotípica para *A. fumigatus*

Varios métodos genotípicos han sido evaluados para tipificar aislados de *A. fumigatus* y estos métodos incluyen técnicas con base en patrones polimórficos tal como RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción), RAPD

(Polimorfismo del DNA Amplificado al Azar) (Spreadbury et al., 1990; Aufauvre-Brown et al., 1992) y AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados) (Warris et al., 2003), y estas técnicas tienen reproducibilidad entre diferentes laboratorios. Los métodos de tipificación basados en STRs (Repeticiones Cortas en Tándem) tal como polimorfismos en la longitud de microsatélites (PMM) y la combinación de RFLPs con hibridaciones de DNA moderadamente repetitivo correspondiente al retrotransposon *Afut1* (STRAf) (Neueglise et al. 1996), son específicos y reproducibles, pero su utilidad epidemiológica no ha sido todavía establecida. El polimorfismo del DNA secuencia específico el SSDP (sequence-specific DNA primers) es un método de tipificación de PCR desarrollado a partir de RAPD y utilizando cebadores específicos. Con base en la secuencia del genoma de *A. fumigatus* (Nierman et al., 2005), ha sido desarrollado un método de tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Bain et al., 2007; de Valk et al., 2005). El método MLST se basa en el principios de la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), pero los alelos son asignados a cada locus directamente por la secuencia de siete genes housekeeping, más que indirectamente, a través de la movilidad electroforética de las enzimas correspondientes, éste tiene un poder discriminatorio alto, pero al mismo tiempo, puede ser utilizado para estudios sobre la epidemiología mundial debido al cambio relativamente lento de los nucleótidos en genes housekeeping (Cooper et al., 2004).

Al utilizar RAPD para tipificar aislados de *A. fumigatus*, varios autores han encontrado que solamente una pequeña proporción de oligonucleótidos pudieron detectar variabilidad entre ellos (Aufauvre-Brown et al., 1992; Loudon et al., 1993). Rinyu et al.

(1995), analizaron 61 aislados y cepas de *A. fumigatus*, utilizando métodos fenotípicos (morfología e isoenzimas) y genotípicos [(RFLP de DNA nuclear y mitDNA (mitocondrial)], y mostraron que éstos, eran altamente variables en su morfología y tasa de crecimiento a diferente temperatura, pero su micromorfología y diámetros conidiales fueron característicos de la especie, se obtuvo buena correlación entre los dendrogramas obtenidos con isoenzimas y RAPD, pero las isoenzimas y los patrones de DNA amplificados no correlacionaron con la patogenicidad, producción de pigmento y origen geográfico de los aislados. Girardin *et al.* (1994) utilizaron secuencias moderadamente repetitivas de DNA para tipificar aislados de *A. fumigatus* obtenidos de pacientes con AI y del ambiente hospitalario. La mayoría de los aislados de distintos sitios del hospital mostraron diferentes patrones de hibridación (Southern blot), además un estudio temporal de contaminantes del aire mostró que algunos aislados pueden persistir en el mismo ambiente hasta por seis meses. Lin *et al.* (1995), con el propósito de evaluar tres métodos de genotipificación: IEA (Análisis de Isoenzimas), RAPD y REA (Análisis de Restricción por Endonucleasas), analizaron 35 aislados clínicos y del ambiente de *A. fumigatus*. Con EIA se discriminaron nueve tipos, con RAPD se detectaron 22 tipos y con REA se detectaron 3, 17 y 13 tipos con el uso de *XhaI*, *XhoI* y *SalI*, respectivamente, y 22 tipos por combinación de los datos con las tres enzimas, finalmente, se obtuvieron 28 tipos con la combinación de los patrones generados por REA, IEA y RAPD. Este estudio reflejó variación genética entre los aislados.

Anderson *et al.* (1996), utilizaron RAPD, RFLP y Southern blot (usando como sonda el bacteriófago M13) para tipificar aislados de *A. fumigatus*, los autores demuestran que cada

técnica tiene un nivel similar de discriminación. En otro estudio, Debeaupuis *et al.* (1997) determinaron si casos de AI habían sido causados por cepas de *A. fumigatus* con características únicas, para lo cual compararon aislados de pacientes inmunocomprometidos con AI, los hongos fueron aislados de esputo de pacientes con fibrosis quística y aislados del ambiente. Observaron una gran diversidad genética entre los 879 aislados por la utilización de Southern blot con un retrotransposon-tipo elemento de *A. fumigatus* (Neuveglise *et al.*, 1996). El análisis de los patrones obtenidos por Southern blot mostraron la ausencia de agrupamiento entre los aislados ambientales y los aislados clínicos de AI y fibrosis quística, además no se agruparon de acuerdo a su origen geográfico. Bart-Delabesse *et al.* (1998), utilizaron microsatélites como marcadores de DNA altamente polimórficos, para la tipificación de 50 aislados clínicos, 50 aislados ambientales y dos cepas de referencia de *A. fumigatus*, y no observaron agrupamiento entre los aislados ambientales y clínicos. Por lo tanto, los marcadores microsatélites parecen ser adecuados para grandes estudios epidemiológicos de AI. Chazalet *et al.* (1998), llevaron a cabo la tipificación de más de 700 aislados clínicos y ambientales de cuatro hospitales diferentes, utilizando una sonda (secuencia de DNA repetitivo), el análisis de los aislados ambientales mostró que la población de *A. fumigatus*, es extremadamente diversa, el 85 % de los aislados estuvo representado con un solo genotipo (aislado una vez), el 15 % restante fueron aislados (aislados varias veces) capaces de persistir por varios meses en el mismo ambiente hospitalario, además no encontraron asociación con una localización específica dentro del hospital y aislaron cepas idénticas de diferentes edificios del hospital, también observaron identidad entre los aislados del

paciente y el ambiente del hospital, lo que sugería infección nosocomial. Radford *et al.* (1998), caracterizaron aislados de *A. fumigatus* colectados de pacientes y del ambiente de una unidad de trasplante de médula ósea por un periodo de tres años, utilizaron un método subespecífico para la discriminación de cepas de *A. fumigatus*, el cual se llevó a cabo con oligonucleótidos que amplifican regiones espaciadoras intergénicas (IGS) entre el rDNA. Este método discriminó 11 distintos tipos de un total de 119 aislados de *A. fumigatus*, 10 tipos fueron aislados de pacientes y ocho de esos tipos fueron encontrados en el ambiente del hospital, esto sugirió que la infección por *A. fumigatus* en los pacientes de la unidad estudiada del hospital, pudo ser de origen nosocomial. Leenders *et al.* (1999), llevaron a cabo un estudio con el objetivo de mejorar el conocimiento de la aerobiología del hongo dentro y fuera de un hospital, además de investigar la densidad de los conidios en diferentes épocas del año, así como tipificar los aislados, los autores encontraron que la densidad de esporas aéreas varía con la época estacional, así como en las actividades de construcción donde se incrementa la concentración de esporas aéreas, en cuanto a la genotipificación, mostraron que es una herramienta importante para ayudar a determinar la causa de un brote de AI. Henry *et al.* (2000), mediante la utilización de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS 1 e ITS 2), identificaron *Aspergillus* a nivel de especie y discriminaron otros hongos oportunistas. Bart-Delabesse *et al.* (2001), compararon RFLP, RAPD y MLP (Polimorfismo en la Longitud de Microsatélites) para genotipificar 67 aislados de *A. fumigatus*, los autores encontraron que el RFLP y el MLP son discriminatorios y dan resultados significativamente concordantes, en tanto que con el RAPD no se obtuvo concordancia. Treviño-Castellano *et al.* (2003) tipificaron e

* Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus fumigatus* por AFLP

identificaron aislados de *A. fumigatus* aislados de pacientes con AI, del medio ambiente hospitalario y cepas de referencia (de una colección de cepas), así como otras especies fúngicas filogenéticamente próximas, la identificación de *A. fumigatus* se llevó a cabo por Touchdown PCR y la caracterización genotípica por RAPD. El uso combinado de estos dos métodos constituyó un método sensible y exacto para la resolución de brotes nosocomiales de *A. fumigatus*.

Rosehart *et al.* (2002), examinaron la relación filogenética entre 111 aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* procedentes de Ontario, Canadá, utilizando microsatélites. El análisis filogenético de los genotipos reveló que no hubo asociación geográfica o temporal de los genotipos clínicos y ambientales. De hecho, varios aislados clínicos y ambientales de diferentes áreas geográficas, mostraron idéntico genotipo (clonal).

Warris *et al.* (2003), llevaron a cabo estudios de tipificación de 96 aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* colectados en un periodo de 18 meses en un hospital, usando la técnica AFLP y fueron capaces de distinguir cepas de *A. fumigatus* recolectadas de agua y aire. El dendrograma obtenido en este estudio, agrupó a los aislados en dos grandes grupos, y dentro de éstos se distribuyeron también los aislados obtenidos de los pacientes. La relación genotípica entre aislados clínicos y ambientales sugería que los pacientes con AI se infectaron con aislados obtenidos de aire y agua.

Por su parte, de Valk *et al.* (2007) compararon AFLP y STRAf (Repeticiones Cortas en Tandem para Af) con el fin de determinar la técnica con la mejor discriminación molecular para *A. fumigatus*. Se estudiaron las relaciones genéticas de 55 aislados obtenidos de 15 pacientes con AI. En general, hubo una gran concordancia entre las dos técnicas. Estas

* Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus fumigatus* por AFLP

fueron capaces de discernir diferentes genotipos de una sola muestra, principalmente las que provenían del tracto respiratorio; sin embargo en órganos infectados prevaleció el dominio de sólo uno de ellos. Ambas técnicas mostraron ser excelentes herramientas de tipificación molecular para discriminar los aislados de *A. fumigatus*.

En contraste con la información anterior, en México, no existen datos precisos del número de casos de aspergilosis en la población y menos aún trabajos de tipificación molecular, sin embargo, de acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/research/en/>), México ocupa el lugar número 22 en cuanto a casos de aspergilosis. En nuestro país, la información es muy escasa y se reduce a estudios retrospectivos de pacientes con diagnóstico de infecciones por hongos y a la publicación de casos clínicos aislados. (Reyes *et al.*, 1985; Mora Tiscareño *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 1996; Hermida-Escobedo, *et al.*, 2000; Chacón M *et al.*, 2002). Actualmente, en el Instituto Nacional de Cancerología en la Ciudad de México, datos no publicados (comunicación personal), refieren un promedio de dos casos al mes, en pacientes con algún grado de inmunodepresión en los que se identifica la presencia del hongo *Aspergillus*, lo que sugiere la importancia de este patógeno en su asociación con pacientes inmunocomprometidos.

La tipificación de la aspergilosis en países extranjeros ha mostrado un aumento continuo de esta nosología en los últimos años, como lo apoyan diversos estudios. En México, también se ha observado un aumento importante de la aspergilosis en los hospitales, de ahí que surge la necesidad de llevar a cabo un estudio que nos brinde un panorama de la epidemiología molecular en nuestro país, esto nos permitirá implementar medidas en la

* Estudio de la Diversidad Genética y Estructura de Poblaciones de Aislados del Hongo *Aspergillus fumigatus* por AFLP

prevención de esta micosis. El uso de las estrategias metodológicas anteriores han permitido establecer la diversidad de los aislados de *A. fumigatus*, algunas son más informativas que otras, en el caso del AFLP, la técnica de discriminación molecular utilizada en este estudio, posee las siguientes propiedades: presenta polimorfismo, es codominante y es frecuente en el genoma, lo que la hace una herramienta útil en estudios de variación, razones por lo que fue utilizada para la tipificación de los aislados.

PLANTEAMIENTO

En México, existe muy poca información sobre diferentes aspectos de la epidemiología de la aspergilosis, los datos epidemiológicos más sobresalientes se reducen a estudios retrospectivos de pacientes con diagnóstico de infecciones por hongos y a la publicación de casos clínicos aislados, sin embargo, la frecuencia de casos de aspergilosis, no reportada obligatoriamente en el Instituto Nacional de Cancerología, México, resalta la importancia de este patógeno y su asociación con hospederos inmunocomprometidos. Dado que no existen bancos de información reglamentaria y consistente ni centros de referencia sobre los aislados de *A. fumigatus* en el país, así como tampoco existe un registro sistemático sobre la procedencia de las cepas, por esto estamos interesados en estudiar aspectos epidemiológicos en nuestro país. Esto nos permitirá entender mejor la enfermedad, determinar factores de riesgo, y proponer un patrón molecular de la distribución geográfica del hongo en el ambiente y en la clínica, así como caracterizar las fuentes de infección al relacionar aislados de diferente origen en la naturaleza con los de casos clínicos, así como establecer la variabilidad genética y el modo de reproducción de los aislados procedentes de diferente fuente y origen geográfico, obtenidos por el índice de asociación (I_A).

HIPÓTESIS

Los aislados clínicos y ambientales de *Aspergillus fumigatus*, presentan variabilidad genética y diferente estructura de población de acuerdo a su origen geográfico.

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la relación genotípica de aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* de diferente origen geográfico por AFLP.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Confirmar fenotípicamente los aislados de *A. fumigatus* por su micro y macromorfología.
2. Obtener patrones polimórficos por AFLP de aislados clínicos y ambientales de diferente origen geográfico.
3. Analizar la variabilidad genética de *A. fumigatus* de aislados clínicos y ambientales de diferente origen geográfico.
4. Determinar la estructura genética de poblaciones de los aislados de *A. fumigatus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados

Se utilizaron 55 aislados de *A. fumigatus*, obtenidos de diferentes fuentes (pacientes y aislados ambientales) y procedencia geográfica (15 aislados de México; 27 aislados de Argentina; 4 aislados de Perú; 9 aislados de Francia) (Tabla 1), los cuales se sembraron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) (Bioxón, México) a 28 °C. Los aislados, utilizados en este estudio, fueron seleccionados por obtención de cultivos monospóricos en PDA.

Tabla 1. Fuente y Origen Geográfico de Aislados de *A. fumigatus*

Aislado	Fuente	Origen Geográfico
MM-7	Ambiental	MX
MM-8	Ambiental	MX
MM-9	Clínico	MX
MM-10	Clínico	MX
MM-11	Clínico	MX
MM-32	Clínico	MX
MM-33	Clínico	MX
MM-34	Clínico	MX
MM-35	Clínico	MX
MM-36	Clínico	MX
MM-37	Clínico	MX
MM-38	Clínico	MX
MM-39	Clínico	MX
MM-45	Clínico	MX
MM-46	Clínico	MX
Amb III	Ambiental	AR
Amb V	Ambiental	AR
Amb VIII	Ambiental	AR
951740	Clínico	AR

951744	Clínico	AR
951746	Clínico	AR
951722	Clínico	AR
951733	Clínico	AR
951734	Clínico	AR
951736	Clínico	AR
951737	Clínico	AR
951738	Clínico	AR
951739	Clínico	AR
951740 ^a	Clínico	AR
951741	Clínico	AR
951744	Clínico	AR
951745	Clínico	AR
951746 ^a	Clínico	AR
951747	Clínico	AR
951748	Clínico	AR
88248	Clínico	AR
90370	Clínico	AR
982928	Clínico	AR
993315	Clínico	AR
9272	Clínico	AR
8571	Clínico	AR
6578	Clínico	AR
51435	Clínico	PE
51594	Clínico	PE
53027	Clínico	PE
53097	Clínico	PE
Af-8	Clínico	FR
Af-11	Clínico	FR
Af-15	Clínico	FR
Af-22	Clínico	FR
Af-26	Clínico	FR
Af-29	Clínico	FR
Af-34	Clínico	FR
Af-35	Clínico	FR
Af-41	Clínico	FR

MX: México, AR: Argentina, PE: Perú, FR: Francia.

Obtención de cultivos monospóricos

A partir de cada aislado, incubado durante 2-4 días en PDA a 28 °C, se obtuvo una suspensión de conidios en PBS-Tween 20, enseguida se hicieron diluciones seriadas hasta obtener una dilución que permitiera cuantificar el número de conidios por ml en una cámara de Neubauer, posteriormente se ajustó la suspensión de esporas a 100 conidios/50 µl aproximadamente y se colocaron en el centro de una caja de Petri conteniendo medio PDA para plaquar. Las cajas fueron incubadas a 28 °C y revisadas hasta observar crecimiento micelial, se seleccionó sólo una colonia por cada placa, tomando en cuenta que ésta se encontrara independiente de colonias cercanas. Una vez obtenida y separada una colonia de cada aislado, ésta fue crecida y mantenida como se describió anteriormente. Por otra parte, los cultivos fueron preservados en frascos con agua estéril a 4 °C y en tubos con PDA con y sin aceite mineral, a 4 °C.

Confirmación fenotípica para *A. fumigatus*

La confirmación fenotípica se llevó a cabo utilizando los criterios definidos en Klich, (2002) para describir el color y textura de la colonia, las cabezas conidiales, el pedicelo, las fiálides y los conidios. La observación de las características coloniales se realizó a partir de los cultivos monospóricos crecidos en PDA y para la identificación microscópica se empleo el método de microcultivo. La técnica se realizó en condiciones de esterilidad y consistió en cortar un cuadro de 1 cm con 4 mm de profundidad, en una caja con PDA (Bioxón), éste se colocó sobre un portaobjeto y se depositó dentro de una caja de Petri conteniendo un algodón con agua. El cuadro de agar se inoculó con la fase micelial del

hongo en las cuatro caras laterales, por el método del punto y se hizo un tipo “sandwich” cuando se colocó un portaobjeto sobre éste. Se incubaron de 1-2 semanas a 28 °C, después de este tiempo se colocó una gota de azul de algodón con lactofenol de Amman, entre el portaobjetos y el cubreobjetos, y finalmente se observó al microscopio (marca Olympus Optical) para describir su morfología.

Extracción del DNA genómico

Para extraer el DNA de cada hongo seleccionado, se utilizó el método descrito por Reyes-Montes *et al*; (1999). El hongo fue crecido en medio de extracto de levadura-peptona de caseína-dextrosa (YPD) incubado a 37 °C en agitación constante durante 24 horas. El micelio obtenido fue lavado con agua Milli Q esteril y almacenado a -80 °C hasta su utilización. El micelio se transfirió a un mortero esteril, al cual se agregó nitrógeno líquido para macerarlo, se repitió este proceso adicionando constantemente nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se recuperó aproximadamente 0.4 mL del polvo micelial de cada aislado y se depositó en tubos eppendorf esteriles de 1.5 mL. Se adicionó 600 µL de amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, EDTA 62.5 mM, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 10 %) y se incubó 1 h a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 14000 rpm, a 4 °C, por 15 min y al sobrenadante se le adicionó proteinasa K (GIBCO) a una concentración final de 200 µg/mL y se incubó a 56 °C por 2 h. Enseguida, se agregó RNAsa A (Qiagen GmbH Hilden, Germany) a una concentración final de 50 µg/mL y se incubó toda la noche. Los ácidos nucleicos se extrajeron con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) igual al sobrenadante recuperado, y se

repitió este paso hasta obtener una fase acuosa superior transparente. Los ácidos nucleicos se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto frío y 10 µL de acetato de sodio 3 M, y se incubó cada mezcla a -20 °C hasta el día siguiente. Posteriormente, se centrifugó cada mezcla para obtener los botones de DNA, los cuales se lavaron con etanol al 70 %. Finalmente, el DNA se disolvió en agua grado milliQ.

AFLP

Las reacciones de AFLP se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Vos *et al.* (1995) y usando el Kit GIBCO BRL AFLP System I de la manera siguiente. Los DNAs obtenidos se ajustaron a una concentración de 500 ng/18 µL, éstos fueron digeridos simultáneamente con las enzimas de restricción *EcoRI/MseI* (1.25U/µL) durante dos horas a 37 °C y posteriormente las enzimas de restricción se inactivaron a 70 °C durante 15 minutos. Los fragmentos de DNA derivados de la digestión fueron ligados a adaptadores de doble hebra *EcoRI* F (5'-CTCgTAgACTgCgTACC-3'), *EcoRI* R (3'-CATCTgACgCATggTTAA-5'); *MseI* F (5'-gACgATgAgTCCTgAg-3'), *MseI* R (3'-TACTCAggACTCAT-5') con T4 ligasa por 2 h a 20 °C, para seleccionar otros templados de DNA que se utilizaron en amplificaciones posteriores. Las secuencias de los adaptadores asociadas a los sitios de restricción sirvieron como sitios de enlace para oligonucleótidos en las pre-amplificaciones subsecuentes por PCR.

En la reacción de preamplificación, se utilizó una dilución 1/10 de la mezcla anterior y se tomaron 5 µL de esta dilución, 40 µL de la mezcla pre-amp primer [*EcoRI* (5'-gACTgCgTACCAATTC+A-3'); *MseI* (5'-gATgAgTCCTgAgTAA+C-3')], 5µL del

amortiguador 10X PCR [MgCl₂ 15 mM] y 1 µL de Taq DNA polimerasa [1U/µL] y se realizó una PCR, que consistió de un ciclo de 3 min a 94°C, 20 ciclos de ½ min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C. Los productos de PCR obtenidos en la preamplificación fueron diluidos y usados como templados en una segunda amplificación (amplificación selectiva), en donde se probaron ocho combinaciones de oligonucleótidos (Eco+AA:MseCTC; Eco+AC:Mse+CAC; Eco+AA:Mse+CAT; Eco+AC:Mse+CTC; Eco+AA:Mse+CTG; Eco+AC:Mse+CAT; Eco+AA:Mse+CAC; Eco+AC:Mse+CTG), que además de reconocer la región del adaptador y del sitio de restricción, contienen dos nucleótidos específicos adicionales.

Antes de la amplificación selectiva, el oligonucleótido *EcoRI* fue marcado radiactivamente por fosforilación de la terminación 5' con la T4 cinasa y [γ -³²P]-ATP (3000Ci/mmol), este último se diluyó 1:4. Posteriormente, se incubó por 1 h a 37°C la siguiente mezcla: 10.8 µL del oligonucleótido, 6µL del regulador de la T4 cinasa, 12 µL de la dilución del ATP³² y 1.2µL de la cinasa T4, por último se inactivó a 70°C por 10 min.

El volumen final de la mezcla de reacción de la amplificación selectiva fue de 20 µL conteniendo: 0.5 µL del oligonucleótido marcado [*EcoRI*], 4.5 µL del oligonucleótido [*MseI*], 2 µL del amortiguador 10X PCR+MgCl₂ [15 mM], 0.1 µL de Taq polimerasa [5U/µL], 7.9 µL de agua grado MilliQ y 5 µL de la preamplificación. La PCR consistió de un ciclo de 5 min a 94°C; 12 ciclos de ½ min a 94°C, ½ min comenzando en 65°C (disminuyendo cada ciclo 0.7°C), 1 min a 72°C, 23 ciclos de ½ min a 94°C, ½ min a 56°C, y 1 min a 72°C.

Los fragmentos derivados de la amplificación selectiva, fueron separados en geles de acrilamida desnaturalizantes al 6%. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara BioRad, Sequi-Gen® GT System. El gel se corrió en amortiguador TBE 0.5X, pH 8.0, a voltaje constante (1600V) hasta que el colorante xilen-cianol alcanzó el final del gel, el marcador de peso molecular que se utilizó fue el 50bp DNA ladder (Invitrogen, CA, USA). El gel se separó de los vidrios de la cámara de electroforesis y se adhirió a papel filtro Whatman 1MM, seguido de su cobertura con Alusa Plast (plástico) y posterior secado al vacío en un sistema de secado de geles Model 583, HydroTech™ Gel Drying System (BioRad, USA). Una vez seco, se colocó sobre el gel una serie de marcas radiactivas, que permitieron la alineación con la placa fotográfica de la autorradiografía. Finalmente, se expuso el gel a la placa de radiografía Kodak X-OMAT AR FILM (35x43cm) a -70°C durante 20 h. El análisis de las bandas se realizó en la autorradiografía. Todos los reactivos mencionados fueron de GIBCO.

Análisis de datos

Las bandas obtenidas por AFLP se codificaron en una matriz como datos binarios de ausencia (0) y presencia (1). La diversidad genética de los marcadores AFLP fueron calculadas por el Índice de Shannon (S), asumiendo que cada marcador fenotípico representa un locus distinto (Allnutt *et al.*, 1999), y la diversidad genética de Nei (h) utilizando frecuencias alélicas (Nei, 1973). Adicionalmente, la heterocigocidad esperada por población (H) y la heterocigocidad promedio (Hw) fueron calculadas utilizando frecuencias alélicas de acuerdo al método bayesiano de Zhivotovsky (Zhivotovsky, 1999).

Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el programa FAMD v 1.1β (Schlüter, 2006) y se llevó a cabo dentro de diferentes niveles jerárquicos. Este análisis se realizó para probar diferencias entre aislados de diferentes países dentro de grupos (fuente de aislado), y entre grupos. La significancia estadística de la partición de la varianza molecular y de la estimación de la ϕ -estadística se evaluó mediante la realización de 10.000 permutaciones- aleatorias de los datos (Excoffier *et al.*, 1992). La distancia genética pareada por el método de Nei (Nei, 1979) fue utilizada para establecer la relación genética entre aislados, y de estas matrices, los dendrogramas correspondientes fueron construidos por medio del método de promedios aritméticos de grupos pareados no ponderados (UPGMA) utilizando el programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Los árboles fueron evaluados estadísticamente por medio del coeficiente de correlación cofenético (CCCR) utilizando la prueba de Mantel (Manly, 1997). Por otro lado, fue construida una red de haplotipos para evaluar la relación genealógica entre los haplotipos AFLP por el método de Median-Joining (Bandelt *et al.*, 1999) implementado en el programa NETWORK 4.2.0.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>, Polzinand y Vahdati 2004).

Los parámetros utilizados fueron: epsilon = 0, peso de transiciones-transversiones 1/1, peso de 10 caracteres y criterios de conexión. Por último, para distinguir entre estructura clonal y recombinante, se utilizó el índice de asociación (I_A) (Maynard-Smith *et al.*, 1993) (una prueba estadística para medir el grado de asociación no aleatoria entre alelos de diferentes loci (desequilibrio de unión), implementado en el programa LIAN v 3.5 (Haubold y Hudson, 2000).

RESULTADOS

Confirmación fenotípica de *A. fumigatus*

Todos los aislados fueron confirmados morfológicamente con base en los criterios descritos por Klich, (2002). El crecimiento fue radial, plano y de textura polvosa. No se presentó pigmento en anverso ni reverso del agar. Las cabezas conidiales se agrupan en cadenas. El pedicelo fue hialino de paredes lisas. Las vesículas mostraron formas piriformes con fiálides uniseridas dispuestas sobre la mitad o a dos terceras partes de la vesícula, los conidios fueron de color grisáceo a verde oscuro. (Figura 1).

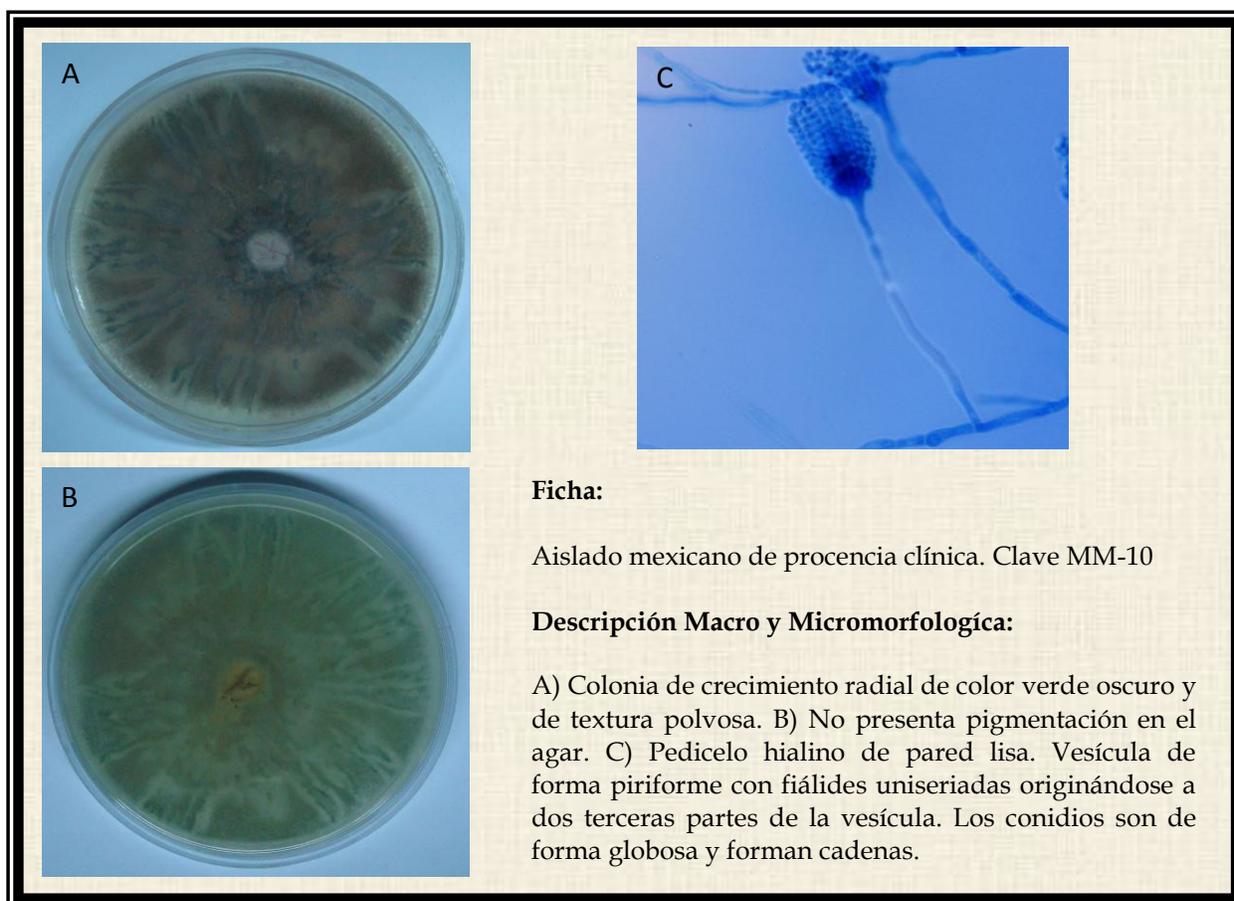


Figura 1. Descripción Macro y Micromorfológica del aislado MM-10.

Extracción de DNA genómico

Se obtuvo el DNA genómico de los 55 aislados de *A. fumigatus* incluidos en el estudio. La cantidad de DNA purificado fue cuantificada al realizar una comparación con diferentes concentraciones del DNA del fago lambda (GIBCO). En la figura 2 se observa el análisis electroforético de diferentes DNAs obtenidos de los aislados de *A. fumigatus*, observándose que la concentración de éstos variaba entre 100 y 500 ng/2µl. En general, la extracción de DNA de todos los aislados fue de buena calidad. Los DNAs fueron conservados a 4 °C para ensayos posteriores.

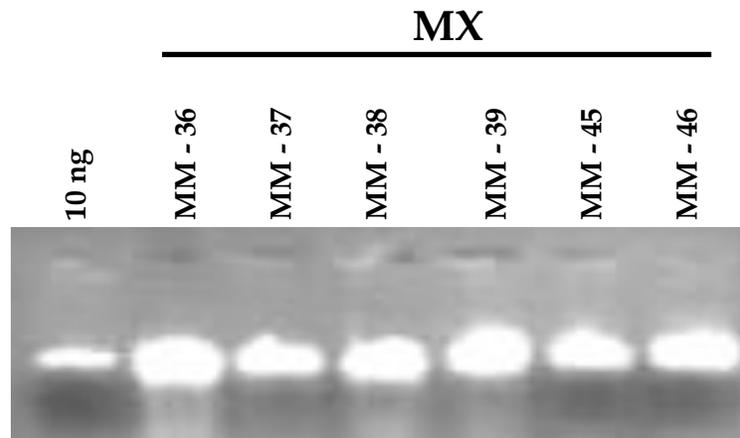


Figura 2. Ejemplo de la cuantificación de DNA de los cultivos monospóricos de *A. fumigatus* procedentes de MX, obtenidos con la técnica descrita en Materiales y Métodos. El primer carril corresponde a una concentración de 10 ng de fago λ .

AFLP

El número de marcadores obtenidos en cada amplificación selectiva del AFLP fue de 22 para la combinación *EcoRI-AA/MseI-CAC*; 10 para la combinación *EcoRI-AA/MseI-CTC*; 5 para la combinación *EcoRI-AA/MseI-CAT*; 16 para la combinación *EcoRI-AA/MseI-CTG*; 10 para la combinación *EcoRI-AC/MseI-CAT*; 20 para la combinación *EcoRI-AC/MseI-CAC*; 8 para la combinación *EcoRI-AC/MseI-CTC*; y 14 para la combinación *EcoRI-AC/MseI-CTG*; dando un total de 105 marcadores (Figuras 3).

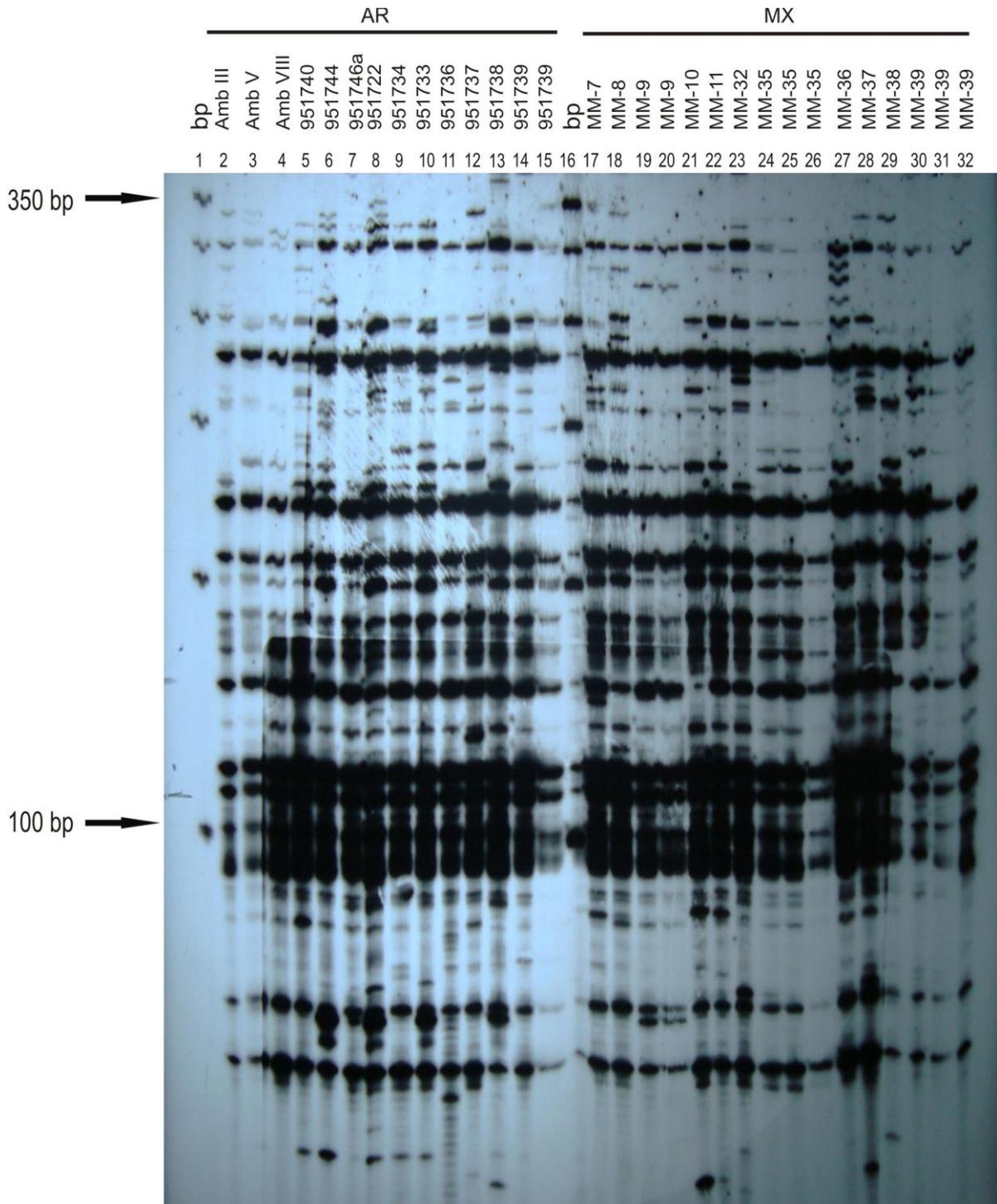


Figura 3. Patrón polimórfico obtenido por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-AA/M-CTG de los aislados de *A. fumigatus* de AR y MX. M: 50 bp DNA Ladder.

Análisis de datos

Los resultados obtenidos para los niveles de variación genética de todos los aislados, de acuerdo a su origen geográfico y fuente de aislado, indicaron que los aislados clínicos son más variables que los del medioambiente, como se muestra en la tabla 2. Los valores del polimorfismo promedio de los aislados clínicos, varió de 81.10 (AR) a 22.86 (PE), y en los aislados del medioambiente fue de 18.10 (AR) a 6.67% (MX). Por otra parte, el valor de la diversidad genética estimado por el Índice de Shannon (I), un estimador no sensible al número de aislados analizados, la heterocigocidad promedio y el número efectivo de alelos mostró, tanto para los aislados clínicos como ambientales la misma tendencia (Tabla 2).

Tabla 2. Polimorfismo, número efectivo de alelos, diversidad genética y heterocigocidad esperada de los aislados de *A. fumigatus*

Población	P (%)	ne	I	h
MX _a	6.67	0.4710 ± 0.1253	0.0403 ± 0.1071	0.0276 ± 0.0733
MX _b	72.38	1.5197 ± 0.1083	0.4243 ± 0.0785	0.2912 ± 0.0559
AR _a	18.10	1.1225 ± 0.1644	0.1038 ± 0.1305	0.0704 ± 0.0898
AR _b	81.10	1.6128 ± 0.0761	0.4890 ± 0.0524	0.3379 ± 0.0379
FR _b	70.48	1.4726 ± 0.1292	0.3945 ± 0.0951	0.2683 ± 0.0678
PE _b	22.86	1.1657 ± 0.1624	0.1361 ± 0.1278	0.0935 ± 0.0888

P: polimorfismo; ne: número efectivo de alelos; I : diversidad genética (Índice de Shannon); h: heterocigocidad; MX: México; AR: Argentina; FR: Francia; PE: Perú; a: aislados ambientales; b: aislados clínicos.

El análisis de varianza molecular AMOVA, por otro lado, mostró la estructura de la variación genética de los grupos de aislados analizados, en donde el porcentaje de variación compartida entre los aislados clínicos y del medio ambiente fue baja (9,05%) y su diferenciación genética fue estadísticamente significativa ($F_{st} = 0,253$, $P < 0,001$). Mientras que, la variación compartida entre los aislados agrupados de acuerdo a su origen geográfico fue ligeramente mayor (16,22%), pero su diferencia también fue estadísticamente significativa ($F_{st} = 0,178$, $P < 0,001$) y, por último, la variación entre los aislados de un mismo país fue alto (74,73%) y su diferenciación genética no fue distinta de cero ($F_{st} = 0,091$, $P = 0,046$).

Por lo que se refiere al valor estimado del I_A , el grupo total de aislados indicó que éstos tienen un sistema reproductivo recombinante. Por otra parte, el análisis realizado sobre grupos parciales de aislados de acuerdo a su origen geográfico y fuente de aislado, mostró resultados similares (Tabla 3).

Tabla 3. Estructura reproductiva de los aislados de *A. fumigatus*

Grupos	Aislados	I_A
1) MX, AR	Ambientales	0.0111 (< 0.05)
2) MX, AR, FR, PE	Clínicos	0.0378 (< 0.05)
3) MX	Clínicos y Ambientales	0.0650 (< 0.05)
4) AR	Clínicos y Ambientales	0.0469 (< 0.05)
5) AR	Clínicos	0.0586 (< 0.05)
6) PE	Clínicos	0.0087 (< 0.05)

I_A : Índice de Asociación

Asimismo, el dendrograma obtenido mostró la integración de dos grupos bien definidos como se muestra en la figura 4. El primero, integrado por aislados de AR y MX, que están separados en dos subgrupos: los aislados clínicos y ambientales de ambos países, y el segundo, formado por los aislados de FR y PE. En éste, el coeficiente de correlación cofenética (CCCR = 0.70, $P < 0,005$) obtenido, indicó que el árbol es una buena representación de las relaciones genéticas de los aislados y que los grupos que lo integraron son coherentes.

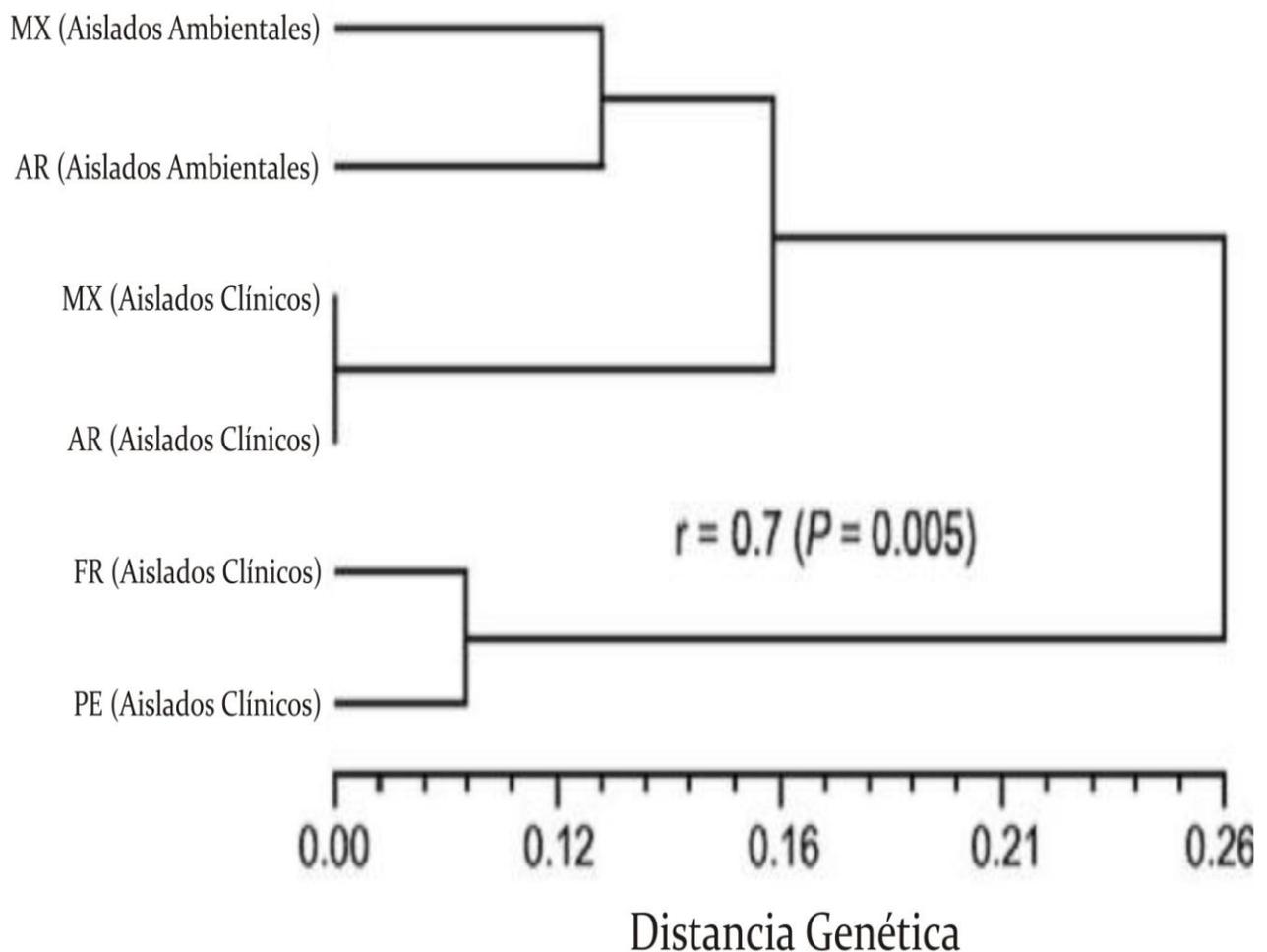


Figura 4. Dendrograma generado entre los aislados clínicos y ambientales de diferentes países, construido utilizando el método de UPGMA (Nei, 1973).

Por último, la red del grupo total de haplotipos AFLP, mostró que el número de cambios mutacionales entre ellos osciló entre 1 y 20 (Figura 5). Además, en esta red se observó una gran cantidad de reticulaciones entre los aislados estudiados, y mostró una clara asociación entre la mayoría de los aislados de México (grupo A), Argentina (grupo B) y Perú (grupo C) con su origen geográfico, con algunas excepciones. Los aislados de FR y algunos de AR fueron variables, lo que determinó que su posición fuera más irregular. Sin embargo, todos los aislados de PE se integraron en un mismo grupo.

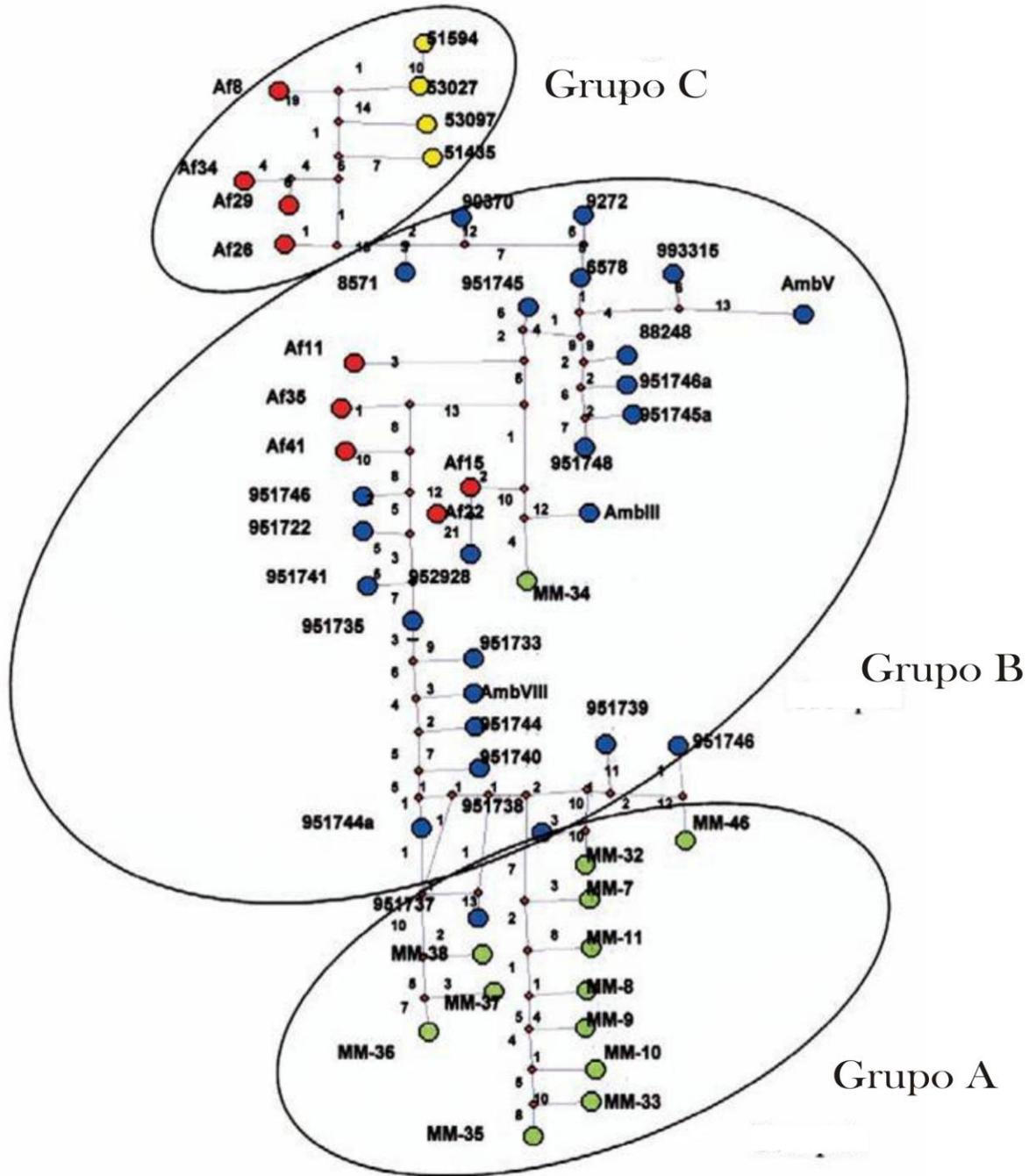


Figura 5. Red de haplotipos. La red de haplotipos de patrones polimórficos generados por AFLP para aislados de *Aspergillus fumigatus*, fue construida mediante Median-joining. Los círculos verdes corresponden a los aislados de México; los círculos azules corresponden a los aislados de Argentina; los círculos rojos corresponden a los aislados de Francia y los círculos amarillos corresponden a los aislados de Perú.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, la técnica de AFLP, con ocho combinaciones de bases selectivas, demostró ser útil para distinguir entre aislados clínicos y del medio ambiente, de *A. fumigatus*, así como para la identificación de la estructura de poblaciones y la relación con su origen geográfico, de acuerdo a resultados publicados en trabajos previos (Bonin *et al.*, 2007; de Valk *et al.*, 2007, Warris *et al.*, 2003).

Los resultados del trabajo mostraron que los niveles de variación genética entre los aislados clínicos de *A. fumigatus* tuvieron los valores más altos, con excepción de los aislados de PE. Mientras que, aislados del medio ambiente mostraron los valores más bajos. Cuando se analizaron los aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* de diferentes orígenes geográficos, se encontró que los valores de diferenciación genética de aislados clínicos fueron mayores que los valores de los aislados del medio ambiente, lo que demostró que se comportan como grupos genéticamente diferentes. Por otra parte, el dendrograma basado en la distancia genética de Nei, concentra a los aislados de MX y AR en un grupo, pero los subdivide en aislados del medio ambiente y aislados clínicos, lo que indica que los aislados del medio ambiente de MX y AR son diferentes de los aislados clínicos. Por otra parte, los aislados clínicos de FR y PE constituyen un grupo aparte, lo que demuestra que no comparten muchas características genéticas con los aislados de MX y AR, ya que están separados por una distancia mayor. Es importante mencionar, que a pesar del pequeño número de aislados del medio ambiente ($n=5$), comparados con un número mayor de aislados clínicos ($n=50$), las diferencias genéticas observadas en el

presente trabajo pueden ser explicadas por varias razones: (i) debido quizá, a una colonización previa a la hospitalización del paciente, que bajo condiciones de inmunosupresión favoreció el desarrollo del hongo o (ii) a la presencia de una infección concomitante por múltiples aislados donde sólo uno sobrevive o es aislado y tipificado. Alternativamente, las diferencias genéticas pueden ser explicadas por estudios que han reportado que los pacientes pueden inhalar cientos de genotipos del hongo presentes en el medio ambiente, y pueden desarrollar una aspergilosis invasiva. De acuerdo a estos estudios, el porcentaje de infecciones policlonales podría establecerse entre 50-75% de los casos, y en ciertos pacientes, hasta cinco diferentes genotipos han sido detectados (Bart-Delabesse *et al.*, 1998; Bertout *et al.*, 2001). Esto también confirma que los individuos pueden estar constantemente expuestos a una gran variedad de diferentes genotipos de *Aspergillus* en el medio ambiente (Chazalet *et al.*, 1998; Menotti *et al.*, 2005).

Estos hallazgos sugieren, que sólo los aislados que se adaptan al medio ambiente del hospedero podrán crecer. Además, las diferencias genéticas, pueden ser resultado de la habilidad de los aislados que entran al paciente, para reactivar su virulencia, los cuales cambian su genotipo y pueden generar mayor variabilidad en relación al aislado original (Latgé 2003). Otra explicación sería que los aislados del medio ambiente, que son recuperadas en el laboratorio, no son necesariamente los que infectaron al paciente.

Por otro lado, el análisis de AMOVA sugiere que la variación genética de los aislados de *Aspergillus* es altamente estructurada de acuerdo a su origen geográfico y a la fuente de aislamiento. Esta estructura podría estar dada por la selección natural, como sugiere la estructura reproductiva recombinante observada y revelada por el I_A estimado para cada

grupo de aislados, donde todos los valores de I_A fueron cercanos a cero (Tabla 3). Previamente, se creía que la variabilidad observada en *A. fumigatus*, podría ser atribuida a la posibilidad de recombinaciones genéticas parasexuales (Pál *et al.*, 2007). Sin embargo, éstas son poco frecuentes y están limitadas a aislados dentro del mismo grupo de compatibilidad vegetativa. Varga (2003), menciona la posibilidad de que la variabilidad podría explicarse por la existencia de formas sexuales desconocidas o recombinaciones sexuales previas al momento en que *A. fumigatus* fue seleccionado como especie.

Estas explicaciones, apoyadas por meta-análisis realizados mediante análisis de conglomerados e índices de asociación, han demostrado que cepas que están relacionadas geográficamente son genéticamente más similares que los que no lo están. Estos hallazgos reafirman la hipótesis de que la variabilidad es debido a una recombinación ancestral y a algunas presiones de selección (Varga, 2003). Además, estas hipótesis son reafirmadas por el trabajo de Paoletti *et al.* (2005), el cual mostró que aislados de *A. fumigatus* conteniendo el dominio-alfa complementario del gene MAT fueran identificados, y mostraron la expresión de MAT-1 y MAT-2 y de los genes que codifican para feromonas sexuales y receptores para estas feromonas.

Estos resultados indican que *A. fumigatus*, tiene una historia evolutiva reciente de recombinación sexual y podría tener un potencial de reproducción sexual. Lo cual ahora, ha sido confirmado recientemente con los hallazgos de un ciclo de reproducción sexual en este hongo, donde se ha demostrado la producción de cleistotecios y ascosporas. Este estado teleomorfo (sexual), fue incluido en el género *Neosartorya*, con base en la relación morfológica y filogenética de su forma sexual (Rydholm *et al.*, 2006, Samson *et al.*, 2007)

correspondiendo a la especie *Neosartorya fumigata* O’Gorman, Fuller y Dyer sp. nov. (O’Gorman *et al.*, 2009). Por lo que esta reciente confirmación de un ciclo sexual en *A. fumigatus* podría explicar la gran diversidad genotípica encontrada entre los aislados estudiados.

Por lo que respecta a la relación entre los haplotipos (Figura 5), se vio que la mayoría de los aislados fueron agrupados según su origen geográfico, y pueden ser definidos tres grandes grupos. Grupo C donde se encuentran la mayoría de los aislados de FR, y todos los de PE, y se observa que los aislados de PE son un grupo inter-relacionado entre ellos. Sin embargo, el grupo B demostró que los aislados de AR se agrupan con algunos aislados de FR y MX. Este tipo de relación muestra un comportamiento parafilético para los aislados de AR. Además, se observan muchas reticulaciones en la red de haplotipos, con cambios mutacionales que van desde 1 a 20 entre los aislados, lo que supone de nuevo una gran variabilidad entre ellos, similar a lo publicado por Warris *et al.* (2003).

Este trabajo mostró que, tanto los aislados de *A. fumigatus* de origen clínico, como los del medio ambiente, ponen de manifiesto la diversidad genética, lo que refuerza los hallazgos de otros investigadores (Warris *et al.*, 2003).

Este hecho podría tener repercusiones en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con aspergilosis, ya que cada vez es más frecuente encontrar una mayor variación dentro de esta especie (Balajee *et al.*, 2005). Por otro lado, cambios debidos a mutaciones o recombinaciones pueden ocurrir y reflejar la resistencia de *Aspergillus* a los tratamientos anti-fúngicos (Díaz-Guerra *et al.*, 2000; Trama *et al.*, 2005).

De esta manera, el presente trabajo muestra por primera vez, un panorama sobre la epidemiología molecular de aislados de *A. fumigatus* realizado en México. Es importante considerar que la información aquí presentada, acerca de la diversidad genética de *A. fumigatus* asociada a su distribución geográfica puede ser una herramienta útil para diseñar e implementar estrategias de prevención de esta micosis.

Por otro lado, es pertinente señalar que, a fin de obtener un mayor conocimiento sobre la genética y la diversidad estructural de las poblaciones *A. fumigatus* en México, es importante considerar un mayor número de muestras, no solo de aislados clínicos, sino del medio ambiente, en estudios futuros.

CONCLUSIONES

1. Todos los aislados utilizados en este estudio fueron confirmados como *Aspergillus fumigatus* a través de criterios macro y micromorfológicos.
2. El porcentaje de variación compartida entre los aislados clínicos y del medio ambiente fue baja (9,05%) y su diferenciación genética fue estadísticamente significativa ($F_{st} = 0,253$, $P < 0,001$), lo que significa que son poblaciones diferentes.
3. La variación compartida entre los aislados agrupados de acuerdo a su origen geográfico fue ligeramente mayor (16,22%), y su diferencia fue estadísticamente significativa ($F_{st} = 0,178$, $P < 0,001$).
4. La variación entre los aislados de un mismo país fue alto (74,73%) y su diferenciación genética no fue distinta de cero ($F_{st} = 0,091$, $P = 0,046$), lo que indica que existe variabilidad genética entre todos los aislados.
5. El valor estimado del I_A para el grupo total de aislados indicó que éstos tienen un sistema reproductivo recombinante.
6. El valor estimado del I_A para grupos parciales de aislados, de acuerdo a fuente y origen geográfico, indicó que éstos tienen un sistema reproductivo recombinante.
7. El dendrograma separó los aislados clínicos y ambientales de MX y AR.
8. La red del grupo total de haplotipos AFLP, mostró que el número de cambios mutacionales entre ellos osciló entre 1 y 20.
9. La red de haplotipos agrupó los aislados de acuerdo a su origen geográfico.
10. Finalmente, de acuerdo a los resultados anteriores a pesar de que los aislados se agruparon de acuerdo a su origen geográfico, presentaron una gran variabilidad genética entre ellos.

Asimismo se observó diferente estructura de poblaciones entre los aislados clínicos y ambientales.

RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta la complejidad para la identificación de la especie *Aspergillus fumigatus* y la aparición nuevas especies, antes consideradas como *A. fumigatus*, se hace necesario realizar la caracterización fenotípica para asegurar que efectivamente estamos trabajando con la especie adecuada.

Por otro lado, es pertinente señalar que a fin de obtener un mayor conocimiento sobre la genética y la diversidad estructural de las poblaciones *A. fumigatus* en México, es importante considerar un mayor número de muestras, no solo de aislados clínicos, sino del medio ambiente, en estudios futuros.

Por último, y quizá la recomendación más importante, es la de fomentar y formar recursos humanos interesados en esta área, ya que existe un número reducido de investigadores, comparado al número de investigadores en otras áreas, que se dedican al estudio de los hongos en general, y al estudio de *A. fumigatus* en particular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca ML. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol* 17: S79-S84.
2. Allnut TR, Newton AC, Lara A, Premoli A, Armesto JJ, Vergara R, Gardner M. 1999. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Mol Ecol* 8: 975-987.
3. Amaar YG, Moore NM. 1998. Mapping of the nitrate-assimilation gene cluster (*crnA-niiA-niaD*) and characterization of the nitrite reductase gene (*niiA*) in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* 33: 206-215.
4. Anderson MJ, Gull K, Denning DW. 1996. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 Southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 34: 87-93.
5. Aufauvre-Brown A, Cohen J, Holden DW. 1992. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 30: 2991-2993.
6. Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NAR, Odds FC. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. 2007. *J Clin Microbiol* 45: 1469-1477.
7. Balajee SA, Gribsvok JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4: 625-632.

8. Bandelt H, Forster P, Röhl AA 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenie. *Mol Biol Evol* 30: 2991-2993.
9. Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. 1998. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 36: 2413-2418.
10. Bart-Delabesse E, Sarfati J, Debeaupuis JP, van Leeuwen W, van Belkum A, Bretagne S, Latgé JP. 2001. Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 39: 2683-2686.
11. Bertout S, Renaud F, Barton R, Symoens F, Burnod J, Piens M-A, Lebeau B, Viviani M-A, Chapuis F, Bastide J-M, Grillot R, Mallié M, European Research Group on Biotype and Genotype of *Aspergillus*. 2001. Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: investigation using multiple typing methods. *J Clin Microbiol* 39: 1731-1737.
12. Bonin A, Ehrich D, Manel S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol Ecol* 16: 3737-3758.
13. Brakhage AA, Langfelder K. 2002. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annu Rev Microbiol* 56: 433-455.
14. Brody H, Carbon J. 1989. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6260-6263.

15. Chacón M, Aguilar C, Pérez U, Facha MT, Gutiérrez de Velasco I, Pichardo R, Martínez M, Alessio-Robles LP. 2002. Aspergiloma sinusal. *Médica Sur* 9: 126-128.
16. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, Cornet M, Vu-Thien H, Gluckman E, Brücker G, Latgé JP. 1998. Molecular typing of environmental and patients isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol* 36: 1494-1500.
17. Cooper EE, O'Reilly MA, Guest DI, Dharmage SC. 2004. Influence of building construction work on *Aspergillus* infection in a hospital setting. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24: 472-476.
18. de Valk HA, Meis JFGM, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CHW. 2005. Use of a novel panel of nine shorts tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 43: 4112-4120.
19. de Valk HA, Meis JF, de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CH. 2007. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 45: 1415-1419.
20. Debeaupuis JP, Sarfati J, Chazalet V, Latgé JP. 1997. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 65: 3080-3085.
21. Del Palacio A, Cuétara M, Pontón J. 2003. La aspergilosis invasora. *Rev Iberoam Micol* 20: 77-78.
22. Díaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Gaztelurrutia L, Navarro JL, Tudela JL. 2000. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient

who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. *J Clin Microbiol* 38: 2419-2422.

23. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM 1992. Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491
24. Frías de León MG, Zavala AOM, Garrido JR, Nava O, Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Reyes-Montes MR. Variabilidad fenotípica de aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* procedentes de México y otros países y su relación con la variabilidad genotípica. V Congreso Nacional de Micología Médica. Guanajuato, México. 30 de julio-1 de agosto de 2009.
25. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. 2007. The Current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59: 1-10.
26. Girardin H, Sarfati J, Traoré F, Dupouy J, Derouin F, Latgé JP. 1994. Molecular epidemiology of nosocomial invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 32: 684-690.
27. Haubold B, Hudson RR. 2000. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* 16: 847-848.
28. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* 38: 1510-1515.
29. Hermida-Escobedo EC, Rodríguez-Parga D, Marín P, Hernández-Granados E. 2000. Aspergiloma pulmonar en un paciente con leucemia linfoblástica aguda. *Rev Enferm Infec Microbiol* 20: S79.

30. Hernández L, Mateo T, Romero JL. 1996. Aspergilosis pulmonar invasiva. Reporte de un caso. *Rev Enfer Infecc Microbiol* 16: 84.
31. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. 2005. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 5: 609-622.
32. Klich AM. Identification of common *Aspergillus* species. Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. The Netherlands. 2002. 116 p.
33. Latgé JP. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12: 310-350.
34. Latgé JP. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiol* 9: 382-389.
35. Latgé JP. 2003. *Aspergillus fumigatus*, a saprotrophic pathogenic fungus. *Mycologist* 17: 56-61.
36. Leenders A, van Belkum A, Behrendt M, Luijendijk A, Verbrugh HA. 1999. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. *J Clin Microbiol* 37: 1752-1757.
37. Lin D, Lehmann PF, Hamory BH, Padhye AA, Durry E, Pinner RW, Lasker BA. 1995. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 33: 1596-1601.
38. Loudon KW, Burnie JP, Coke AP, Matthews RC. 1993. Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 31: 1117-1121.

39. Lumbreras C, Gavaldá J. 2003. Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. *Rev Iberoam Micol* 20: 79-89.
40. Matsuda H, Kohno S, Maesaki S, Yamada H, Koga H, Tamura M, Kuraishi H, Sigiya J. 1992. Application of ubiquinone systems and electrophoretic comparison of enzymes to identification of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and several other species of *Aspergillus*. *J Clin Microbiol* 30: 1999-2005.
41. Manly BFJ 1997. Randomization, Bootstrap and Montecarlo methods in biology, Chapman and Hall, London, 399 pp.
42. Maynard-Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG 1993. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4384-4388.
43. Menotti J, Waller J, Meunier O, Letscher-Bru V, Herbrecht R, Candolfi E. 2005. Epidemiological study of invasive pulmonary aspergillosis in a haematology unit by molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Hosp Infect* 60: 61-68.
44. Mora Tiscareño A, Presno Bernal M, Meneses García A. 1990. Infección por hongos en autopsias de pacientes con cáncer. *Cancerología* 36: 1033-1037.
45. Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5269-5273.
46. Neugeglise C, Sarfati J, Latgé JP, Paris S. 1996. *Afut1*, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. *Nucleic Acids Res* 24: 1428-1434.

47. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer PS, Farman M, Fedorova N, Fedorova N, Feldblyum TV, Fischer R, Fosker N, Fraser A, García JL, García MJ, Goble A, Goldman GH, Gomi K, Griffith-Jones S, Gwilliam R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang J, Humphray S, Jiménez J, Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafon A, Latgé JP, Li W, Lord A, Lu C, Majoros WH, May GS, Miller BL, Mohamoud Y, Molina M, Monod M, Mouyna I, Mulligan S, Murphy L, O'Neil S, Paulsen I, Peñalva MA, Perteua M, Price C, Pritchard BL, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rawlins N, Rajandream MA, Reichard U, Renauld H, Robson GD, Rodriguez de Córdoba S, Rodríguez-Peña JM, Ronning CM, Rutter S, Salzberg SL, Sanchez M, Sánchez-Ferrero JC, Saunders D, Seeger K, Squares R, Squares S, Takeuchi M, Tekaia F, Turner G, Vazquez de Aldana CR, Weidman J, White O, Woodward J, Yu JH, Fraser C, Galagan JE, Asai K, Machida M, Hall N, Barrell B, Denning DW. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438:1151-1156.
48. O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457: 471-474.
49. Pál K, van Diepeningen AD, Varga J, Hoekstra RF, Dyer PS, Debets AJM. 2007. Sexual and vegetative compatibility genes in the aspergilli. *Stud Mycol* 59: 19-30.
50. Paoletti M, Rydholm C, Schwier EU, Anderson MJ, Szakacs G, Lutzoni F, Debeaupuis JP, Latgé JP, Denning DW, Dyer PS. 2005. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol* 15: 1242-1248.
51. Pitt JI, Samson RA. 2007. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Studies in Mycology* 59: 67-70.

52. Radford SA, Johnson EM, Leeming JP, Millar MR, Cornish JM, Foot ABM, Warnock DW. 1998. Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences. *J Clin Microbiol* 36: 1294-1299.
53. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965.
54. Reyes GE, Domínguez CG, Acuña SR. 1985. Infección por *Aspergillus* en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. *Rev Invest Clin (Méx)* 37: 97-102.
55. Reyes-Montes MR, Bobadilla del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. 1999. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmosis electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J. Clin Microbiol* 37:1404-1408.
56. Rinyu E, Varga J, Gerenczy L. 1995. Phenotypic and Genotypic análisis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 33: 2567-2575.
57. Rodriguez E, De MeeüsT, Mallie M, Renaud F, Symoens F, Mondon P, Piens MA, Lebeau B, Viviani MA, Grillot R, Nolard N, Chapuis F, Tortorano AM, Bastide JM. 1996. Multicentric epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* 34: 2559-2568.
58. Rosehart K, Richards MH, Bidochka MJ. 2002. Microsatellite analysis of environmental and clinical isolates of the opportunist fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 51: 1128-1134.

59. Rydholm C, Szakacs G, Lutzoni F. 2006. Low genetic variation and no detectable population structure in *Aspergillus fumigatus* compared to closely related *Neosartorya* species. *Eukaryot Cell* 5: 650-657.
60. Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol* 59: 147-203.
61. Schlüter PM, Harris SA. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data set containing missing data. *Mol Eco Notes* 6: 569-572.
62. Spreadbury CL, Bainbridge W, Cohen J. 1990. Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene complex of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 136: 1991-1994.
63. Tobin MB, Perry RB, Skatrud PL. 1997. An electrophoretic molecular karyotype of a clinical isolate of *Aspergillus fumigatus* and localization of the MDR-like genes *AfuMDR1* and *afu MDR2*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 29: 67-71.
64. Trama JP, Mordechai E, Adelson ME. 2005. Detection of *Aspergillus fumigatus* and a mutation that confers reduced susceptibility to itraconazole and posaconazole by real-time PCR and pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 43: 906-908.
65. Treviño-Castellano M, Rodríguez-Novoa S, Llovo-Taboada J, García Zabarte A, García Zabarte A, García_Riestra C, Regueiro-García BJ. 2003. Combined use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and touchdown polymerase chain reaction (PCR) for *Aspergillus fumigatus* epidemiologic studies. *Enferm Infect Microbiol Clin* 21: 472-476.

66. Varga J, Tóth B. 2003. Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Genet Evol* 3: 3-17.
67. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
68. Warris A, Voss A, Verweij P.E. 2001 Hospital sources of *Aspergillus* species: New routes of transmission? *Rev Iberoam Micol* 18: 156-162.
69. Warris A, Klaassen CHW, Meis JFGM, de Ruyter MT, de Valk HA, Abrahamsen TG, Gaustad P, Verweij PE. 2003. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. *J Clin Microbiol* 41: 4101-4106.
70. Wright MS, Clausen HK, Abrahamsen TG. 2004 Liver cells respond to *Aspergillus fumigatus* with an increase in C3 secretion and C3 gene expression as well as an expression increase in TLR2 and TLR4. *Immunol Lett* 95: 25-30.
71. Yeh FC, Boyle T, Rongcai Y, Ye Z, Xiyang JM. 1999. POPGENE Version 1.31. University of Alberta. Available from: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh>.
72. Zhivotovsky LA. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol Ecol* 8: 907-913.

Paginas Web

1. <http://tigr.org/>
2. <http://www.who.int/research/en/>
3. <http://www.fluxus-engineering.com>, Polzinand y Vahdati 2004
4. <http://www.mycobank.org>