



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**OBTENCIÓN DE MARCADORES
MOLECULARES PARA IDENTIFICAR
Aspergillus fumigatus Y DETECTAR SU
RESISTENCIA A ITRACONAZOL EN
AISLADOS CLÍNICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. EN C. MARÍA GUADALUPE FRÍAS DE LEÓN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de abril de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **FRÍAS DE LEÓN MARÍA GUADALUPE** con número de cuenta 94296424 con la tesis titulada: **"OBTENCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICAR *Aspergillus fumigatus* Y DETECTAR SU RESISTENCIA A ITRACONAZOL EN AISLADOS CLÍNICOS"** realizada bajo la dirección de la: **DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES**

Presidente: DRA. MARÍA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO
Vocal: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
Secretario: DRA. MARÍA DEL CARMEN CALDERÓN EZQUERRO
Suplente: DR. MIGUEL ULLOA SOSA
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 04 de junio de 2012

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al **Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**

Al Programa de becas del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico (**CVU/Becario: 172552**)

Al **Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF)**, por el apoyo financiero para la realización del proyecto de investigación. **Clave PIFUTP08-122**

Al **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)** por el financiamiento para la realización de una estancia internacional

A los miembros del **Comité Tutor**:

Dra. María del Rocío Reyes Montes por aportar a mi formación lo más valioso de su vida profesional: su experiencia. Gracias por la generosidad de compartir sus proyectos y por ayudarme a que mi actividad académica trascienda a la actividad laboral, pero sobre todo por su amistad incondicional.

Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro y Dr. Joaquín Cifuentes Blanco por regalarme el valor de su experiencia, por su disponibilidad, paciencia y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A **todos y cada uno** de los integrantes de la nueva **Unidad de Micología**, de la Facultad de Medicina, UNAM porque todos han contribuido, en diferentes maneras, a mi formación académica. Por eso, mil gracias.

A la **Dra. Esperanza Duarte Escalante** de la Facultad de Medicina, UNAM, por su apoyo en el desarrollo de la técnica AFLP, por su paciencia y amistad.

A la **Dra. June Simpson** del Cinvestav, Irapuato, por su asesoría en el desarrollo de la técnica cDNA-AFLP.

A la **Dra. Maria Lucia Taylor**, **Dra. Concepción Toriello Nájera**, **Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor** y al **Dr. Miguel Ulloa Sosa** por el valioso tiempo dedicado a la revisión y corrección de la tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
Para identificar <i>A. fumigatus</i>	13
Para detectar resistencia a ITC	13
HIPÓTESIS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Aislados de <i>A. fumigatus</i>	14
Cultivos monospóricos de los aislados de <i>A. fumigatus</i>	14
Caracterización fenotípica	16
Macromorfología.	16
Micromorfología.	16
Tamaño de conidios.	17
Tamaño de vesículas.	17
Termotolerancia.	17
Análisis de datos.	18
Microscopía electrónica de barrido.	18
Prueba de susceptibilidad a antifúngicos.	19
Obtención del marcador SCAR de identificación de <i>A. fumigatus</i> por AFLP	19
Extracción de DNA genómico.	19
Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).	21
Purificación y reamplificación de las bandas seleccionadas en AFLP.	22
Clonación de los fragmentos purificados.	23
Determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes JM109.	23
Transformación de <i>E. coli</i> .	23
Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia.	24
Purificación de plásmidos por método alcalino.	24
Secuenciación y diseño de oligonucleótidos.	25
Estandarización de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos.	25
Evaluación de la especificidad de los marcadores SCAR.	26
Sensibilidad de los oligonucleótidos para la PCR.	26
PCR tiempo real (qPCR).	26
Obtención del marcador SCAR de resistencia a ITC por AFLP	27
Obtención de aislados mutantes resistentes a ITC.	27
AFLP.	28
Obtención del marcador SCAR de resistencia a ITC por cDNA-AFLP	28
Extracción de RNA.	28
Síntesis de cDNA primera y segunda hebra.	29
cDNA-AFLP.	30
Estandarización de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos.	31
Evaluación de la especificidad de los marcadores SCAR.	31
Sensibilidad de los oligonucleótidos para la PCR.	31
RESULTADOS	31
Caracterización fenotípica	31
Macromorfología	31
Micromorfología	32
Tamaño de conidios	32
Tamaño de vesículas	33
Termotolerancia	34
Microscopía electrónica de barrido	36
Prueba de susceptibilidad a antifúngicos	36
Obtención del marcador SCAR de identificación de <i>A. fumigatus</i> por AFLP	37
Extracción del DNA genómico	37
Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).	37
Curva de concentración del isótopo P ³² para marcar el estándar de	

tamaño molecular.	37
Curva de los productos de la primera amplificación.	38
Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por AFLP.	42
Determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes JM109	42
Clonación de los fragmentos purificados.	43
Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia.	44
Purificación de plásmidos por método enzimático	44
Secuenciación y alineamiento de la secuencia.	45
Diseño de oligonucleótidos específicos para identificar <i>A. fumigatus</i> por PCR punto final.	45
Especificidad de los marcadores SCAR para identificar <i>A. fumigatus</i> por PCR punto final.	45
Sensibilidad de los marcadores SCAR para identificar <i>A. fumigatus</i> por PCR punto final.	46
Diseño de la sonda para identificar a <i>A. fumigatus</i> por PCR tiempo real (qPCR).	46
Especificidad de los marcadores SCAR para identificar <i>A. fumigatus</i> por qPCR.	47
Obtención del marcador SCAR de resistencia a ITC por AFLP	48
Obtención de aislados mutantes resistentes a ITC.	48
Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).	49
Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por AFLP.	53
Clonación de los fragmentos purificados.	55
Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia.	55
Purificación de plásmidos por método enzimático.	56
Secuenciación.	56
Comparación de las secuencias en GenBank.	57
Diseño de oligonucleótidos específicos para detectar resistencia a antifúngicos.	57
Evaluación de oligonucleótidos específicos para detectar resistencia a ITC en aislados de <i>A. fumigatus</i> .	57
Obtención del marcador SCAR de resistencia a ITC por cDNA-AFLP	62
Extracción de RNA.	62
Síntesis de cDNA primera y segunda hebra.	63
cDNA-AFLP.	64
Purificación y reamplificación de fragmentos.	66
Clonación de los fragmentos purificados cDNA-AFLP.	67
Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia.	68
Purificación de plásmidos por método enzimático.	69
Secuenciación y comparación en GenBank.	70
Diseño de oligonucleótidos.	70
Análisis de la especificidad de los marcadores SCAR de resistencia a ITC.	70
DISCUSIÓN	76
CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macromorfología de los aislados de <i>A. fumigatus</i> estudiados	32
Figura 2. Micromorfología típica de los aislados de <i>A. fumigatus</i>	32
Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de aislados de <i>A. fumigatus</i>	36
Figura 4. Cuantificación del DNA de los aislados de <i>A. fumigatus</i> , por comparación con diferentes concentraciones de DNA del fago λ (50, 100 y 150 ng/ μ L)	37
Figura 5. Curvas de concentración del estándar de tamaño molecular 50 bp DNA Ladder y de templado para la amplificación selectiva	38
Figura 6. Patrones polimórficos de los aislados de <i>A. fumigatus</i> generados por AFLP con las combinaciones de oligonucleótidos E-AA/M-CAC, E-AA/M-CTC, E-AC/M-CAC y E-AA/M-CTG	39
Figura 7. Patrón polimórfico de los aislados de <i>A. fumigatus</i> generado por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-AA/M-CAT, E-AC/M-CAT, E-AC/M-CTC y E-AC/M-CTG	40
Figura 8. Patrones polimórficos de los aislados de <i>A. fumigatus</i> , generados por AFLP con las combinaciones de oligonucleótidos E-CT/M-CAC (a) y E-CT/M-CTC (b).	41
Figura 9. Patrones polimórficos de los aislados de <i>A. fumigatus</i> , generados por AFLP con las combinaciones de oligonucleótidos E-CT/M-CAC (2a) y E-CT/M-CTC (2b).	41
Figura 10. Reamplificación de bandas comunes a todos los aislados de <i>A. fumigatus</i> , generadas por AFLP con las combinaciones de oligonucleótidos E-AA/M-CAC250 y E-CT/M-CAC500.	42
Figura 11. Clonas recombinantes obtenidas en medio LB/ampicilina/X-Gal/IPTG.	43
Figura 12. Caracterización de las clonas por PCR con oligonucleótidos universales.	44
Figura 13. Purificación y cuantificación de los plásmidos obtenidos, por método enzimático, de las clonas E-AA/M-CAC250.	45
Figura 14. Especificidad del marcador SCAR E-AA/M-CAC210 de identificación de <i>A. fumigatus</i> .	46
Figura 15. Sensibilidad del marcador SCAR E-AA/M-CAC210, con diferentes concentraciones de DNA de <i>A. fumigatus</i> .	46
Figura 16. Curva de concentración del ensayo TaqMAN (oligonucleótidos y sonda) para la detección de <i>A. fumigatus</i> por qPCR.	47
Figura 17. Amplificación por qPCR de diferentes diluciones de DNA de <i>A. fumigatus</i>	47
Figura 18. Especificidad de la qPCR con DNA de <i>A. fumigatus</i> y de otros hongos patógenos y <i>M. tuberculosis</i> .	48
Figura 19. qPCR para la detección y cuantificación de DNA de aislados de <i>A. fumigatus</i> procedentes de distintos países y fuentes.	48
Figura 20. Patrón polimórfico de aislados <i>A. fumigatus</i> resistentes y sensibles a ITC, generado por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-AC/M-CAC, E-AA/M-CTG, E-AA/M-CAT y E-AC/M-CAT.	50
Figura 21. Patrón polimórfico de aislados <i>A. fumigatus</i> resistentes y sensibles a ITC, generado por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-AC/M-CTC, E-AC/M-CTG, E-AA/M-CAC, E-AA/M-CTC.	51
Figura 22. Patrón polimórfico de aislados <i>A. fumigatus</i> resistentes y sensibles a ITC, generado por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-GA/M-CAC (a) y E-GA/M-CTC (b).	52
Figura 23. Patrón polimórfico de aislados <i>A. fumigatus</i> resistentes y sensibles a ITC, generado por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-CT/M-CAC (a) y E-CT/M-CTC (b).	53
Figura 24. Reamplificación de la banda de 300 bp originada con la combinación E-CT/M-CAC.	54
Figura 25. Curva de DNA (0,5, 1 y 2 μ L) para la reamplificación de la banda de 500 bp originada con la combinación E-GA/M-CTC.	54
Figura 26. Reamplificación de la banda de 500 bp originada con la combinación E-GA/M-CTC empleando una temperatura de alineamiento de 60 °C.	54
Figura 27. Reamplificación específica de diferentes bandas diferenciales asociadas a resistencia a ITC y VRC, detectadas en los patrones AFLP.	55
Figura 28. Caracterización de las clonas por PCR con oligonucleótidos universales.	56
Figura 29. Purificación de las bandas diferenciales de tamaño \leq 200 bp, observadas en los patrones AFLP de aislados de <i>A. fumigatus</i> .	56
Figura 30. Ejemplo de la PCR con los oligonucleótidos diseñados para detectar resistencia a ITC en aislados de <i>A. fumigatus</i> sensibles y resistentes a ITC. Los	

oligonucleótidos amplifican un fragmento de 481 bp.	58
Figura 31. Extracción de RNA de los aislados de <i>A. fumigatus</i> resistentes a ITC y VRC, usando TRIZOL® y RNAlater en cultivos recientes y vórtex como homogenizador en diferentes tiempos.	62
Figura 32. Extracción de RNA de los aislados de <i>A. fumigatus</i> resistentes a ITC y VRC, usando las condiciones óptimas.	62
Figura 33. Purificación de RNA total de aislados de <i>A. fumigatus</i> resistentes y sensibles a ITC.	63
Figura 34. Síntesis de la primera y segunda hebra de cDNA de un aislado de <i>A. fumigatus</i> resistente a ITC.	63
Figura 35. cDNA-AFLP de aislados clínicos de <i>A. fumigatus</i> con la combinación de oligonucleótidos T-GA/M-G, T-TC/M-G, T-GA/M-T y T-TC/M-T.	64
Figura 36. Patrón polimórfico de aislados de <i>A. fumigatus</i> resistentes (RI) y un aislado resistente a VRC (RV) generado por cDNA-AFLP con la combinación de oligonucleótidos T-GA/M-A (a) y T-TC/M-A (b).	65
Figura 37. Patrón polimórfico de aislados de <i>A. fumigatus</i> resistentes (RI) y un aislado resistente a VRC (RV) generado por cDNA-AFLP con la combinación de oligonucleótidos T-GA/M-C (10a) y T-TC/M-C (10b).	66
Figura 38. Purificación y cuantificación de fragmentos diferenciales menores de 200 bp para secuenciación. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.0%.	67
Figura 39. Ligación de los fragmentos T-GA/M-C500 (aislado 6578) y T-GA/M-C460 (aislado 9272) al vector pGEM-T-easy para su transformación en <i>E. coli</i> JM109.	68
Figura 40. Selección de clonas recombinantes con el fragmento de 500 bp, seleccionado del patrón polimórfico de cDNA-AFLP del aislado 6578, con la combinación T-GA/M-C.	68
Figura 41. Caracterización de las clonas por PCR con oligonucleótidos universales pUC/M13.	69
Figura 42. Purificación y cuantificación de los plásmidos de las clonas T-GA/M-C500 (aislado 6578), T-GA/M-C460 (aislado 9272), T-GA/M-C510 .	69
Figura 43. Amplificación del fragmento de 450 bp con los oligonucleótidos T-GA/M-C450F y T-GA/M-C450R con DNA de aislados de <i>A. fumigatus</i> resistentes (6578, 9272, 8571) y sensibles (MM-3) a ITC.	71
Figura 44. Amplificación del fragmento de 488 bp con los oligonucleótidos T-GA/M-C488F y T-GA/M-C488R con DNA de aislados de <i>A. fumigatus</i> resistentes (6578, 9272, 8571) y sensibles (MM-11, MM-3) a ITC.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de algunos marcadores moleculares desarrollados para el diagnóstico de la AI	8
Tabla 2. Marcadores moleculares para detectar resistencia en aislados de <i>A. fumigatus</i>	11
Tabla 3. Origen geográfico y fuente de aislamiento de los aislados de <i>A. fumigatus</i>	15
Tabla 4. Tamaño de conidios, tasa de crecimiento a diferentes temperaturas y tamaño de vesículas para los aislados de MX, PE, FR y AR	34
Tabla 5. Características fenotípicas de los aislados de <i>A. fumigatus</i> estudiados	35
Tabla 6. Resumen de los marcadores SCAR obtenidos por AFLP	59
Tabla 7. Resumen de los marcadores SCAR obtenidos por cDNA-AFLP.	72

RESUMEN

“Obtención de Marcadores Moleculares para Identificar *Aspergillus fumigatus* y Detectar su Resistencia a Itraconazol en Aislados Clínicos”

La aspergilosis invasora (AI), causada principalmente por *Aspergillus fumigatus*, es una micosis oportunista que ha emergido en los últimos años como resultado del incremento en el número de pacientes con inmunocompromiso severo, quienes son los más susceptibles a la infección. El manejo apropiado de estos pacientes depende de dos factores importantes, el primero es la identificación certera del agente etiológico, ya que hay especies causantes de AI con morfotipo prácticamente indistinguible al de *A. fumigatus*, pero que poseen un perfil de susceptibilidad a antifúngicos muy distinto, como es el caso de *A. lentulus*; y el segundo corresponde a la administración del tratamiento adecuado, con base en el resultado de pruebas de susceptibilidad a antifúngicos en los aislados clínicos, debido a que en *A. fumigatus* se ha reportado resistencia a itraconazol (ITC), que es el fármaco de elección contra el hongo. Además, las técnicas que se utilizan para establecer el diagnóstico de la AI y el tratamiento apropiado presentan ciertas limitaciones que conllevan finalmente a una elevada tasa de mortalidad en la AI. Para superar estas limitaciones, se ha recurrido a los marcadores moleculares de identificación del patógeno o de su resistencia a antifúngicos, estos marcadores se detectan a través de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Por lo que el objetivo de este trabajo fue el diseño de marcadores SCAR (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada), uno para identificación de la especie *A. fumigatus* y otro para detectar su resistencia a ITC. Para ello, se analizaron los patrones polimórficos, generados por AFLP y cDNA-AFLP, de 55 aislados de *A. fumigatus* procedentes de distintas regiones geográficas y con distintos perfiles de susceptibilidad a ITC. Para el diagnóstico, se diseñó un marcador SCAR, E-AA/M-CAC_{210(Af)} de identificación de *A. fumigatus*, a partir de bandas compartidas en los patrones polimórficos AFLP de todos los aislados estudiados. Para el tratamiento, se diseñaron 16 marcadores SCAR de resistencia a ITC con base en la selección de bandas diferenciales, reveladas por AFLP y cDNA-AFLP, entre aislados sensibles y resistentes a ITC. El marcador SCAR de identificación, E-AA/M-CAC_{210(Af)} resultó específico ya que sólo detectó el DNA de *A. fumigatus*. Además mostró gran sensibilidad al detectar hasta 1 pg de DNA por la técnica de PCR de punto final y 100 fg por PCR tiempo real (qPCR), por lo que es un candidato idóneo para la identificación del hongo *A. fumigatus*

en muestras clínicas y ambientales. Por otro lado, nueve de los 16 marcadores SCAR de resistencia a ITC, fueron diseñados con base en las secuencias de genes sobreexpresados en los aislados de *A. fumigatus* resistentes a ITC que se observaron en los patrones de cDNA-AFLP. Estos nueve marcadores, detectaron el DNA de aislados sensibles y resistentes al antifúngico, demostrando que probablemente la sobreexpresión de dichos genes, no está participando directamente en el desarrollo del fenotipo resistente de los aislados estudiados, o bien revela la necesidad de probar la utilidad de estos marcadores por medio de otras técnicas, como la RT-PCR (PCR con Transcriptasa Reversa).

ABSTRACT

“Molecular Markers for Identifying *Aspergillus fumigatus* and Detecting its Resistance to Itraconazole in Clinical Isolates”

Invasive aspergillosis (IA), mainly caused by *Aspergillus fumigatus*, is an opportunistic mycosis that has emerged in the last few years as a result of an increase in the number of severely immunocompromised patients being those generally most susceptible to infection. The adequate management of these patients depends on two important factors: the precise identification of the etiological agent, since there are IA-causing species with a morphotype almost indistinguishable from *A. fumigatus* that possess a profile sensitive to very different antimycotics, as is the case of *A. lentulus*; and secondly, the administration of the specific treatment based on antifungal susceptibility tests in clinical isolates since *A. fumigatus* has been reported to be resistant to itraconazole (ITC), a drug specifically against fungi. In addition, the techniques used for establishing the diagnosis of IA and the appropriate treatment have certain limitations that lead to a high mortality rate due to IA. In order to overcome these limitations, molecular markers for identifying the pathogen or its resistance to antifungals have been used. These markers are detected through PCR (Polymerase Chain Reaction). With this purpose in the present work, two SCAR (sequence characterized amplified region markers) markers were designed: one for identifying *A. fumigatus* species and another for detecting its resistance to ITC. For diagnostic purposes, one SCAR marker E-AA/M-CAC_{210(Af)} was designed based on the selection from shared bands in the AFLP polymorphic patterns from 55 isolates studied. For treatment purposes, 16 SCAR markers for ITC resistance were designed based on the selection of differential bands generated by cDNA-AFLP, between isolates sensitive and resistant to ITC. The SCAR marker E-AA/M-CAC_{210(Af)} was found to be specific since only detected *A. fumigatus* DNA. This SCAR marker showed great sensitivity in detecting up to 1 pg of DNA by PCR and 100 fg using real time PCR (qPCR) serving as ideal candidate for the identification of the *A. fumigatus* fungus in clinical and environmental samples.

On the other hand, nine of the 16 SCAR markers of resistance to ITC, were designed based on the sequences of overexpressed genes in isolates of *A. fumigatus* resistant to ITC, that were observed in cDNA-AFLP polymorphic patterns. These nine markers detected the DNA of isolates sensitive and resistant to antifungal; probably showing that overexpression of these genes is not directly involved in the development of resistant

phenotype of the isolates studied, or reveals the need to test the usefulness of these markers by other techniques such as RT-PCR (reverse transcriptase PCR).

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se ha reportado un incremento notable en la incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas invasoras, que surgen como resultado del aumento de diversas enfermedades que alteran el estado inmune de los individuos. Entre las micosis emergentes, destaca la aspergilosis invasora (AI) por su elevada tasa de mortalidad y mal pronóstico. La AI puede ser causada por diferentes especies del género *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, y *A. flavus*), así como por otras especies que pertenecen a la sección *Fumigati* (*A. lentulus*, *Neosartorya fischeri*, *N. pseudofischeri*, *N. hiratsukae* y *N. udagawe*), la cual ha sido recientemente reclasificada y actualmente contiene 25 especies diferentes, con 8 estados anamorfos y 17 teleomorfos (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). Sin embargo, *A. fumigatus* es la especie responsable de más del 90 % de los casos de AI en los humanos (Latgé, 2001; Kriengkauykiat *et al.*, 2011).

A. fumigatus es un hongo filamentoso, termófilo, saprófito, ubicuo y que esporula abundantemente. Sus pequeños conidios (2-3 μm) se dispersan a través de las corrientes de aire y se mantienen suspendidos en el medio ambiente durante un largo periodo de tiempo, facilitando su entrada a los alvéolos pulmonares de hospederos (Latgé, 1999; Latgé, 2001). La inhalación de conidios por hospederos inmunocompetentes rara vez genera una infección, debido a que el sistema inmune es capaz de eliminar completamente al hongo (Wright *et al.*, 2004). Sin embargo, en el caso de hospederos inmunocomprometidos, los conidios pueden germinar y causar una infección, que incluso puede resultar mortal (Abad *et al.*, 2010). El rango de enfermedades causadas por *A. fumigatus* es amplio y heterogéneo, incluye el asma alérgica, la aspergilosis broncopulmonar alérgica, el aspergiloma y la AI. La gravedad de estas formas clínicas es variable y depende fundamentalmente de factores relacionados con el huésped. Los principales grupos de riesgo para desarrollar la aspergilosis, especialmente la AI, son los pacientes neutropénicos con enfermedades hematológicas malignas, receptores de trasplante de células hematopoyéticas, receptores de trasplante de órgano sólido y pacientes de alto riesgo en unidades de cuidados intensivos o con daño pulmonar (Perfect *et al.*, 2001; Kriengkauykiat *et al.*, 2011).

Numerosos trabajos han demostrado el aumento en la incidencia de la AI y su elevada mortalidad, algunos autores reportan mortalidades que alcanzan el 94 % en pacientes sometidos a trasplante (Wingard *et al.*, 1987; Hopwood *et al.*, 1995). En un estudio realizado con 18 pacientes sometidos a trasplante de médula ósea, el 5 % desarrolló

aspergilosis pulmonar invasora, con un 82 % de mortalidad, en ninguno de los pacientes se detectaron anticuerpos y sólo en uno se detectó antígeno de *Aspergillus* unos días antes de su muerte (Saugier-Weber *et al.*, 1993). En los últimos años, la AI ha alcanzado gran importancia, debido a que afecta del 5-20 % de pacientes con enfermedad hematológica maligna y transplantados, con una tasa de mortalidad del 30-60 % (Bow, 2008; Nivoix *et al.*, 2008). De acuerdo con datos epidemiológicos en otros países, la incidencia de la AI es de 1.6 % y es considerada como la infección fúngica invasora más común en trasplante de células hematopoyéticas (43 %), causada fundamentalmente por *A. fumigatus* en el 44 % de los casos (Kriengkauykiat *et al.*, 2011). En otros estudios se ha encontrado que el 75 % de los enfermos no reciben terapia antifúngica debido a dificultades en el diagnóstico, ya que en muchos de los casos la detección del patógeno se logra únicamente en estudios *post-mortem*. Además, recientemente se ha demostrado que una mala identificación de las especies pertenecientes a la sección *Fumigati*, con morfotipo casi idéntico al de *A. fumigatus* pero genéticamente distintas, propicia un inadecuado manejo farmacológico de los pacientes con AI, porque dichas especies, como *A. lentulus*, son resistentes a los antifúngicos usados contra *A. fumigatus* (Balajee *et al.*, 2006). Esto indica que la supervivencia de los pacientes con AI depende de un diagnóstico certero y oportuno, que permita un tratamiento correcto de la infección (Ansorg *et al.*, 1994; Groll *et al.*, 1996; Patterson *et al.*, 2000; Treviño *et al.*, 2003).

El diagnóstico definitivo de las micosis se realiza, de preferencia, con el aislamiento del agente causal de muestras clínicas en cultivo; sin embargo, en el caso de *A. fumigatus* este método tiene el inconveniente de no diferenciar fehacientemente entre colonización, invasión y contaminación. Además, en el caso de que el cultivo resulte positivo se requiere confirmación por histología, ya que la presencia de micelio tabicado en tejidos viables, es el estándar de oro que permite establecer la existencia de infección invasora en pacientes inmunodeprimidos. Tales inconvenientes hacen necesario recurrir a métodos más rápidos, precisos y sensibles que permitan evidenciar la presencia de pequeñas cantidades del agente etiológico o de sus productos en muestras del paciente, por lo que se recomienda el uso de métodos de inmunodiagnóstico para detectar la presencia de antígeno galactomanano por medio de ELISA y la técnica de aglutinación en látex, entre otras. Sin embargo, éstas técnicas también presentan ciertas limitaciones como son las reacciones cruzadas con otras especies de hongos causantes de cuadros clínicos semejantes (Herbrecht *et al.*, 2002).

En los últimos años, se han diseñado varios marcadores moleculares (sondas de DNA) para utilizarse, a través de la PCR en sus diferentes modalidades, en el diagnóstico de la AI (Tabla 1). La aplicación de estos marcadores tiene grandes ventajas, entre las que se distinguen la detección del hongo en las primeras fases de la enfermedad; aún cuando no es posible cultivarlo, la identificación del patógeno *in situ*; y quizá una de las ventajas más importantes es que permite diferenciar entre las especies patógenas de *Aspergillus* (Warnock *et al.*, 2000). Esto es especialmente importante porque una identificación errónea de la especie repercute en la terapia farmacológica de los pacientes, debido a que, como se mencionó anteriormente, existen varias especies con morfotipos casi indistinguibles al de *A. fumigatus*, que presentan diferentes perfiles de susceptibilidad a los antifúngicos, como es el caso de *A. lentulus* (Balajee *et al.*, 2005). Aunque son evidentes las grandes ventajas del uso de los marcadores moleculares para la detección de *A. fumigatus*, existen diversos factores que limitan su aplicación, uno de los más importantes es la reproducibilidad, ya que en muchas ocasiones los resultados que se obtienen en diferentes laboratorios no son equiparables (Balajee *et al.*, 2007a y b). Otro factor importante es la sensibilidad de los marcadores moleculares para detectar el material genético del *A. fumigatus* en muestras clínicas, ya que la liberación y circulación del DNA fúngico en diferentes fluidos corporales es variable, de tal manera que un ensayo que no sea lo suficientemente sensible para detectarlo en la concentración en que se encuentre generará resultados falsos-negativos.

Tabla 1. Características de algunos marcadores moleculares desarrollados para el diagnóstico de la AI

Marcador Molecular	Especificidad	Utilidad	Referencia
Secuencia del gen 18S del rRNA	<i>Aspergillus</i> sp.	Detección de <i>Aspergillus</i> en muestras de sangre	Kami <i>et al.</i> , 2001
Fragmento de las regiones ITS1 e ITS2 del rRNA	<i>A. fumigatus</i>	PCR tiempo real es muy sensible y específico para detectar <i>A. fumigatus</i> en modelo animal con AI	O'Sullivan <i>et al.</i> , 2003
Secuencia del mtDNA	<i>A. fumigatus</i> y <i>Neosartorya</i> spp.	Detección de <i>A. fumigatus</i> en biopsias y lavado broncoalveolar de pacientes con AI	Rantakokko <i>et al.</i> , 2003
Secuencia del gen del citocromo b mitocondrial	<i>A. fumigatus</i>	Cuantificación de la carga fúngica en lavado broncoalveolar y sangre	Spiess <i>et al.</i> , 2003
Amplificación de una región 18S	<i>Aspergillus</i> spp.	Detección y cuantificación de DNA fúngico en modelo murino de aspergilosis pulmonar	Buitrago <i>et al.</i> , 2005
Secuencia del gen 18S del rRNA	<i>A. fumigatus</i>	Detección de <i>A. fumigatus</i> por PCR-ELISA en modelo murino, es más sensible que la detección de galactomanano	Scotter and Chambers, 2005
Región del gen 28S del rDNA	<i>Candida</i> spp y <i>Aspergillus</i> spp.	PCR tiempo real detecta a la vez especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Candida</i>	Baskova <i>et al.</i> , 2007
Secuencia de una región ITS del rDNA	<i>Aspergillus</i> spp.	Identificación de <i>Aspergillus</i> spp. a partir de cultivo	Zhao <i>et al.</i> , 2001
Fragmento del gen 18S del rDNA	<i>Aspergillus</i> spp.	Útil para guiar el tratamiento de aspergilosis y mucormicosis	Rickerts <i>et al.</i> , 2006
Secuencias parciales de los genes β -tubulina y rodlet A	<i>A. fumigatus</i>	Identificación específica de <i>A. fumigatus</i> dentro de la sección <i>Fumigati</i>	Serrano <i>et al.</i> , 2011

Por otro lado, aunado al aumento de las infecciones nosocomiales causadas por hongos, la administración de antifúngicos, tanto a nivel profiláctico como terapéutico, también se ha incrementado. Los antifúngicos disponibles para tratar la AI son la anfotericina B; los triazoles de amplio espectro, como itraconazol (ITC), voriconazol (VRC), posaconazol (PSC); y caspofungina (Herbrecht *et al.*, 2002).

La anfotericina B es un fármaco poliénico que presenta alta afinidad al ergosterol, componente principal de la membrana celular fúngica, donde genera poros de 40-105 nm de diámetro, provocando inestabilidad y muerte celular por la pérdida de potasio y otras moléculas intra-citoplásmicas (Goodman-Gilman *et al.*, 1998). No obstante su acción fungicida, la anfotericina B es altamente tóxica y puede causar daño renal severo, por lo que los azoles son una alternativa terapéutica. Los azoles son fungistáticos que bloquean la vía de la biosíntesis del ergosterol, mediante la inhibición de la enzima 14 α -lanosterol desmetilasa, enzima clave en la producción y mantenimiento de la pared celular fúngica, que es codificada por el gen *cyp51A* y *cyp51B* (Díaz-Guerra *et al.*, 2003). Los azoles se unen, a través de uno de sus átomos

de nitrógeno del anillo azólico, al átomo de hierro del grupo heme localizado en el centro de la proteína Cyp51 y, probablemente, bloquea el acceso del lanosterol al sitio activo, donde el C14 es desmetilado. Este bloqueo provoca una disminución en el contenido de ergosterol, la sustitución de esteroides metilados en la membrana fúngica y la acumulación de esteroides intermediarios tóxicos que inhiben el crecimiento celular, y además, altera diferentes sistemas enzimáticos unidos a la membrana, como los de transporte de nutrientes y síntesis de quitina (White *et al.*, 1998; Snelders *et al.*, 2010).

El uso no controlado de estos antifúngicos para combatir la aspergilosis, así como otras micosis, ha conducido al desarrollo de resistencia en *A. fumigatus*, lo que limita la eficacia de la terapia (Chryssanthou *et al.*, 1997; Denning *et al.*, 1997; Cuenca-Estrella *et al.*, 1999). El incremento en la incidencia de la resistencia ha sido notada en varias regiones geográficas (Pfaller *et al.*, 2011; Alanio *et al.*, 2010). Además, se han acumulado evidencias de que, la exposición ambiental del hongo a los compuestos azólicos usados como fungicidas para el control de plagas, puede ser una importante ruta para el desarrollo de la resistencia (Snelders *et al.*, 2009; Verweij *et al.*, 2009; Mortensen *et al.*, 2010; Chowdhary *et al.*, 2011). Este hallazgo es importante porque podría provocar un desplazamiento de los aislados sensibles por aislados resistentes en el ambiente (Denning *et al.*, 1997).

Cabe mencionar que la incidencia de la resistencia a los fármacos en todos los microorganismos patógenos es un proceso evolutivo iniciado por exposición a los agentes antimicrobianos (Cowen *et al.*, 2002). Debido a que los fungistáticos, como los triazoles, raramente erradican la población completa del patógeno, las células fúngicas sobrevivientes quedan sujetas a una fuerte selección direccional para resistencia, es decir, la resistencia depende de la tasa de mutación a la resistencia y del tamaño de la población sobreviviente.

En *A. fumigatus*, se han propuesto dos mecanismos de resistencia a azoles: el primero es la baja acumulación intracelular debido, ya sea a la sobreexpresión de bombas de eflujo (Slaven *et al.*, 2002) o a la penetración reducida del fármaco hacia la célula fúngica (Manavathu *et al.*, 1999). El otro mecanismo de resistencia es a través de la modificación de la enzima Cyp51 debido a mutaciones puntuales en el gen *cyp51A* que la codifica (Osherov *et al.*, 2001). Sin embargo, el mecanismo más estudiado son las mutaciones puntuales específicas en *cyp51A* que conducen a sustitución de aminoácidos y que pueden resultar en resistencia a uno de los diferentes azoles o resistencia cruzada. La variedad de mutaciones asociadas a resistencia a azoles revela que la resistencia en *A. fumigatus* puede ser más frecuente de lo que se tiene

conocimiento, y que por lo tanto los laboratorios de microbiología clínica deberían determinar obligatoriamente la susceptibilidad *in vitro* de los aislados de *Aspergillus* spp. clínicamente relevantes (Pfaller *et al.*, 2011).

Hasta hace algunos años, la resistencia a azoles en aislados clínicos de *A. fumigatus* era considerada un fenómeno poco común, pero en la actualidad ha sido reportada como emergente y es reconocida como una de las principales causas de falla en el tratamiento de los pacientes (Verweij *et al.*, 2007; Howard *et al.*, 2011; Snelders *et al.*, 2008). El aumento de los aislados de *A. fumigatus* resistentes a azoles, ha renovado el interés por el desarrollo de nuevos antifúngicos con diferentes mecanismos de acción. Así mismo, el aumento en el número de casos de aspergilosis, la falla terapéutica provocada por resistencia del hongo frente a los antifúngicos empleados y el mal pronóstico que presentan muchos de estos pacientes, han suscitado el interés por el desarrollo de herramientas que permitan determinar la susceptibilidad del patógeno frente a cada antifúngico para elegir el tratamiento ideal en cada caso de aspergilosis (Harari, 1999; Lai *et al.*, 2008), ya que las pruebas *in vitro* de susceptibilidad a antifúngicos, disponibles en la actualidad, basadas en el protocolo del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), y el modificado por el European Comité on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), presentan diversos inconvenientes, como son la falta de puntos de corte definidos y el tiempo prolongado, 48 horas o más, para obtener un resultado (Document M38-A2. NCCLS, 2008). Es por ello que los marcadores moleculares, son una excelente alternativa para detectar aislados resistentes de una manera rápida y eficiente (Garcia-Effron *et al.*, 2008). Con este propósito, se han diseñado marcadores moleculares con base en las diferentes mutaciones asociadas a resistencia a triazoles en *A. fumigatus* (Howard *et al.*, 2009) (Tabla 2).

Tabla 2. Marcadores moleculares para detectar resistencia en aislados de *A. fumigatus*

Mutación detectada por el marcador molecular	Utilidad	Referencia
L98H en <i>cyp51</i>	Detección de resistencia a ITC y PSC en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Díaz-Guerra <i>et al.</i> , 2003
M220 en <i>cyp51</i>	Detección de resistencia a ITC en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Mellado <i>et al.</i> , 2004
G54 en <i>cyp51</i>	Detección de resistencia a ITC y PSC en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Trama <i>et al.</i> , 2005
G54 en <i>cyp51</i>	Detección de resistencia a ITC y PSC en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Balashov <i>et al.</i> , 2005
L98 y una repetición en tándem de 34 bp en <i>cyp51</i>	Detección de resistencia cruzada a azoles en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Mellado <i>et al.</i> , 2007
G54, L98, 220 y G138	Detección de resistencia cruzada a azoles en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Corné <i>et al.</i> , 2010
P216 y F219	Detección de resistencia a ITC y PSC en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Camps <i>et al.</i> , 2011

En un principio estos marcadores resultaron adecuados para detectar la susceptibilidad a azoles en aislados clínicos de *A. fumigatus*, permitiendo seleccionar el tratamiento específico en los pacientes con aspergilosis, y disminuir la mortalidad de los pacientes por falla terapéutica. Sin embargo, su uso actual es limitado debido a que en la misma secuencia del gen *cyp51A* se han identificado otras mutaciones diferentes, por lo menos trece, en distintos codones del gen *cyp51A* asociadas al fenotipo resistente a azoles. Además, publicaciones recientes han revelado que la resistencia a azoles en *A. fumigatus* es un fenómeno multifactorial, y que incluso aislados que presentan mutaciones en *cyp51A* no presentan un fenotipo resistente a azoles (Escribano *et al.*, 2011), lo que justifica la permanente búsqueda de marcadores moleculares para identificar resistencia a azoles en el hongo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos 20 años, *A. fumigatus* ha evolucionado de un hongo patógeno de poco interés médico hasta uno de los principales causantes de infección invasora en pacientes inmunocomprometidos. La razón principal de este cambio es el incremento, de la población susceptible a la AI, en quienes además la tasa de mortalidad es muy elevada (Latgé, 1999; Bow, 2008; Nivoix *et al.*, 2008). Esta mortalidad se atribuye a fallas diagnósticas y terapéuticas debido a que, en nuestro país, no existen herramientas adecuadas para la identificación del hongo a nivel de especie, ni para establecer una terapia efectiva con base en la selección del antifúngico adecuado. Aunque existen en la

actualidad marcadores moleculares para identificar *A. fumigatus* hay diversos inconvenientes para su aplicación confiable, uno de los más importantes es la reproducibilidad, ya que en muchas ocasiones los resultados que se obtienen en diferentes laboratorios no son equiparables; asimismo, las pruebas para detectar susceptibilidad a antifúngicos, a la fecha, no tienen valores de corte bien definidos, por lo tanto los resultados que se obtienen son orientadores mas no determinantes. Es por ello que se requieren otro tipo de estrategias para la identificación del hongo y la determinación de la susceptibilidad a los antifúngicos. Dentro de los marcadores moleculares más destacados están los denominados SCAR (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada), los cuales han sido útiles para estudiar variación entre organismos, identificar cepas de interés, determinar el origen de los aislados, estudiar estructura de poblaciones, así como detectar genes de resistencia a plagas (Xu *et al.*, 2001; 2003), estudiar la persistencia de cepas asperjadas el campo como control biológico, identificar de híbridos en plantas; además desarrollar ensayos sensibles capaces de relacionar el grado de enfermedad con el nivel de inóculo. En diferentes áreas de la investigación se han utilizado este tipo de marcadores (Weber *et al.*, 2002; Castrillo *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2001; 2003), demostrando que son una herramienta importante para la identificación específica de organismos o de características particulares de los mismos (Abbasi *et al.*, 1999). Los marcadores SCAR se han obtenido con fines de aplicación diagnóstica y epidemiológica de hongos patógenos para el hombre, como es el caso de *Histoplasma capsulatum* (Frías De León *et al.*, 2012). Debido a la exitosa aplicación de los marcadores SCAR dentro de diferentes áreas, en este trabajo planteamos la obtención de marcadores SCAR que identifiquen específicamente aislados de *A. fumigatus* procedentes de diferentes áreas geográficas, ya que existe una gran variabilidad genética entre los aislados de México (MX) y distintas regiones geográficas (Duarte-Escalante *et al.*, 2009). Así mismo planeamos la obtención de marcadores moleculares tipo SCAR de resistencia a ITC, el cual sería de gran utilidad para elegir el tratamiento adecuado en los pacientes con aspergilosis, evitar fallas terapéuticas, y así disminuir la mortalidad entre los pacientes afectados.

Es importante mencionar que la obtención de marcadores moleculares para el diagnóstico y tratamiento de la aspergilosis, permitirá tener un panorama general de la tasa de incidencia de la aspergilosis y resistencia a los antifúngicos en MX. Este hecho es relevante, ya que nuestro país carece de datos epidemiológicos sobre la aspergilosis y de estudios de susceptibilidad a antifúngicos, debido a que ésta es una entidad nosológica no considerada de reporte obligatorio, por lo que los datos más

sobresalientes se reducen a estudios retrospectivos de pacientes con diagnóstico de infecciones micóticas y a la publicación de casos clínicos aislados; sin embargo, la frecuencia de casos de aspergilosis en el Instituto Nacional de Cancerología, MX (comunicación personal), resalta la importancia de este patógeno y su asociación con hospederos inmunodeprimidos.

OBJETIVO GENERAL

Obtener marcadores SCAR, uno para identificar *A. fumigatus* y otro para detectar resistencia a ITC, a partir de aislados clínicos del hongo.

OBJETIVOS PARTICULARES

Para identificar *A. fumigatus*

1. Caracterizar fenotípicamente 55 aislados de *A. fumigatus* por macro y micromorfología, termotolerancia y sensibilidad a ITC.
2. Comparar los patrones polimórficos generados, por AFLP, a partir del DNA de los aislados de *A. fumigatus* para seleccionar una banda común en todos los aislados.
3. Generar marcadores SCAR específicos para *A. fumigatus*, a partir de la banda común en los aislados estudiados.
4. Evaluar la especificidad y sensibilidad de los marcadores SCAR

Para detectar resistencia a ITC

5. Comparar los patrones polimórficos generados, por AFLP, a partir del DNA y cDNA de los aislados de *A. fumigatus* sensibles y resistentes a ITC, para detectar bandas diferenciales asociadas a la resistencia a dicho antifúngico.
6. Obtener marcadores SCAR de resistencia a ITC, a partir de las bandas diferenciales generadas por AFLP de aislados de *A. fumigatus*.
7. Valorar los marcadores SCAR con todos los aislados previamente tipificados como sensibles o resistentes a ITC.

HIPÓTESIS

El marcador SCAR específico para *A. fumigatus*, identificará aislados clínicos procedentes de distintas regiones geográficas.

El marcador SCAR para detectar resistencia a ITC en *A. fumigatus*, distinguirá entre aislados sensibles y resistentes a este antifúngico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *A. fumigatus*. Se utilizaron 55 aislados (clínicos y ambientales) de *A. fumigatus*, procedentes de MX, Argentina (AR), Francia (FR) y Perú (PE) (Tabla 3). Los aislados pertenecen a los ceparios de los Laboratorios de Micología Molecular, Facultad de Medicina, UNAM, MX; y de Hongos Miceliales, Departamento de Micología INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, AR.

Cultivos monospóricos de los aislados de *A. fumigatus*. A partir de cada aislado cultivado en agar papa dextrosa (PDA) (Bioxon®, DF, MX) a 37 °C durante 2-4 días, se obtuvo una suspensión de conidios con 1 mL de amortiguador de fosfatos, pH 7.4, adicionado con Tween 20 al 0.05% (PBST 20). Enseguida, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución que permitió cuantificar el número de conidios en una cámara de Neubauer, para ajustar a 100 conidios/50 µL y se colocaron en el centro de una caja de Petri con PDA. Las cajas fueron incubadas a 37 °C y revisadas hasta que se observó crecimiento colonial, se seleccionó una sola colonia por cada caja y se cultivó en tubos con PDA a 37 °C (Cano-Ramírez, 2003). Los cultivos monospóricos obtenidos fueron conservados en frascos con agua estéril a 4 °C y en tubos con PDA y aceite mineral a temperatura ambiente.

Tabla 3. Origen geográfico y fuente de aislamiento de los aislados de *A. fumigatus*

Clave del aislado	Origen geográfico	Fuente de aislamiento
MM-7	México	Ambiental
MM-8	México	Ambiental
MM-9	México	Clínico
MM-10	México	Clínico
MM-11	México	Clínico
MM-32	México	Clínico
MM-33	México	Clínico
MM-34	México	Clínico
MM-35	México	Clínico
MM-36	México	Clínico
MM-37	México	Clínico
MM-38	México	Clínico
MM-39	México	Clínico
MM-45	México	Clínico
MM-46	México	Clínico
Amb. III	Argentina	Ambiental
Amb. V	Argentina	Ambiental
Amb. VIII	Argentina	Ambiental
951740	Argentina	Clínico

951744	Argentina	Clínico
951746	Argentina	Clínico
951722	Argentina	Clínico
951733	Argentina	Clínico
951734	Argentina	Clínico
951736	Argentina	Clínico
951737	Argentina	Clínico
951738	Argentina	Clínico
951739	Argentina	Clínico
951740a	Argentina	Clínico
951741	Argentina	Clínico
951744a	Argentina	Clínico
951745	Argentina	Clínico
951746a	Argentina	Clínico
951747	Argentina	Clínico
951748	Argentina	Clínico
88248	Argentina	Clínico
90370	Argentina	Clínico
982928	Argentina	Clínico
993315	Argentina	Clínico
9272	Argentina	Clínico
8571	Argentina	Clínico
6578	Argentina	Clínico
21363	Argentina	Clínico
Af-8	Francia	Clínico
Af-11	Francia	Clínico
Af-15	Francia	Clínico
Af-22	Francia	Clínico
Af-26	Francia	Clínico
Af-29	Francia	Clínico
Af-34	Francia	Clínico
Af-35	Francia	Clínico
Af-41	Francia	Clínico
51435	Perú	Clínico
51594	Perú	Clínico
53027	Perú	Clínico
53097	Perú	Clínico

Para la prueba de especificidad de los marcadores SCAR de identificación de *A. fumigatus*, se utilizaron DNAs de *Coccidioides immitis*, *C. posadassi*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *A. niger*, *Sporothrix schenckii*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Malbranchea* sp., *Chrysosporium charmichaelli*, *A. lentulus* y *Mycobacterium tuberculosis*. Los cultivos de *Malbranchea* sp., *Chrysosporium charmichaelli*, *B. dermatitidis* y el DNA de *C. neoformans*, fueron proporcionados por la Dra. Laura Rosio Castañón, Laboratorio de Micología Médica, Fac. Medicina, UNAM. Los DNAs de *A. lentulus* y *M. tuberculosis* fueron donados por la Dra. Emilia Mellado del Instituto de Salud Carlos III, España; y por la Dra. Miriam Bobadilla del Valle del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”. S.S, respectivamente.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

La caracterización fenotípica de los 55 aislados de *A. fumigatus* se llevó a cabo para corroborar su identidad y descartar otras especies, particularmente *A. lentulus*.

Macromorfología. Los aislados de *A. fumigatus* se sembraron en cajas de Petri con PDA y se incubaron a 37 °C durante 4 días, posteriormente se observaron las características morfológicas coloniales de cada cultivo (color y textura de la colonia). Para el registro de macromorfología de los aislados, se tomaron fotografías con una cámara digital (SONY Cyber-shot 8.1 mega pixeles).

Micromorfología. Las características micromorfológicas de los 55 aislados de *A. fumigatus* se analizaron mediante la técnica de microcultivo (Ridell, 1950). Se cortaron asépticamente bloques de 1 cm² de PDA, cada bloque se colocó sobre un portaobjetos estéril, se inocularon las cuatro aristas superiores con cada aislado estudiado, se colocó un cubreobjetos estéril sobre el bloque de PDA y se incubó dentro de una caja de Petri a 37 °C durante 4 días. Para evitar la deshidratación del agar durante la incubación, se colocó un algodón humedecido con agua estéril dentro de las cajas de Petri. Posteriormente, se separó cuidadosamente el cubreobjetos del medio de cultivo y se depositó sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se observó al microscopio (Olympus America Inc., Melville, NY, USA), para analizar las características micromorfológicas de cada uno de los aislados. Las características que se tomaron en cuenta fueron el tipo de micelio, la forma y tamaño de los conidios y las vesículas. Las características microscópicas de los aislados fueron registradas a través de una cámara digital (SONY).

Tamaño de conidios. Se colocó una gota de azul de algodón en un portaobjetos y una asada de conidios de cada uno de los aislados de *A. fumigatus*, cultivados en PDA e incubados a 37 °C durante 4 días, posteriormente se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio con el objetivo 40X. Se midió el diámetro de 30 conidios por cada aislado, con un micrómetro ocular calibrado (Olympus). El tamaño de los conidios fue registrado a través de una cámara digital (SONY).

Tamaño de vesículas. Usando un micrómetro ocular calibrado (Olympus), se midió el tamaño (ancho) de 10 vesículas de cada uno de los aislados de *A. fumigatus*, cultivados en PDA a 37 °C durante 4 días.

Termotolerancia. A partir del crecimiento de cada aislado durante 4 días en PDA a 37 °C, se preparó una suspensión de conidios con 1 mL de PBST 20, se cuantificaron los conidios en una cámara de Neubauer y ajustaron a 5×10^3 conidios. Los conidios se inocularon, por triplicado, en un disco de papel filtro colocado en el centro de cajas de Petri con PDA y se incubaron a 28, 37 y 48 °C, durante 4 días. Posteriormente, se determinó la tasa de crecimiento de los aislados, a cada temperatura, empleando la fórmula: [(Diámetro de la colonia – diámetro del confeti/días de incubación)]. También se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento (% IC) a 28 y 48 °C empleando la fórmula: [(diámetro de la colonia a 37 °C – diámetro de la colonia a 28 o 48 °C/diámetro de la colonia a 37 °C) X 100] (Mesa-Arango *et al.*, 2002). Para identificar los aislados de *A. fumigatus* termosensibles o termoresistentes, se obtuvo el promedio de %IC a 28 y 48 °C tomando en cuenta los 55 aislados. Se consideraron termosensibles todos los aislados que presentaron un valor de %IC mayor al promedio, mientras que los que presentaron un valor de %IC menor al promedio fueron clasificados como termorresistentes.

Análisis de datos. Con los datos de tamaño de conidios, de vesículas y tasa de crecimiento a las diferentes temperaturas se llevó a cabo un análisis de varianza de un factor (ANOVA) ($\alpha= 0.05$) y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey para detectar diferencias significativas. Los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 12.0 (Montgomery, 1991).

Microscopía electrónica de barrido. Los bloques de agar, de los microcultivos de aislados de *A. fumigatus* representativos de MX, AR, FR y PE, se fijaron en paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 1 % en buffer de cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.2 durante 5 h. Se lavaron con buffer de cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.2, tres veces por 10 min cada uno, se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1 % durante 2 h. Se procedió a cortar manualmente el exceso de agar de las muestras tanto de la base como de los extremos dejando únicamente el material a observar. Se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con buffer de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2. Se deshidrataron con alcohol etílico absoluto de forma ascendente de la siguiente manera: alcohol al 30 % por 10 min a temperatura ambiente, alcohol al 50 % por 10 min a temperatura ambiente, alcohol al 60 % por 10 min a temperatura ambiente, alcohol al 70 % por 10 min a temperatura ambiente, alcohol al 80% por 10 min a temperatura ambiente, alcohol al 90

% por 10 min a temperatura ambiente., alcohol al 100 % por 15 min a temperatura ambiente, con dos cambios de alcohol. Posteriormente, las muestras se desecaron a punto crítico en un desecador Samdri-780 A (Tousimis Research, Rockville, MD, USA), utilizando CO₂. Las muestras se colocaron en porta especímenes y se depositaron en un evaporador de alto vacío para cubrir con oro durante 6 min utilizando un ionizador JEOL JFC-1100 (Fine Coat® ion Sputter, JEOL Ltd, Tokyo, JP). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de Barrido DSM-950 (Zeiss, Oberkochen, GE) (Novell, 1980).

Prueba de susceptibilidad a antifúngicos. Esta prueba se llevó a cabo de acuerdo con las directrices señaladas para hongos miceliales en el documento M38-A2 del National Committee for Clinical Laboratory Standards (2008). El medio de cultivo empleado fue el RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) amortiguado con ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Cada aislado se cultivó en PDA a 35 °C durante siete días. El inóculo se preparó mediante el barrido de la superficie de las colonias con un asa en aro, se resuspendió en solución salina estéril, se filtró para remover las hifas y se ajustó a $1-5 \times 10^4$ UFC/mL. Se adicionó Tween 20 para facilitar la preparación del inóculo. Para determinar la sensibilidad a los antifúngicos se usó anfotericina B (AMB) (Sigma), ITC (Janssen-Cilag Farmacéutica SA, Buenos Aires, AR) y VRC (Pfizer S.A.C.I., Buenos Aires, AR) como polvos estándar de potencia conocida. Las soluciones stock de cada antifúngico se prepararon con dimetil sulfóxido (Sigma) y se diluyeron con RPMI 1640. El rango de concentraciones empleado fue de 0.0313-16 mg/L para los tres antifúngicos. Las diluciones de los fármacos se colocaron en placas para microdilución de 96 pocillos (Nuncclon 167008, Nunc, Naperville, IL, USA). Las microplacas se incubaron sin agitación a 35 °C durante 46-50 horas. La lectura de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para los tres antifúngicos se definió como la menor concentración a la que el fármaco inhibe sustancialmente el crecimiento del microorganismo, detectado visualmente, en comparación con el crecimiento control (Cepa ATCC 55). Aunque no existen valores de corte definidos para estos antifúngicos, se considera que un valor de $CIM \geq 4$ mg/L indica resistencia al fármaco.

OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR DE IDENTIFICACIÓN DE *A. fumigatus* POR AFLP

Extracción de DNA genómico. A partir de cada cultivo monospórico de *A. fumigatus* sembrado en PDA, se obtuvo una suspensión de conidios de la siguiente manera: se agregó a cada tubo 1 mL de PBST y se resuspendió por agitación en vórtex (Daigger vortex Genie 2 Scientific Industries, Inc, Bohemia NY, USA), posteriormente se sembró en medio líquido YEPD (extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, dextrosa 2 %), inmediatamente se incubaron a 37 °C en agitación durante 2 días o hasta observar crecimiento micelial. Se cosechó individualmente la biomasa micelial de cada aislado por filtración en un embudo Büchner con papel filtro estéril. Enseguida, se lavó el micelio con agua MilliQ estéril y se secó con papel filtro. Posteriormente, la extracción del DNA se llevó a cabo con el Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, Austin, TX, USA), de la siguiente manera: se tomaron 100 mg de masa micelial seca y se depositó en tubos de 1.5 mL que contenían 0.2 g de perlas de vidrio (400 a 455 µm de diámetro lavadas previamente con ácido clorhídrico) estériles y el amortiguador de extracción AP1 del Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). El rompimiento celular se llevó a cabo en un equipo FastPrep®24 (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) y se realizaron pruebas para definir la velocidad y tiempos óptimos de rompimiento, para obtener la mayor cantidad de células fúngicas rotas (Williams *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2002). El ensayo se inició con las condiciones reportadas por Calderón *et al.* (2002), es decir, 6 periodos de 40 s a 6 m/s con 2 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Se analizaron las suspensiones de micelio resultantes bajo el microscopio, para determinar el tiempo y velocidad óptima en la que se obtuvo el mayor porcentaje de micelio roto y su contenido liberado dentro de la suspensión. Posteriormente, se modificaron las condiciones a 4 periodos de 40 s a 6 m/s con 2 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Después de que se pulverizó el micelio, se adicionaron 4 µL de RNAsa (100 mg/mL), se agitó vigorosamente en el vórtex y se incubó la mezcla por 10 min a 65 °C, mezclando 2 ó 3 veces por inversión. Después se adicionaron 130 µL del amortiguador AP2 y se incubaron por 5 min en hielo, se centrifugaron durante 5 min a 14000 rpm. El volumen total del sobrenadante se transfirió a la columna lila QIAshredder mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. El sobrenadante obtenido en el tubo colector se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se le adicionaron 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E y se mezcló rápidamente con ayuda de una micropipeta. Se transfirieron 650 µL de la mezcla anterior a la columna DNeasy mini spin colocada sobre un tubo colector de 2 mL y se centrifugó 1 min a 9000 rpm desechando el sobrenadante obtenido, este paso se repitió hasta terminar el volumen.

Posteriormente, se cambió el tubo colector, y se realizaron dos lavados con 500 μ L del amortiguador AW, el primero se centrifugó por 1 min a 8000 rpm y el segundo 2 min a 14000 rpm. Por último, la columna se colocó en un tubo de 1.5 mL, se agregaron 50 μ L del amortiguador AE a la membrana de la columna, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 9000 rpm para eluir el DNA. La concentración del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio (10 μ g/mL), comparando con diferentes concentraciones (10, 20 y 50 ng/ μ L) del fago λ (Gibco BRL-Life Technologies Inc.). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V y posteriormente se observó el gel en un fotodocumentador (Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Bajo las mismas condiciones, se extrajo el DNA de los cultivos de *C. immitis*, *C. posadassi*, *P. brasiliensis*, *A. niger*, *S. schenckii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *B. dermatitidis*, *C. neoformans*, *Malbranchea* sp. y *Chrysosporium charmichaelli*, para la evaluación de la especificidad de los marcadores SCAR de identificación de *A. fumigatus*.

Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Las reacciones de AFLP se realizaron de acuerdo con la metodología descrita por Vos *et al.* (1995), usando el Kit Gibco BRL AFLP System I. El DNA de cada aislado se ajustó a una concentración de 500 ng/18 μ L para someterse a digestión simultáneamente con *EcoRI/MseI* (1.25 U/ μ L), durante dos horas a 37 °C, luego se inactivaron las enzimas de restricción a 70 °C por 15 min. Los DNAs digeridos se ligaron a adaptadores de doble hebra *EcoRI/MseI* con T4 ligasa para generar templados de DNA que fueron utilizados en la preamplificación y amplificación selectiva. En la reacción de preamplificación, se utilizaron dos oligonucleótidos: uno complementario al adaptador y a la secuencia del sitio de restricción *EcoRI* (E0) y el otro complementario al adaptador y al sitio de restricción *Mse I* (M0). Los productos de la preamplificación se diluyeron para usarse como templados en la amplificación selectiva, en la que se probaron oligonucleótidos con dos y tres nucleótidos adicionales: E-AA y M-CTC; E-AA y M-CAT; E-AA y M-CAC; E-AA y M-CTG; E-AC y M-CTC; E-AC y M-CAT; E-AA y M-CAC; E-AC y M-CTG. 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 (750 Ci/mmol), según la metodología descrita por el fabricante. Los productos de la amplificación selectiva fueron separados en gel de acrilamida desnaturalizante al 6 %. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de

secuenciación, Sequi-Gen® GT System (BioRad), en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM), pH 8.0, a voltaje constante (1800 V) hasta que el colorante cianol xileno alcanzó el final del gel. El gel se separó de los vidrios de la cámara electroforética y se adhirió a papel filtro Whatman 3 MM, se cubrió con plástico (Alusa Plast) y se secó al vacío en un sistema de secado de geles (Model 583, HydroTech™ Gel Drying System, BioRad). Una vez seco el gel, se hicieron marcas radiactivas con ayuda de una aguja, para facilitar la alineación con la autorradiografía. Finalmente, se expuso el gel a placas radiográficas Kodak y se incubó a -70 °C durante toda la noche. El análisis de las bandas se realizó en la autorradiografía.

Purificación y reamplificación de las bandas seleccionadas en AFLP. La película revelada se alineó con el gel con la ayuda de las marcas generadas por puntos radiactivos de referencia. Las bandas seleccionadas se localizaron tomando como referencia la película, se cortaron y los pedazos de papel con las bandas se transfirieron a tubos para eluirlos con agua MilliQ. Los tubos se calentaron a ebullición y los fragmentos diferenciales se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto, en presencia de glicógeno (10 µg/ml) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Los fragmentos de DNA purificados se concentraron al vacío en un AES1010 Speedvac System (ThermoQuest, Holbrook, NY, USA) durante 2 h y se diluyeron en 30 µL de agua MilliQ. La pureza y concentración del fragmento se verificó por electroforesis en agarosa al 1.5%. La electroforesis se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente y las concentraciones de los fragmentos de DNA se definieron por comparación con concentraciones conocidas de (10, 20, 50 y 100 ng/µL) fago λ (Gibco BRL). Los fragmentos seleccionados y purificados se amplificaron nuevamente utilizando los oligonucleótidos que generaron su presencia, con las condiciones descritas anteriormente para la PCR. Al final de la amplificación se adicionaron 1.5 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) a la mezcla que contenía los amplicones y se incubaron en el termociclador a 70 °C por 10 min, con el fin de adicionar una adenina a la terminal 3' de cada uno de los amplicones y favorecer la ligación de los mismos al vector de clonación. Posteriormente, los productos de esta segunda amplificación se purificaron por columnas High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany), según la metodología descrita por el fabricante, para posteriormente ser clonados y secuenciados.

Clonación de los fragmentos purificados. Los amplicones finales recuperados se concentraron al vacío y se ajustaron a un volumen final de 5 μL , 1 μL de éste se ligó al vector pGEM[®]-T Easy (Promega), de acuerdo con las indicaciones descritas en el manual de la casa comercial. Los productos de la ligación, que incluyen los fragmentos amplificados en el vector pGEM[®]-T Easy Vector (plásmidos), se transformaron en células competentes *E. coli* JM109 (Promega). Las colonias bacterianas resistentes a ampicilina (marcador de selección) se sembraron en medio Luria (LB) líquido con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. A partir de estos cultivos, los plásmidos se purificaron por el método alcalino (ver más adelante). La comprobación de la clonación se demostró por amplificación del fragmento clonado con oligonucleótidos universales.

Previo a la clonación de las bandas de interés, se verificó la eficiencia de transformación de las células competentes de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial.

Determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes JM109. La eficiencia de las células competentes se obtuvo transformando las células *E. coli* JM109 con 0.1 ng del vector pGEM[®]-T Easy (Promega) no digerido, posteriormente se sembraron por duplicado en medio LB y se incubaron a 37 °C por 24 h. Luego se contaron las colonias y se obtuvo el promedio. La eficiencia de transformación se calculó aplicando la siguiente fórmula: Eficiencia = Promedio de UFC/ 0.001 ng de DNA plasmídico.

Transformación de *E. coli*. Las células competentes JM109 se descongelaron sobre hielo, y se les adicionó 1 μL del producto de ligación. Se incubó la mezcla en hielo durante 30 min e inmediatamente se dió un choque térmico a 42 °C por 90 s, y se regresaron las células al hielo por 2 min. Se agregaron 900 μL de medio LB a las células competentes y se incubaron a 37 °C en agitación por 1 h. Se centrifugaron las células a 5000 rpm/1 min, se eliminó el sobrenadante hasta la décima parte del volumen inicial. La cantidad total (100 μL) se sembró en cajas Petri con medio de selección [LB adicionado de ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) (Sigma) 0.1 M, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) (Sigma) 50 mg/mL] y se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalmente, se seleccionaron las posibles clonas recombinantes (colonias blancas). La caracterización de las clonas recombinantes se

realizó por PCR en colonia y posteriormente se llevó a cabo la purificación de los plásmidos.

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia. Para poner de manifiesto la presencia de insertos y verificar su tamaño, se tomó una asada de cada una de las clonas recombinantes previamente seleccionadas y se resuspendió en 500 μL de agua MilliQ. Se calentó a ebullición en baño de agua durante 5 min y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min, se tomaron 5 μL del sobrenadante para llevar a cabo la PCR en colonia (Güssow and Claxon, 1989), utilizando oligonucleótidos universales (pUC/M13 izquierdo y pUC/M13 derecho). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 μL conteniendo un volumen del plásmido de 5 μL , MgCl_2 1.5 mM, dNTPs 250 μM (Fermentas Inc., Glen Burnie, Maryland MD, USA), mezcla de oligonucleótidos 10 pmol y *Taq* polimerasa 2.5 U (Fermentas Inc.) en amortiguador 1X (Fermentas Inc.). El programa de amplificación consistió de un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 5 min a 55 °C. Finalmente, 5 μL del producto de reacción se analizó electroforéticamente en gel de agarosa al 1.5 %.

Purificación de plásmidos por método alcalino. De acuerdo con el procedimiento estándar. Las clonas seleccionadas se cultivaron en tubos con 5 mL de medio Luria y se incubaron a 37 °C por 24 h. El cultivo se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 5000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 200 μL de solución I (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0) y se homogenizó suavemente. Posteriormente, se agregaron 400 μL de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%) y se mezcló por inversión hasta observar la aparición de hebras de DNA. Se adicionaron 300 μL de solución III (acetato de potasio 5 M 60% V/V, ácido acético glacial 11.5% V/V, agua desionizada 28.5 % V/V) manteniendo en hielo durante 10 min y se centrifugó a 15000 rpm durante 1 min. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con un volumen igual de isopropanol a -40 °C por 30 min. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, se lavó el botón con etanol al 70 % y se secó por vacío durante 2 h. El DNA se resuspendió en 20 μL de agua MilliQ. La presencia del plásmido se comprobó por electroforesis en agarosa al 1 %. Los plásmidos se conservaron a -20 °C.

Secuenciación y diseño de oligonucleótidos. Los fragmentos clonados fueron secuenciados en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM en un aparato ABI (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) utilizando oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') y pUC/M13 derecho (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Promega). Las secuencias obtenidas de cada uno de los fragmentos clonados se alinearon y compararon con todas las secuencias depositadas en el GenBank, mediante el programa BLAST 2.2.9 (Altschul *et al.* 1997), con el propósito de descartar homologías con genes de hongos patógenos relacionados. Con base en los resultados de la comparación en GenBank, se realizó el diseño de los oligonucleótidos específicos para *A. fumigatus* utilizando el programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y considerando lo siguiente: la longitud adecuada de los oligonucleótidos es de 18 a 25 nucleótidos, el contenido de guanina-citosina debe ser de 40 a 60 %, la temperatura de alineamiento de 57 a 63 °C, deben ser 100 % complementarios a la secuencia molde y no autocomplementarse ni formar estructuras secundarias.

Estandarización de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos. Se realizaron curvas de concentración de DNA (5, 10, 15 y 20 ng/μL), oligonucleótidos (50, 100, 150 y 200 pmol/μL) y MgCl₂ (1.0, 1.3, 1.5, 1.7 y 2.0 mM), con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de amplificación. Inicialmente, la mezcla de reacción (25 μL) consistió en dNTPs 200 μM (Fermentas Inc.), MgCl₂ 2 mM, 100 pmol de cada oligonucleótido y *Taq* polimerasa 1U (Fermentas Inc.) en amortiguador 1X (Fermentas Inc.). El programa de amplificación fue: un ciclo a 94 °C por 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y un ciclo de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación se analizaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio.

Evaluación de la especificidad de los marcadores SCAR. Con las condiciones óptimas de amplificación del DNA de *A. fumigatus*, se evaluó la especificidad de los oligonucleótidos probando el DNA de los 55 aislados de *A. fumigatus*, procedentes de distintas regiones geográficas. Además se probó el DNA de *A. lentulus*, *C. immitis*, *C. posadassi*, *P. brasiliensis*, *A. niger*, *S. schenckii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *B. dermatitidis*, *C. neoformans*, *Malbranchea* sp., *C. charmichaelli* y *M. tuberculosis*.

Sensibilidad de los oligonucleótidos para la PCR. Para determinar la cantidad mínima de DNA fúngico que puede ser detectada por PCR con los oligonucleótidos diseñados, se llevó a cabo la PCR utilizando diferentes concentraciones (10 ng/ μ L - 1 fg/ μ L) de DNA de *A. fumigatus*.

PCR tiempo real (qPCR). Tomando en cuenta los oligonucleótidos diseñados para PCR de punto final, se diseñó una sonda para qPCR. Esto se realizó con la finalidad de tener dos opciones de identificación del patógeno: por PCR de punto final y por qPCR. Las reacciones de qPCR se realizaron con el sistema MiniOpticon3 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), empleando el kit TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems) y los ensayos TaqMan® de Applied Biosystems, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla de reacción (20 μ L) consistió en 10 μ L de TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1 μ L de ensayo TaqMan® (Applied Biosystems) y 9 μ L de DNA. Respecto a las condiciones de PCR, se realizó una preincubación a 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15s y 60 °C por 1 min. Inicialmente se realizó una curva de concentración de sonda y oligonucleótidos para determinar las concentraciones óptimas de amplificación y detección de la fluorescencia. Las concentraciones que se ensayaron fueron: 1, 2 y 3 μ L de ensayo TaqMan® (Applied Biosystems).

Una vez realizadas las reacciones de PCR, se comprobó la presencia del amplicón y el tamaño del amplicón esperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, como se describió en los ensayos de PCR de punto final.

El estudio de reproducibilidad de la técnica, así como la cuantificación del DNA amplificado se realizaron mediante la construcción de rectas de regresión con los resultados de ocho repeticiones de diferentes diluciones seriadas de DNA de un aislado de *A. fumigatus* sensible a ITC (MM-3). Se probó desde 10 ng hasta 1 fg/ μ L de DNA. Las rectas de regresión se realizaron entre los logaritmos de las concentraciones de DNA y el ciclo de la reacción de PCR en el que se empezaba a detectar la fluorescencia (Ct). La reproducibilidad se obtuvo mediante el cálculo de los coeficientes de variación de los Ct para cada una de las concentraciones de DNA utilizadas. Las muestras experimentales (DNA del resto de los aislados de *A. fumigatus* estudiados) se corrieron por duplicado para su cuantificación.

OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR DE RESISTENCIA A ITC POR AFLP

Obtención de aislados mutantes resistentes a ITC. Con la finalidad de tener un aislado resistente control, se seleccionó el aislado MM-11 de *A. fumigatus*, sensible a ITC (CIM=1 µg/mL), para transformarlo a resistente a través de mutagénesis inducida con luz ultravioleta (UV), de acuerdo con lo descrito por Nascimento *et al.* (2003). Para ello, se sembró el aislado MM-11 en PDA durante 48 h a 37 °C, posteriormente se le agregó al cultivo 1 mL de agua MilliQ estéril y se desprendieron los conidios raspando la superficie del cultivo con una asa micológica y se contaron en una cámara de Neubauer para ajustarlos a una concentración de 1×10^6 conidios/mL. Se colocó 1 mL de ésta suspensión de conidios en seis viales de 2 mL y se expusieron a luz UV ($0.22 \text{ J/m}^2\text{s}^{-1}$) durante diferentes tiempos: 0, 10, 30, 50, 70 y 90 s. Cada suspensión de conidios irradiada se centrifugó a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 500 µL de solución salina isotónica. Posteriormente se plaquearon alícuotas de 100 µL en cajas con YEPD conteniendo 10 µg/mL de ITC (Sigma). Las placas se incubaron a 37 °C por tres días y se seleccionaron las colonias desarrolladas (resistentes a ITC), y se resembraron en YEPD conteniendo una concentración mayor de antifúngico (100 µg/mL). Para corroborar la resistencia a ITC del aislado mutante, se realizó la prueba de susceptibilidad al antifúngico, como se describió anteriormente.

AFLP. La búsqueda de bandas diferenciales entre aislados de *A. fumigatus*, sensibles y resistentes a ITC, se realizó sobre los mismos patrones polimórficos generados por AFLP para la obtención del marcador SCAR de identificación de *A. fumigatus*. La purificación, reamplificación, clonación, secuenciación y comparación de las bandas diferenciales, se realizó como se describió anteriormente.

OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR DE RESISTENCIA A ITC POR cDNA-AFLP

La búsqueda de bandas diferenciales entre aislados de *A. fumigatus*, sensibles y resistentes a ITC, también se realizó a partir de patrones polimórficos generados por cDNA-AFLP.

Extracción de RNA. Para la extracción de RNA de los aislados de *A. fumigatus* se probaron dos métodos que difieren en el mecanismo de ruptura celular. Por un lado, la lisis celular se realizó con TRIZOL® (Invitrogen), donde por cada 100 mg de micelio de *A. fumigatus* se agregó 1 mL de TRIZOL®, posteriormente se incubó durante 20 min

a temperatura ambiente, se agitó en vórtex y se incubó nuevamente durante 10 min. Se adicionaron 200 µL de cloroformo (Sigma), se agitó por inversión y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó cada muestra a 12000 rpm por 15 min a 4 °C, la fase acuosa se transfirió a otro tubo y se adicionaron 500 µL de isopropanol (Baker) frío, se agitó suavemente y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó cada muestra a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante, el botón se lavó con etanol al 75 % (el etanol se preparó usando agua DEPC (dietil pirocarbonato) al 0.1 %, se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el RNA se secó de 10-15 min a temperatura ambiente, posteriormente se resuspendió en 30 µL de agua DEPC.

Por otro lado, a partir de cada cultivo de *A. fumigatus* sembrado en PDA, se preparó una suspensión de conidios agregando a cada tubo 1 mL de de amortiguador de fosfatos pH 7.4, adicionado con Tween 20 al 0.05 % (PBST), los conidios se desprendieron por agitación en vortex (Daigger, NY, USA). La suspensión de conidios se sembró en 30 mL de medio líquido YEPD y se incubaron a 37 °C en agitación constante (60 rpm) durante 12 h. El micelio de cada aislado se colectó por filtración con papel Whatman 3 MM en un embudo Büchner, el micelio se colocó en tubos Falcon de 15 mL e inmediatamente se congeló introduciendo los tubos en nitrógeno líquido. Se tomaron 100 mg de micelio congelado y se pulverizaron en un mortero con pistilo usando nitrógeno líquido. El resto del micelio se conservó a -80 °C. El micelio pulverizado se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, y se le agregó 1 mL de Trizol (Invitrogen), se homogenizó en vortex durante 30 s y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Después se agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4 °C, la fase acuosa se transfirió a otro tubo y se adicionó un volumen igual de etanol al 70 % y se mezcló. Se transfirieron 700 µL de esta mezcla a una columna de purificación (PureLink™ Micro to Midi Total RNA Purification System, Invitrogen), se centrifugó a 14000 rpm durante 15 s. Este paso se repitió hasta terminar con todo el volumen de la mezcla. La columna de purificación se lavó como lo indica el fabricante y finalmente se eluyó el RNA con 35 µL de agua DEPC al 0.1 % estéril.

La integridad y concentración del RNA, obtenido por ambos métodos, se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio (1 µg/mL) y por espectrofotometría (NanoDrop 3300, Thermo Fisher Scientific Inc.) a 260 y 280 nm. El cociente de absorbancias 260 nm/280 nm indica la calidad de las muestras, un cociente entre 1.9-2.0 indica una buena calidad.

Síntesis de cDNA primera y segunda hebra. El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de RNA siguiendo las instrucciones del SuperScript™ Double-Stranded cDNA Síntesis Kit (Invitrogen). La primera hebra se transcribió usando un oligo(dT)₁₈ (Invitrogen). El cDNA de doble hebra se purificó con fenol:cloroforma:alcohol isoamílico (25:24:1), se precipitó con etanol y acetato de amonio 7.5 M y se resuspendió en 15 µL de agua MilliQ. La calidad de la síntesis de la primera y segunda hebra del cDNA se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (1 µg/mL).

cDNA-AFLP. La técnica de cDNA-AFLP se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Vuylsteke *et al.*, 2007, de la siguiente manera: Los cDNAs obtenidos se ajustaron a 250 ng/30µL y se digirieron en dos pasos, el primero con 1.25 U de *TaqI* (Invitrogen) a 65 °C durante dos horas, y el segundo con 1 U de *Tru91* (Invitrogen) durante dos horas a 37 °C. Posteriormente, las enzimas de restricción se inactivaron a 80 °C durante 20 min. El cDNA digerido fue ligado a los adaptadores *TaqI* (80 pmol) y *MseI* (50 pmol) con la T4 DNA ligasa a 20 °C durante 2 horas. Los productos digeridos y ligados se diluyeron 1:10 con agua MilliQ. Los productos ligados a los adaptadores se diluyeron 1:10 para realizar la preamplificación con los oligonucleótidos T+0 (50ng/µL) correspondiente al adaptador *TaqI* y M+C (50ng/µL) correspondiente al adaptador *MseI* con una base (C) adicional. El programa de amplificación consistió en: un ciclo de 5 min a 94 °C; seguido por 20 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 56 °C y 1 min a 72 °C, finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de la preamplificación se diluyeron 1:150 y 1:300 con agua MilliQ, para asegurar una adecuada amplificación. Para la amplificación selectiva, los productos diluidos de la preamplificación, usados como templado, fueron amplificados con oligonucleótidos *TaqI* fluorescentes (IRDye™700, LI-COR) con dos bases adicionales y oligonucleótidos *MseI* con una base adicional sin marcaje fluorescente. Las combinaciones que se ensayaron fueron: T-TC/M-C, T-TC/M-A, T-GA/M-A, y T-GA/M-C. El programa de amplificación fue: un ciclo de 5 min a 94 °C; seguido por un ciclo de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 1 min a 72 °C, 12 ciclos en los que la temperatura de alineamiento (65 °C) se redujo 0.7 °C cada ciclo, manteniendo la desnaturalización de 30 s a 94 °C y la extensión de 1 min a 72 °C; 23 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C y 1 min a 72 °C. Finalmente, para el análisis electroforético de las muestras, se mezclaron 5 µL del producto de amplificación selectiva y 2 µL de amortiguador de corrida y se

desnaturalizaron a 94 °C por 3 min e inmediatamente se colocaron en hielo. Posteriormente, 0.8 µL de cada muestra se colocó en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6 % y se corrió en un LI-COR DNA sequencer (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA) a 1500 V durante 3 horas. En el gel también se colocó 1 µL de marcador de peso molecular de 50-700 bp (Invitrogen) para poder determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.

Estandarización de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos. Los oligonucleótidos generados a partir de las bandas compartidas por los aislados resistentes a ITC, fueron utilizados en la amplificación del DNA genómico de dichos aislados. Para la estandarización se llevaron a cabo curvas de MgCl₂ (0.5-3.0 mM), de dNTPs (150-200 µM), de DNA (1 ng-20 ng) y oligonucleótidos (100-150 pmol/µL), con el fin de obtener las condiciones óptimas de amplificación para *A. fumigatus*.

Evaluación de la especificidad de los marcadores SCAR. Los oligonucleótidos generados a partir de los marcadores SCAR, se utilizaron en la amplificación del DNA de todos los aislados de *A. fumigatus* tipificados como sensibles o resistentes a ITC.

Sensibilidad de los oligonucleótidos para la PCR. Para determinar la cantidad mínima de DNA fúngico que puede ser detectada con los oligonucleótidos diseñados, se llevó a cabo la PCR utilizando diferentes concentraciones (10 ng/µL - 1 fg/µL) de DNA de un aislado de *A. fumigatus* resistente a ITC.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Macromorfología. Las colonias de los 55 aislados de *A. fumigatus* analizados, presentaron las características típicas de la especie. Por el anverso, las colonias

presentaron un color verde azulado con textura aterciopelada o pulverulenta, y por el reverso un color crema con borde entero, como se observa en la figura 1.

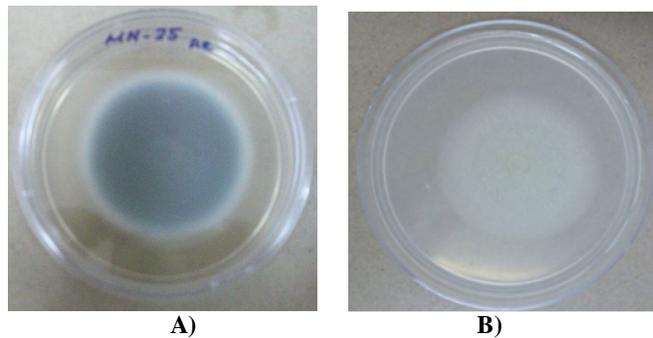


Figura 1. Macromorfología de los aislados de *A. fumigatus* estudiados. Las colonias se desarrollaron en PDA a 37 °C durante 4 días. A) Anverso de la colonia, B) Reverso de la colonia.

Micromorfología. Los 55 aislados de *A. fumigatus* estudiados mostraron micelio septado, hialino, con conidióforos uniseriados, vesículas en forma de mazo y microconidios redondos, que son las características propias de la especie (Fig. 2).



Figura 2. Micromorfología típica de los aislados de *A. fumigatus*, observada en microscopio óptico (40X). En la imagen se observan hifas tabicadas, de donde sale un conidióforo con vesícula en forma de mazo, con fiálides uniseriadas sobre el tercio superior de la vesícula, paralelos al eje del conidióforo.

Tamaño de conidios. El diámetro de los conidios de los 55 aislados de *A. fumigatus* se registró en el rango de 2.58 a 2.69 μm , típico de este hongo. Sin embargo, cabe destacar que los conidios de los aislados de AR fueron los más grandes ($2.69 \pm 0.01 \mu\text{m}$), seguidos por los de PE ($2.62 \pm 0.02 \mu\text{m}$), MX ($2.61 \pm 0.01 \mu\text{m}$) y FR ($2.58 \pm 0.01 \mu\text{m}$). La media del diámetro de los conidios para los aislados de AR y FR fue significativamente diferente ($P < 0.05$). La prueba de Tukey realizada con los datos del diámetro de los conidios de todos los aislados, analizada por país, formó tres grupos **a**,

b y **ab**, en el **a** están los aislados de AR, en el **b** los de FR y en el **ab** los de MX y PE (Tabla 4).

Tamaño de vesículas. El tamaño (ancho) de las vesículas de los 55 aislados estudiados se registró dentro del rango reportado para *A. fumigatus*. No obstante, se observaron diferencias con respecto al origen geográfico, en donde los aislados de FR presentaron las vesículas más grandes ($19.58 \pm 0.38 \mu\text{m}$) seguidos por los de PE ($18.92 \pm 0.98 \mu\text{m}$), MX ($17.97 \pm 0.06 \mu\text{m}$), y AR ($13.79 \pm 0.21 \mu\text{m}$). La media del tamaño de las vesículas para todos los aislados fue significativamente diferente ($P < 0.05$). La prueba de Tukey realizada con los datos del tamaño de las vesículas de todos los aislados, analizada por país, formó cuatro grupos **a**, **b**, **c** y **d**, en el grupo **a** se encuentran los aislados de PE, en el **b** los de AR, en el **c** los de FR y en el **d** los de MX (Tabla 4).

Tabla 4. Tamaño de conidios, tasa de crecimiento a diferentes temperaturas y tamaño de vesículas para los aislados de MX, PE, FR y AR

Origen	Tamaño de conidios \pm DE (μm)	Tasa de crecimiento \pm DE (mm/ día)			Tamaño de vesículas \pm DE (μm)
		28 °C	37 °C	48 °C	
MX	2.61 \pm 0.35 ^{ab}	3.21 \pm 0.37 ^b	5.60 \pm 1.00 ^b	4.69 \pm 1.31 ^b	17.97 \pm 0.84 ^d
PE	2.62 \pm 0.40 ^{ab}	5.91 \pm 0.37 ^a	6.74 \pm 0.29 ^a	6.77 \pm 0.50 ^a	23.35 \pm 0.75 ^a
FR	2.58 \pm 0.22 ^b	3.55 \pm 0.19 ^b	5.74 \pm 0.54 ^b	5.15 \pm 0.53 ^b	20.73 \pm 0.83 ^c
AR	2.72 \pm 0.62 ^a	3.34 \pm 0.56 ^b	5.32 \pm 0.66 ^b	4.51 \pm 0.81 ^b	17.62 \pm 0.78 ^b

α = 0.05, *DE=Desviación estándar, **Letras iguales representan que no existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ellas, a, b, c, d= Grupos

Termotolerancia. Los 55 aislados de *A. fumigatus* crecieron a las tres temperaturas probadas, siendo óptima la de 37 °C, mientras que 28 °C fue la temperatura en la que se observó la menor tasa de crecimiento (TC). La TC mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los aislados a las tres temperaturas analizadas. Los aislados procedentes de PE presentaron la mayor TC y los de AR la menor a 28, 37 y 48 °C. En los aislados de PE y FR se observó una mayor TC a 48 °C. La prueba de Tukey realizada con los datos de la TC a 28, 37 y 48 °C formó dos grupos **a** y **b** (Tabla 4), en el **a** están los aislados de PE y en el **b** los de AR, MX y FR.

Los valores de %IC permitieron clasificar a los 55 aislados estudiados en termosensibles y termorresistentes (Tabla 5). Los aislados termosensibles a 28 °C son los que presentaron un %IC ≥ 36 y los termorresistentes con un valor de %IC < 36 y a 48 °C, los aislados termosensibles se agrupan con un %IC ≥ 14 y los termorresistentes con un valor de %IC < 14 . A la temperatura de 28 °C todos los aislados de PE resultaron termorresistentes, el 52 % de los aislados de AR fueron termorresistentes, y sólo el 33 % y 7 % de los aislados de FR y MX, respectivamente. A 48 °C, todos los aislados de PE también resultaron termorresistentes, el 70, 60 y 67 % de los aislados de AR, MX y FR, respectivamente, también fueron termorresistentes a esta temperatura.

Tabla 5. Características fenotípicas de los aislados de *A. fumigatus* estudiados

Aislado	Fuente	Origen	Tamaño (µm)		%IC		Termotolerancia		CIM (mg/L)		
			conidios*	vesículas	28 °C	48 °C	28 °C	48 °C	ITC	VRC	AMB
AmbIII	A	AR	2.743	17.4	47	3.9	TS	TR	0.13	0.13	0.25
AmbV	A	AR	2.564	17.9	33.9	6.8	TR	TR	0.13	0.13	0.25
AmbVIII	A	AR	2.743	17.6	38.6	10.5	TS	TR	0.13	0.13	0.25
951740	C	AR	2.743	17.9	28.3	6	TR	TR	0.13	0.25	1
951744	C	AR	2.743	17.9	19.6	15	TR	TS	0.25	0.13	0.5
951746	C	AR	2.743	17.9	28.6	6.1	TR	TR	0.25	0.13	1
951722	C	AR	2.743	17.1	41.2	7.8	TS	TR	0.25	0.25	1
951733	C	AR	2.743	17.6	36.8	12.3	TS	TR	0.25	0.25	0.5
951734	C	AR	2.743	17.9	13.6	9.1	TR	TR	0.25	0.25	1
951736	C	AR	2.743	17.6	27.1	30.5	TR	TS	0.25	0.25	2
951737	C	AR	2.743	17.9	55	11.7	TS	TR	0.25	0.25	2
951738	C	AR	2.743	16.9	48.4	51.6	TS	TS	0.5	0.25	2
951739	C	AR	2.743	17.9	48.7	33.3	TS	TS	0.25	0.5	1
951740a	C	AR	2.743	17.9	25	11.4	TR	TR	0.13	0.25	0.25
951741	C	AR	2.743	17.9	44.9	22.5	TS	TS	0.25	0.13	0.5
951744a	C	AR	2.743	17.9	29.1	9.1	TR	TR	0.13	0.13	0.5
951745	C	AR	2.743	17.9	36.2	12.1	TS	TR	0.25	0.25	2
951746a	C	AR	2.743	17.9	45.8	18.6	TS	TS	0.06	0.13	0.5
951747	C	AR	2.743	17.6	38	8	TS	TR	0.25	0.25	2
951748	C	AR	2.564	17.9	33.3	12.3	TR	TR	0.25	0.25	2
88248	C	AR	2.564	17.4	48.3	36.7	TS	TS	0.06	0.13	0.25
90370	C	AR	2.564	17.6	28.1	10.5	TR	TR	0.5	0.13	1
982928	C	AR	2.564	17.6	40.4	8.8	TS	TR	0.13	0.25	1
993315	C	AR	2.564	16.6	42.3	1.9	TS	TR	0.25	0.13	1
9272	C	AR	2.564	17.4	46.1	7.7	TS	TR	>16	>16	0.5
8571	C	AR	2.564	17.1	36.2	13.8	TS	TR	>16	>16	1
6578	C	AR	2.564	17.1	41.3	18.9	TS	TS	>16	>16	1
21362	C	AR	2.564	17.1	41.3	18.9	TS	TS	>0.25	>16	1
MM-7	A	MX	2.564	17.9	42.5	40	TS	TS	0.25	0.25	1
MM-8	A	MX	2.564	17.6	36.8	39.5	TS	TS	0.03	0.25	0.25
MM-9	C	MX	2.64	17.6	39.6	8.6	TS	TR	0.5	0.25	1
MM-10	C	MX	2.564	18.1	50.8	22.2	TS	TS	0.25	0.25	1
MM-11	C	MX	2.564	17.9	45.2	12.9	TS	TS	0.5	0.13	1
MM-32	C	MX	2.897	17.9	52.9	15.7	TS	TS	0.06	0.13	0.25
MM-33	C	MX	2.564	18.1	48.3	6.7	TS	TR	0.13	0.25	0.5
MM-34	C	MX	2.564	18.1	45.8	8.5	TS	TR	0.13	0.25	1
MM-35	C	MX	2.82	17.9	43.6	25.4	TS	TS	0.13	0.25	0.5
MM-36	C	MX	2.564	18.1	38	11.3	TS	TR	0.13	0.25	0.5
MM-37	C	MX	2.564	18.1	38.6	50	TS	TS	0.13	0.5	0.5
MM-38	C	MX	2.64	17.6	40	7.3	TS	TR	0.13	0.25	1
MM-39	C	MX	2.564	18.4	43.3	10	TS	TR	0.06	0.25	0.5
MM-45	C	MX	2.564	17.9	35.8	7.5	TS	TR	0.03	0.06	0.5
MM-46	C	MX	2.564	17.9	36.8	10.5	TS	TR	0.13	0.13	0.25
Af-8	C	FR	2.564	20.7	36.8	1.8	TS	TR	0.03	0.13	0.25
Af-11	C	FR	2.564	20.7	37.3	25.4	TS	TS	0.03	0.25	0.5
Af-15	C	FR	2.564	21	41.9	24.2	TS	TS	0.03	0.25	1
Af-22	C	FR	2.564	21	37.5	12.5	TS	TR	0.03	0.13	0.25
Af-26	C	FR	2.564	20.5	45.9	11.5	TS	TR	0.03	0.13	0.25
Af-29	C	FR	2.743	20.5	31.4	5.9	TR	FR	0.13	0.13	0.5
Af-34	C	FR	2.564	20.7	32.1	5.7	TR	TR	0.03	0.13	0.25
Af-35	C	FR	2.64	20.5	48.5	19.7	TS	TS	0.03	0.13	0.25
Af-41	C	FR	2.564	20.7	32.1	7.5	TR	TR	0.13	0.13	0.5
51435	C	PE	2.743	23.3	13.6	10.6	TR	TR	0.13	0.13	0.5
51594	C	PE	2.564	23.1	5.9	1.5	TR	TR	0.13	0.13	0.5
53027	C	PE	2.64	23.3	14.3	7.1	TR	TR	0.13	0.13	0.5
53097	C	PE	2.564	23.6	15.2	9.1	TR	TR	0.13	0.25	0.5

*Valor promedio del diámetro de 30 conidios, †Valor promedio del ancho de 10 vesículas, TS: Termosensible; TR:

Termorresistente; C: Clínico; A: Ambiental; AR: Argentina; MX: México; FR: Francia; PE: Perú

Microscopía electrónica de barrido. Con el fin de corroborar el tamaño de conidios y vesículas medidas a través de microscopía óptica, de los 55 aislados de *A. fumigatus* se eligieron tres representativos de cada país para su análisis, a través de microscopía electrónica de barrido, confirmando así los resultados anteriormente encontrados. Los conidios de los aislados representativos de AR fueron los más grandes como se observa en la figura 3, seguidos por los de PE, MX y FR. Así mismo, se observa que el tamaño de las vesículas de aislados representativos de FR son las más grandes, seguidas de las de PE, MX y AR.

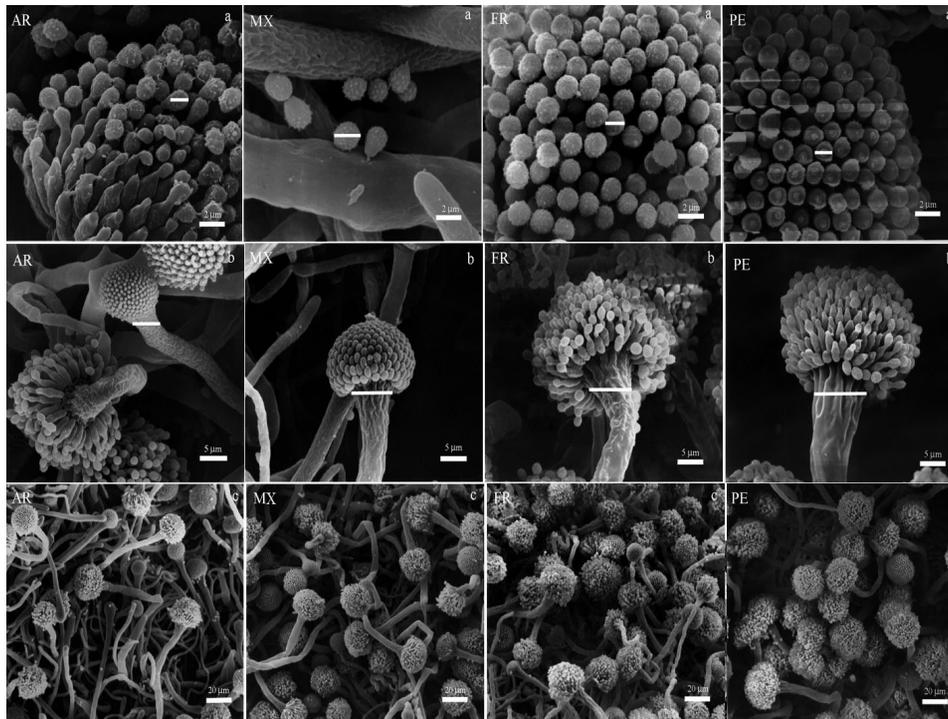


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de aislados de *A. fumigatus*, representativos de MX, AR, FR y PE. (a) Tamaño de conidios, (b) tamaño de vesículas y (c) velocidad de esporulación.

Prueba de susceptibilidad a antifúngicos. Los aislados de *A. fumigatus* mostraron un rango de CIM entre de 0.03 a ≥ 16 mg/L para ITC, de 0.06 a 16 mg/L para VRC y para AMB de 0.25 a 2.0 mg/L. Los resultados de susceptibilidad a antifúngicos fueron variables (Tabla 5), no se encontraron aislados resistentes a AMB, únicamente a ITC y VRC. Los aislados de AR (9272, 8571, 6578) mostraron resistencia a ambos azoles. Se encontró un aislado resistente únicamente a VRC (21363). No se encontró resistencia a antifúngicos en ninguno de los aislados procedentes de MX, FR o PE.

OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR DE IDENTIFICACIÓN DE

A. fumigatus POR AFLP

Extracción del DNA genómico. La integridad y cantidad del DNA obtenido de los 55 aislados de *A. fumigatus* fue adecuada para la metodología de AFLP, ya que se requiere DNA puro para que el corte con las enzimas de restricción se lleve a cabo adecuadamente. La concentración de los DNA se ajustó a 500 ng/18µL. La figura 4 muestra la cuantificación de los DNAs obtenidos de diferentes aislados de *A. fumigatus*.

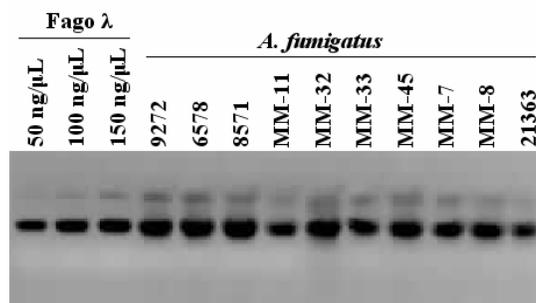


Figura 4. Cuantificación del DNA de los aislados de *A. fumigatus*, por comparación con diferentes concentraciones de DNA del fago λ (50, 100 y 150 ng/µL). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V en gel de agarosa al 1.0%, teñido con bromuro de etidio.

Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de los reactivos para la técnica de AFLP, primero se realizaron curvas de concentración del isótopo P^{32} para marcar el estándar de tamaño molecular y curvas de concentración del producto de la primera amplificación.

Curva de concentración del isótopo P^{32} para marcar el estándar de tamaño molecular. Después de haber marcado el estándar de tamaño molecular con el isótopo, se realizaron diferentes diluciones de éste (1:5, 1:10, y 1:15) con el amortiguador de corrimiento y se llevó a cabo la electroforesis para determinar cuál era la dilución de isótopo P^{32} que permitía la mejor visualización del marcador de tamaño molecular. Como se puede observar en la figura 5a, la dilución óptima fue de 1:15. Esta dilución de isótopo se utilizó también para las muestras problema.

Curva de los productos de la primera amplificación. Para determinar la cantidad adecuada de los productos de la primera amplificación que nos permitiera observar patrones polimórficos bien definidos en la segunda amplificación, se probaron diferentes diluciones (1:2, 1:3 y 1:5) de la primera amplificación para el aislado MM-11. La dilución óptima fue 1:2 (Fig. 5b).

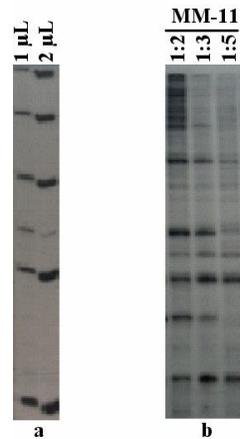
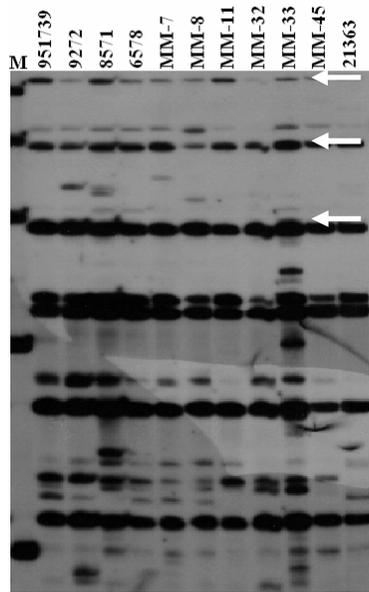
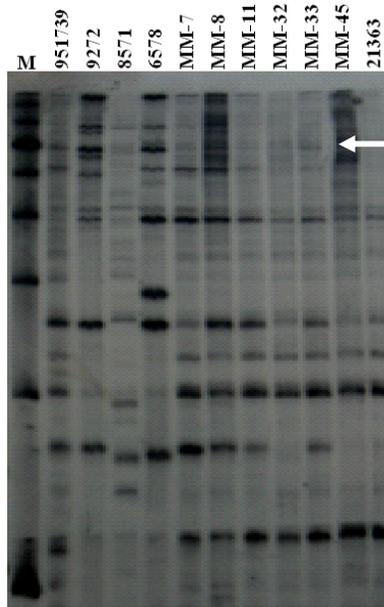


Figura 5. Curvas de concentración del (a) estándar de tamaño molecular 50 bp DNA Ladder y de (b) templado para la amplificación selectiva de un aislado de *A. fumigatus* (MM-11).

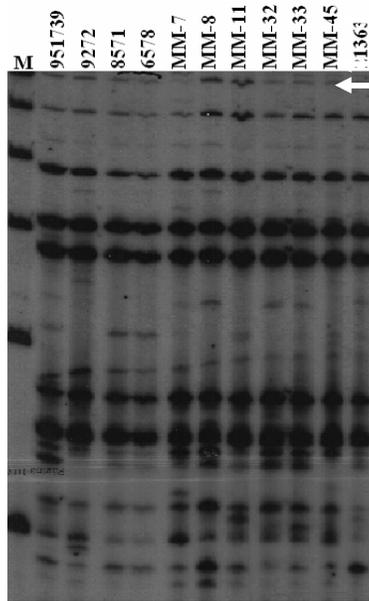
Después de la estandarización de los reactivos, se procedió a realizar los ensayos de AFLP con base en lo descrito por Vos *et al.* (1995). Los ensayos se llevaron a cabo probando 13 combinaciones de oligonucleótidos con dos y tres nucleótidos adicionales: E-AA/M-CTC; E-AA/M-CAT; E-AA/M-CAC; E-AA/M-CTG; E-AC/M-CTC; E-AC/M-CAT; E-AC/M-CTG; E-AC/M-CAC; E-AC/M-CTG, E-GA/M-CAC; E-GA/M-CTC; E-CT/M-CAC y E-CT/M-CTC. Estas combinaciones de oligonucleótidos, generaron diferentes patrones polimórficos, en los que se pudieron observar bandas comunes a todos los aislados de *A. fumigatus*, como se puede apreciar en las figuras 6-9.



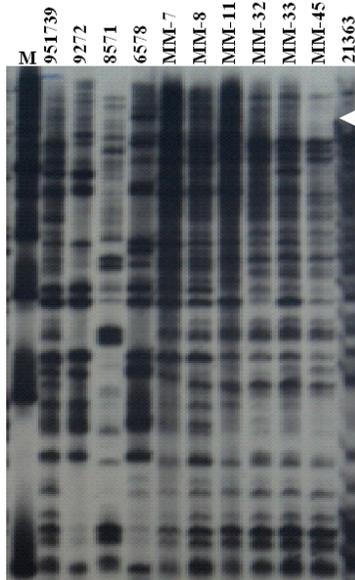
E-AA/M-CAC



E-AA/M-CTC



E-AC/M-CAC



E-AA/M-CTG

I
c
e
t

CTG. La
indican las

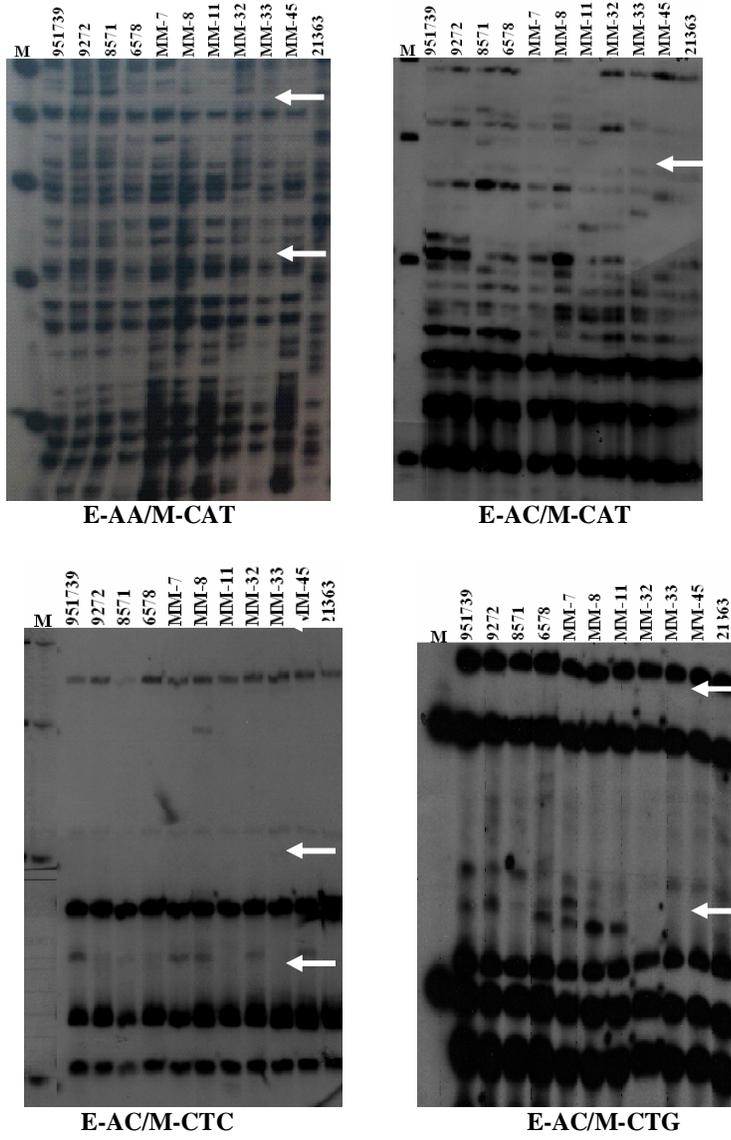


Figura 7. Patrón polimórfico de los aislados de *A. fumigatus* generado por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-AA/M-CAT, E-AC/M-CAT, E-AC/M-CTC y E-AC/M-CTG. La electroforesis se llevó a cabo en gel de acrilamida al 6% a un voltaje de 1600 volts. Las flechas señalan las bandas comunes entre los aislados estudiados. M: 50 bp DNA Ladder.

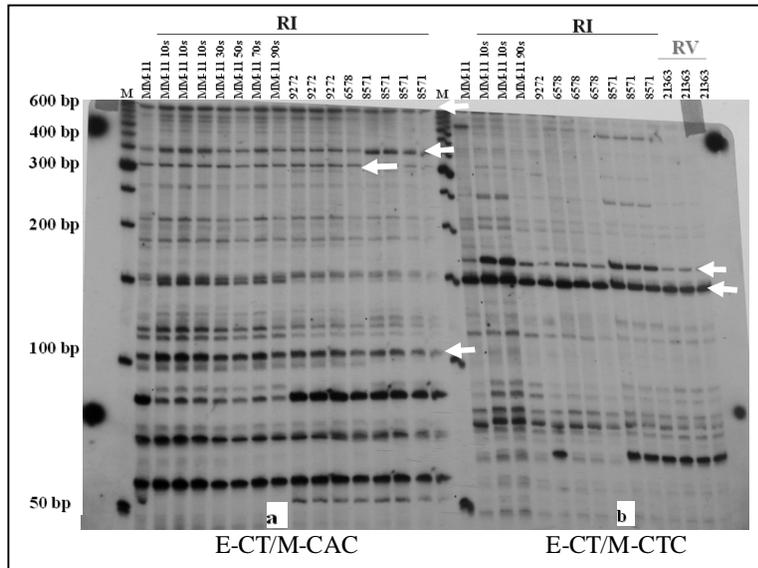


Figura 8. Patrones polimórficos de los aislados de *A. fumigatus*, generados por AFLP con las combinaciones de oligonucleótidos E-CT/M-CAC (a) y E-CT/M-CTC (b). La electroforesis se llevó a cabo en gel de acrilamida al 6% a un voltaje de 1600 volts. Las flechas señalan algunas de las bandas comunes entre los aislados estudiados. M: 50 bp DNA Ladder.

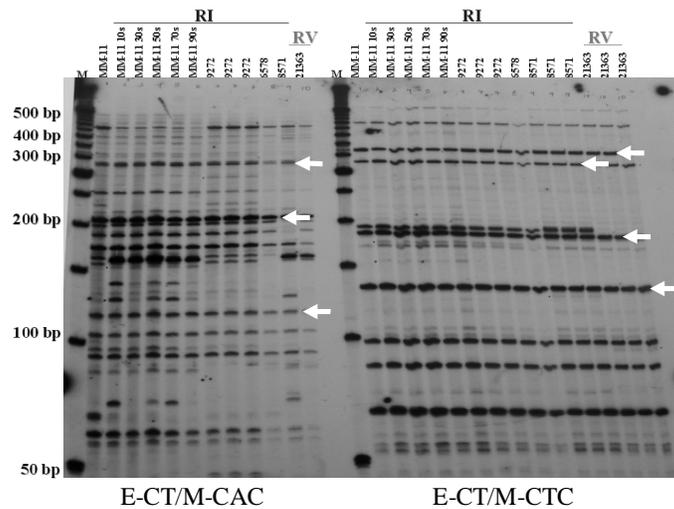


Figura 9. Patrones polimórficos de los aislados de *A. fumigatus*, generados por AFLP con las combinaciones de oligonucleótidos E-CT/M-CAC (2a) y E-CT/M-CTC (2b). La electroforesis se llevó a cabo en gel de acrilamida al 6% a un voltaje de 1600 volts. Las flechas señalan algunas de las bandas comunes entre los aislados estudiados. M: 50 bp DNA Ladder.

Sin embargo, aunque con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos ensayadas se pudieron observar varias bandas compartidas por todos los aislados de *A. fumigatus*, se seleccionaron las que estuvieran bien definidas y tuvieran un tamaño

mayor de 200 bp, ya que es el tamaño adecuado para poder diseñar oligonucleótidos a partir de sus secuencias. Tomando en cuenta este criterio, se seleccionaron dos bandas de 250 y 500 bp, generadas con las combinaciones E-AA/M-CAC y E-CT/M-CAC, respectivamente.

Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por AFLP. Las dos bandas seleccionadas de 250 y 500 bp, se purificaron a partir de los geles de poliacrilamida, obteniendo cantidades de fragmento indetectables, por lo que para poder clonarlos y secuenciarlos, fue necesaria una reamplificación usando las mismas condiciones de amplificación selectiva (Fig. 10).

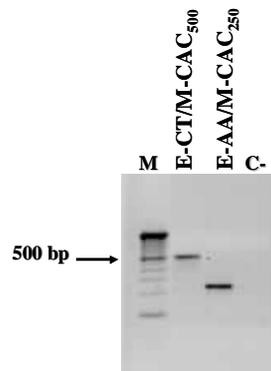


Figura 10. Reamplificación de bandas comunes a todos los aislados de *A. fumigatus*, generadas por AFLP con las combinaciones de oligonucleótidos E-AA/M-CAC₂₅₀ y E-CT/M-CAC₅₀₀. La electroforesis se llevó a cabo en gel de acrilamida al 8% a un voltaje de 1600 volts. M: 50 bp DNA Ladder.

Después de reamplificar las dos bandas seleccionadas, éstas se ligaron al vector de clonación pGEM[®]-T Easy para la transformación de células competentes *E. coli* JM109.

Determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes JM109. El promedio de las colonias obtenidas fue de 100, por lo que la eficiencia de transformación resultó ser de 100 UFC/0.001ng DNA, que corresponde a 1×10^5 UFC/ng de DNA, la que se consideró adecuada para la transformación, ya que este valor corresponde a la eficiencia de transformación mínima requerida y recomendada por la casa comercial.

Clonación de los fragmentos purificados. El fragmento reamplificado de 250 bp, seleccionado del patrón polimórfico de AFLP con la combinación E-GA/M-CTC, y el de 500 bp seleccionado del patrón polimórfico de AFLP con la combinación E-

GA/M-CTC, fueron ligados de manera independiente al vector de clonación pGEM®-T Easy vector (Promega) y transformados en células competentes de *E. coli* JM109 (Promega). Se obtuvo una eficiencia de transformación del 90%. La selección de las clonas recombinantes se hizo con base en el color de las colonias en el medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal, en donde las clonas recombinantes presentaron color blanco debido a que la secuencia del gen que codifica para la β -galactosidasa se interrumpe al integrar un fragmento de DNA y las células pierden la capacidad de degradar la X-Gal presente en el medio. Las clonas que desarrollaron una pigmentación azul no tienen ningún fragmento integrado, por lo que conservan intacta la secuencia de la β -galactosidasa y por consecuencia tienen la capacidad de degradar la X-Gal presente en el medio (Fig. 11).

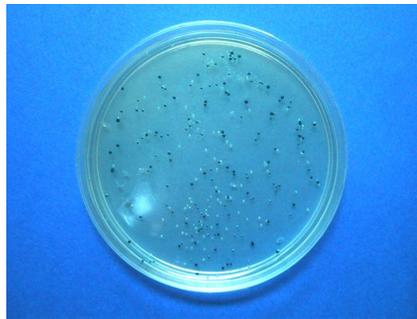


Figura 11. Clonas recombinantes obtenidas en medio LB/ampicilina/X-Gal/IPTG. Las colonias blancas corresponden a las clonas positiva (plásmido con el inserto), las colonias azules representan las clonas negativas (plásmidos sin inserto).

Por otro lado, se eligieron 10 clonas recombinantes por cada fragmento clonado y se sembraron en medio LB/ampicilina (100 μ g/mL) para caracterizarlas posteriormente. A las clonas seleccionadas se les denominó de la siguiente manera: En primer lugar, se anotó la combinación de bases que se utilizó para generar los patrones polimórficos de AFLP, posteriormente como subíndice, el tamaño del fragmento: E-AA/M-CAC₂₅₀ y E-CT/M-CAC₅₀₀.

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia. Para verificar que las clonas seleccionadas contenían las bandas purificadas a partir del AFLP de aislados de *A. fumigatus*, se llevó a cabo una PCR en colonia con oligonucleótidos universales, pUC/M13 izquierdo y derecho, como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados de la PCR confirmaron las clonas positivas que contenían los fragmentos deseados (Fig. 12). Cabe mencionar que el tamaño observado

en la figura es ligeramente mayor al observado en la reamplificación, debido a que se amplifica tanto el fragmento integrado como una parte del vector, que es de aproximadamente de 250 bp, lo cual incrementa el tamaño de los fragmentos clonados.

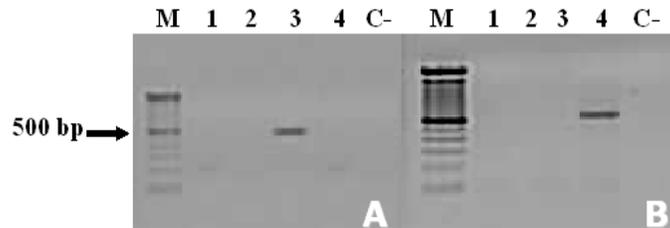


Figura 12. Caracterización de las clonas por PCR con oligonucleótidos universales. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, de la amplificación de las cuatro clonas obtenidas de la transformación de los vectores con los fragmentos de 250 y 500 bp generados con las combinaciones de oligonucleótidos E-AA/M-CAC y E-CT/M-CAC, respectivamente. M: 100 bp DNA Ladder.

De las clonas que resultaron positivas, se eligió una por cada fragmento clonado y se nombraron como se mencionó anteriormente: E-AA/M-CAC₂₅₀ y E-CT/M-CAC₅₀₀.

Purificación de plásmidos por método enzimático. De las clonas caracterizadas como positivas para los fragmentos de interés E-AA/M-CAC₂₅₀ y E-CT/M-CAC₅₀₀, se purificaron sus plásmidos por el método enzimático como se encuentra especificado en la metodología. Los plásmidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, observando una banda que se encuentra arriba de los 3015 bp, que es el tamaño del vector de clonación (Fig. 13). La cantidad de plásmidos purificados fue 100 ng/μL.

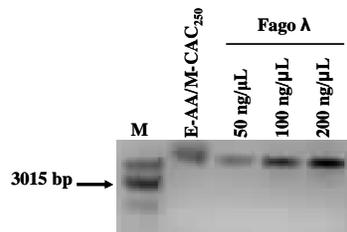


Figura 13. Purificación y cuantificación de los plásmidos obtenidos, por método enzimático, de las clonas E-AA/M-CAC₂₅₀. La cuantificación se llevó a cabo por comparación con el fago λ en electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. M: λ/HindIII digerido con la enzima *EcoRI*.

Secuenciación y alineamiento de la secuencia. La secuencia de 250 y 500 bp, E-AA/M-CAC₂₅₀ y E-CT/M-CAC₅₀₀, se nombraron marcadores SCAR. Estas secuencias

se alinearon con todas las secuencias depositadas en el GenBank con la finalidad de descartar homología con alguna secuencia de otros hongos patógenos para el hombre. Se encontró homología con dos proteínas hipotéticas conservadas en *Aspergillus fumigatus* Af293 (AFUA_3G08790) y *Aspergillus fumigatus* Af293 (AFUA_4G09930).

Diseño de oligonucleótidos específicos para identificar *A. fumigatus* por PCR de punto final. Con base en la secuencia de los fragmentos de las clonas E-AA/M-CAC₂₅₀ y E-CT/M-CAC₅₀₀, se diseñaron diez pares de oligonucleótidos con las siguientes características: T_m (57 a 63 °C), tamaño del producto de PCR (200 a 250 bp), %GC (40 a 60%) y tamaño de los oligonucleótidos (20 a 25 nt). De los diez pares de oligonucleótidos diseñados se seleccionó: E-AA/M-CAC(F)₂₁₀ 5'-CATCAGGGGTAAAGGCTGGTTGAAG-3' con una T_m=57.56 °C, 52 % GC E-AA/M-CAC(R)₂₁₀ 5'-ACCCATGCTGTCTCACGCCAAA-3' con una T_m=59.02 °C y un 54 % GC, que amplifican un fragmento de 210 bp. Este par de oligonucleótidos fue sintetizado por Sigma-Aldrich Corp.

Especificidad de los marcadores SCAR para identificar *A. fumigatus* por PCR punto final. La PCR con los dos marcadores SCAR identificó todos los aislados de *A. fumigatus* incluidos en este estudio. No se observó amplificación con ninguno de los organismos filogenéticamente relacionados y no relacionados (Fig. 14).

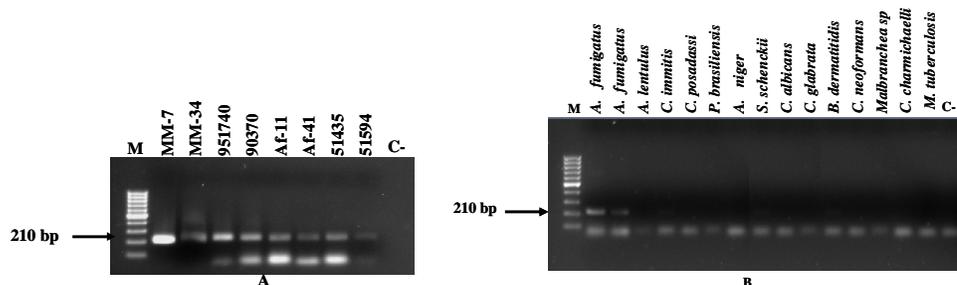


Figura 14. Especificidad del marcador SCAR E-AA/M-CAC₂₁₀ de identificación de *A. fumigatus*. (A) Amplificación del DNA de diferentes aislados de *A. fumigatus*. (B) Amplificación del DNA de otros microorganismos patógenos y no patógenos. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.5%. M: 100 bp DNA Ladder.

Sensibilidad de los marcadores SCAR para identificar *A. fumigatus* por PCR punto final. La PCR con el marcador SCAR E-AA/M-CAC₂₁₀, detectó hasta 100 fg de DNA del aislado MM-11 (Fig. 15).

1
0 ng/μL
ng/μL
ng/μL
00 pg/μL
0 pg/μL
pg/μL
00 fg/μL
0 fg/μL
fg/μL
(-)

Figura 15. Sensibilidad del marcador SCAR E-AA/M-CAC₂₁₀, con diferentes concentraciones de DNA de *A. fumigatus*. (aislado MM-11). La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.5%. M: 100 bp DNA Ladder.

Diseño de la sonda para identificar a *A. fumigatus* por PCR tiempo real (qPCR). Con base en la secuencia del amplicón de 210 bp, se diseñó una sonda TaqMan de 30 bp. La sonda fue marcada con el fluoróforo FAM y con el quencher TAMRA. La sonda fue diseñada y sintetizada por Applied Biosystems.

Para estandarizar la técnica de qPCR, inicialmente se probaron diferentes cantidades de ensayo (sonda y oligonucleótidos) TaqMan, para determinar la cantidad en la que se observa una mayor fluorescencia. Se probaron 1, 2 y 3 μL de ensayo y se observó que con 1 μL la amplificación del DNA se detecta antes que con las otras cantidades de ensayo probadas. Cabe destacar que entre éstas no hay diferencia significativa en la amplificación (Fig. 16).

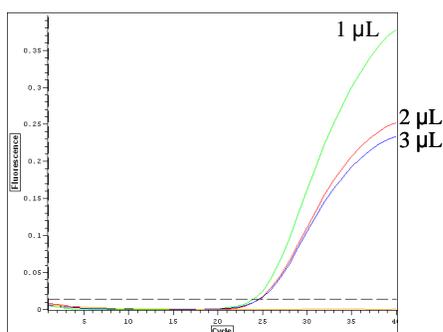


Figura 16. Curva de concentración del ensayo TaqMAN (oligonucleótidos y sonda) para la detección de *A. fumigatus* por qPCR. Las líneas punteadas representan la fluorescencia basal.

Después de determinar las condiciones óptimas de amplificación, se realizó una curva estándar probando, por duplicado, diferentes diluciones de DNA (10 ng -1 fg/ μL) del aislado MM-3 de *A. fumigatus*. Con la curva estándar se determinó la sensibilidad del ensayo, la cual resultó de 10 fg DNA/ μL de muestra. El coeficiente (r^2) de la regresión lineal entre los valores de Ct y el logaritmo de las diluciones de DNA de *A. fumigatus* MM-3 probadas fue 0.945 (Fig. 17). La reproducibilidad del ensayo fue del 100%.

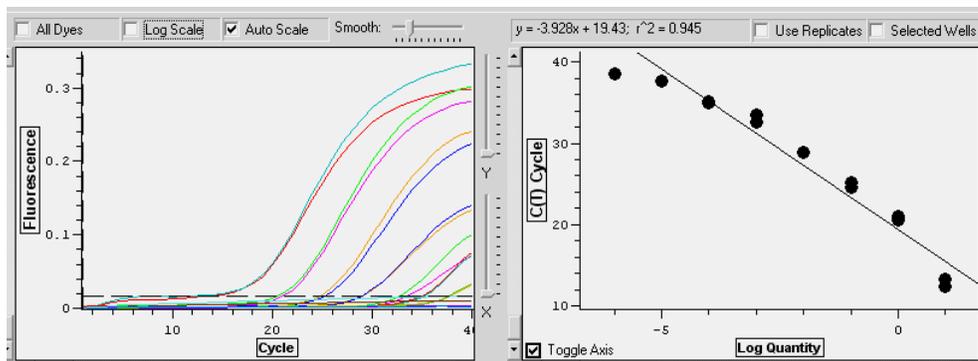


Figura 17. Amplificación por qPCR de diferentes diluciones de DNA de *A. fumigatus* MM-11, y correlación lineal de la qPCR de diferentes diluciones de DNA de *A. fumigatus* del aislado MM-11. Se usó una sonda TaqMAN marcada con el fluoróforo FAM y el quencher TAMRA.

Especificidad de los marcadores SCAR para identificar *A. fumigatus* por qPCR. La PCR con los dos marcadores SCAR identificó todos los aislados de *A. fumigatus* incluidos en este estudio. No se observó amplificación con ninguno de los organismos filogenéticamente relacionados y no relacionados (Fig. 18).

En relación con la prueba de especificidad, solo se detectó una señal mínima de fluorescencia con un aislado de *A. flavus* s como se puede observar en la figura 18.

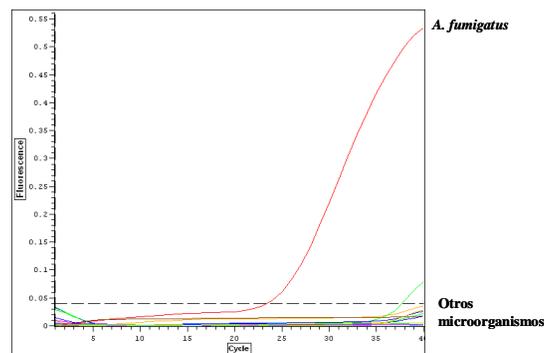


Figura 18. Especificidad de la PCR tiempo real. Amplificación del DNA de *A. fumigatus* y de otros hongos patógenos y *M. tuberculosis*. Se usó una sonda TaqMAN marcada con el fluoróforo FAM y el quencher TAMRA.

La especificidad de la sonda se evaluó amplificando 10 muestras de DNA de diferentes aislados de *A. fumigatus*, donde se logró detectar y cuantificar el material genético del hongo (Fig. 19).

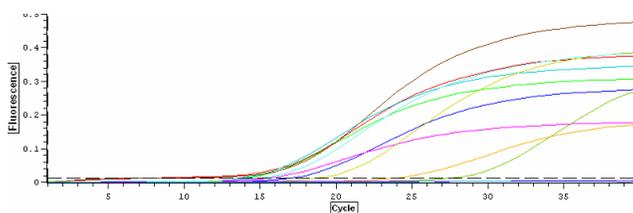


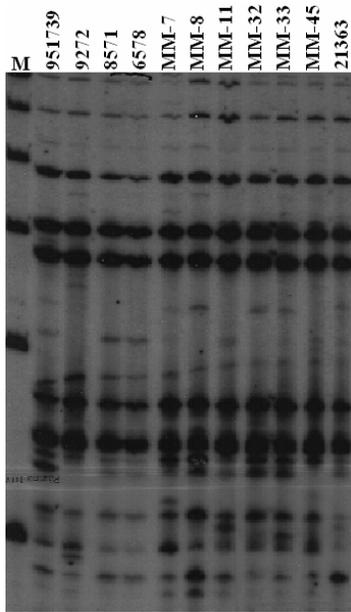
Figura 19. PCR tiempo real para la detección y cuantificación de DNA de aislados de *A. fumigatus* procedentes de distintos países y fuentes. Se usó una sonda TaqMAN marcada con el fluoróforo FAM y el quencher TAMRA.

OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR DE RESISTENCIA A ITC POR AFLP

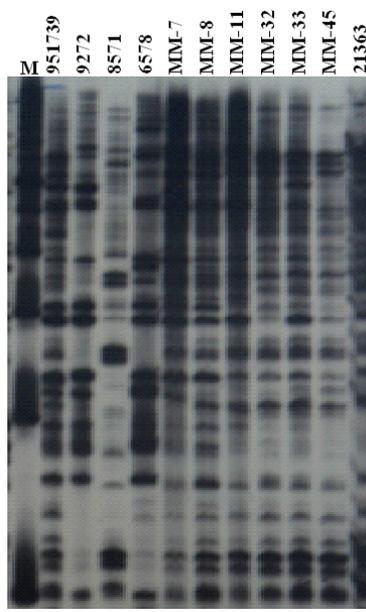
Obtención de aislados mutantes resistentes a ITC. Después de la exposición a luz UV, el aislado MM-11 mutó, ya que desarrolló colonias en YEPD adicionado con una elevada concentración del antifúngico (100 $\mu\text{g/mL}$), independientemente del tiempo sometido al agente mutagénico. Por lo que se obtuvieron cinco aislados mutantes, los cuales fueron nombrados: MM-11 10s, MM-11 30s, MM-11 50s, MM-11 70s y MM-11 90s. La resistencia a ITC de estos mutantes se comprobó con la determinación de la CIM, la cual resultó $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ para ITC, mientras que el aislado que no fue sometido a luz UV mantuvo la sensibilidad a ITC, con una CIM=1 $\mu\text{g/mL}$. Los aislados mutantes fueron incluidos en los ensayos de AFLP y cDNA-AFLP.

Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). De los mismos patrones polimórficos generados por AFLP para el diseño del marcador SCAR para identificación de *A. fumigatus*, se seleccionaron bandas diferenciales entre los aislados sensibles y resistentes a ITC, previamente tipificados.

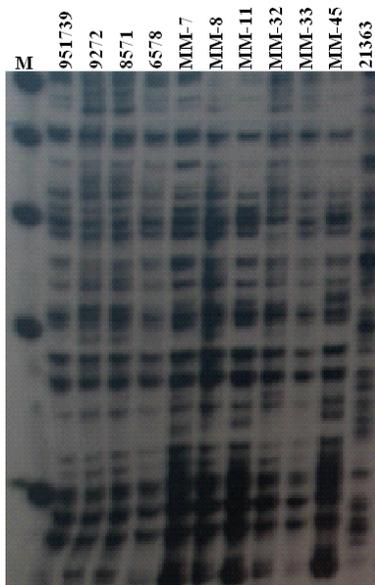
En los patrones polimórficos generados con las combinaciones de oligonucleótidos: E-AA/M-CAC; E-AA/M-CAT; E-AA/M-CTG; E-AA/M-CTC; E-AC/M-CTC; E-AC/M-CAT, E-AC/M-CTG y E-AC/M-CAC no se encontró ninguna banda diferencial entre los aislados sensibles y resistentes a ITC que pudieran ser útiles para la generación de los marcadores SCAR de resistencia a este antifúngico (Figs. 20-21).



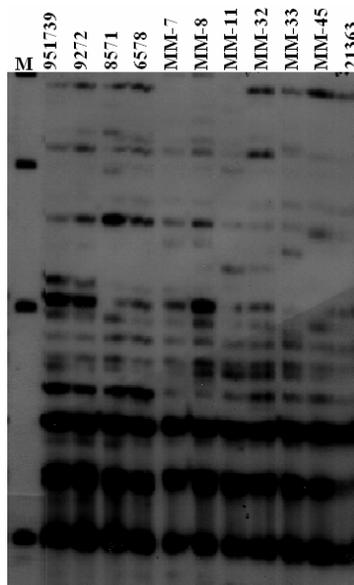
E-AC/M-CAC



E-AA/M-CTG



E-AA/M-CAT



E-AC/M-CAT

Figura 20. Patrón polimórfico de aislados *A. fumigatus* resistentes y sensibles a ITC, generado por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-AC/M-CAC, E-AA/M-CTG, E-AA/M-CAT y E-AC/M-CAT. M: 50 bp DNA Ladder.

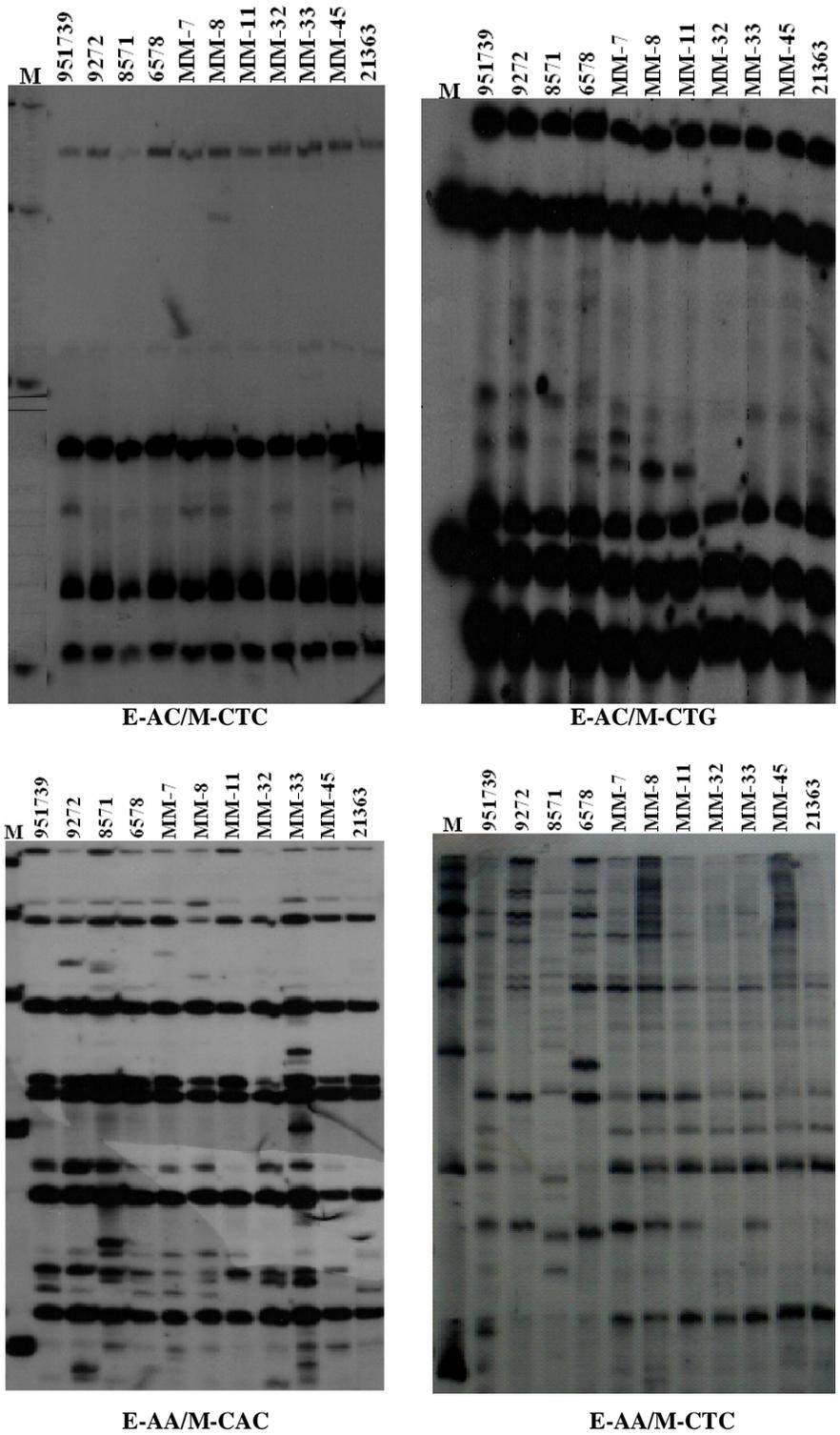


Figura 21. Patrón polimórfico de aislados *A. fumigatus* resistentes y sensibles a ITC, generado por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-AC/M-CTC, E-AC/M-CTG, E-AA/M-CAC, E-AA/M-CTC. M: 50 bp DNA Ladder.

Cuando se llevó a cabo el AFLP con las combinaciones de oligonucleótidos E-GA/M-CAC; E-GA/M-CTC; E-CT/M-CAC y E-CT/M-CTC, se pudieron detectar bandas diferenciales entre los aislados de *A. fumigatus* sensibles y resistentes a ITC (Figs. 22-23). En total, se detectaron 16 bandas diferenciales, las cuales se detallan en la Tabla 6.

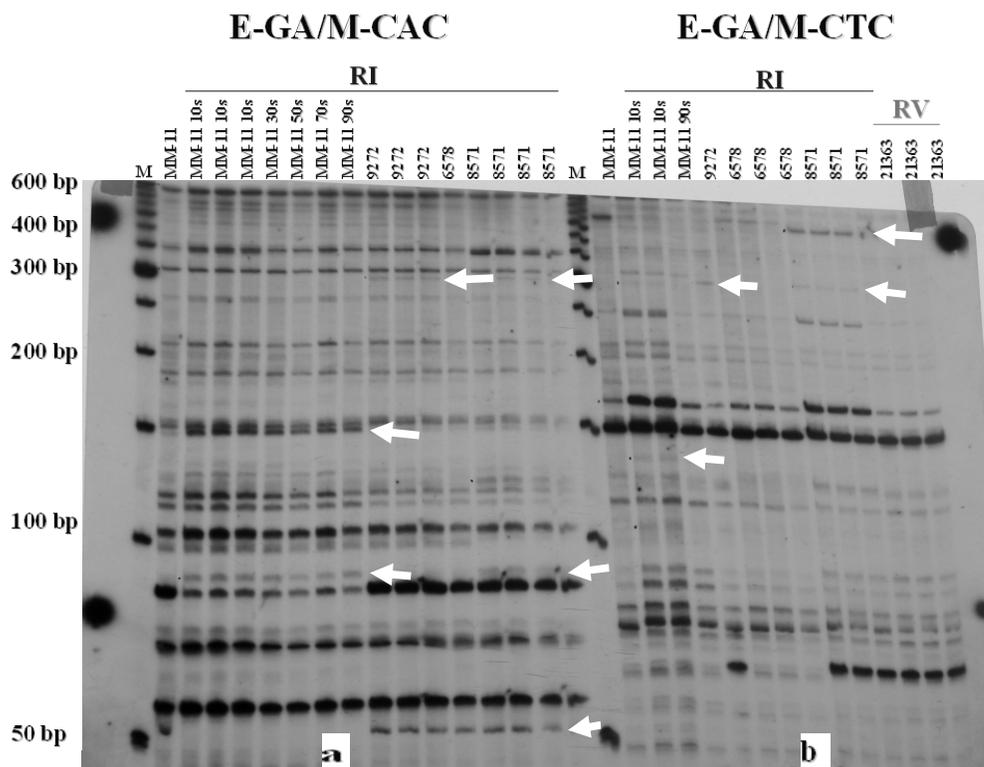


Figura 22. Patrones polimórficos de los aislados de *A. fumigatus* resistentes a ITC, generados por AFLP con las combinaciones de oligonucleótidos E-GA/M-CAC (a) y E-GA/M-CTC (b). M: 50 bp DNA Ladder.

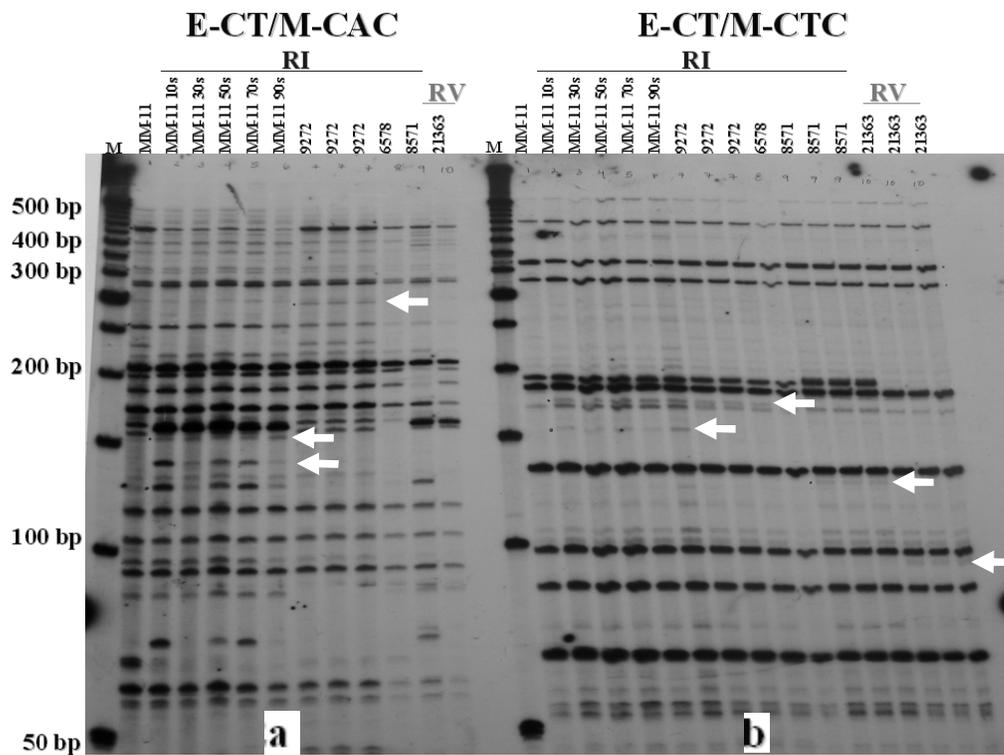


Figura 23. Patrón polimórfico de aislados *A. fumigatus* resistentes y sensibles a ITC, generado por AFLP con la combinación de oligonucleótidos E-CT/M-CAC (a) y E-CT/M-CTC (b). M: 50 bp DNA Ladder.

Purificación y reamplificación de las bandas obtenidas por AFLP. Las 16 bandas diferenciales asociadas a resistencia a ITC o VRC, se purificaron a partir de los geles de poliacrilamida, y se reamplificaron para poder clonarlas y secuenciarlas posteriormente. Es importante mencionar que la banda de 50 bp no pudo ser reamplificada ni clonada, debido a su tamaño. Las bandas con un tamaño menor de 200 bp fueron reamplificadas y secuenciadas directamente con la combinación de oligonucleótidos que las generaron, ya que es difícil la clonación de este tipo de fragmentos.

La reamplificación de las bandas diferenciales generó otras bandas inespecíficas de menor peso molecular. Para eliminar las bandas inespecíficas fue necesario ajustar las condiciones de la PCR para incrementar la especificidad. Inicialmente, se realizó una curva de concentración de DNA (1 y 2 μ L) empleando las mismas concentraciones de reactivos y programa de amplificación selectiva; sin embargo, no mejoró la especificidad de la reacción. Por lo que se llevó a cabo una curva de temperaturas de alineamiento (56, 58 y 60 $^{\circ}$ C), encontrando que a 60 $^{\circ}$ C la amplificación fue específica (Figs. 24-25).

Figura 24. Reamplificación de la banda de 300 bp originada con la combinación E-CT/M-CAC. Para la amplificación se usaron diferentes volúmenes de DNA del fragmento (1 y 2 µL) y una temperatura de alineamiento de 60 °C. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5%. M: 100 bp DNA Ladder.

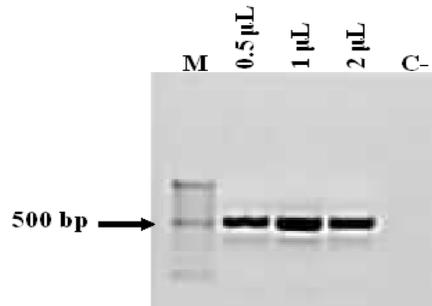


Figura 25. Curva de DNA (0.5, 1 y 2 µL) para la reamplificación de la banda de 500 bp originada con la combinación E-GA/M-CTC, empleando el mismo programa de amplificación selectiva del AFLP. M: 100 bp DNA Ladder.

Por lo que se decidió llevar a cabo las reamplificaciones aumentando la temperatura de alineamiento a 60 °C, temperatura a la que se amplifican específicamente las bandas diferenciales asociadas a resistencia a ITC (Fig. 26-27).

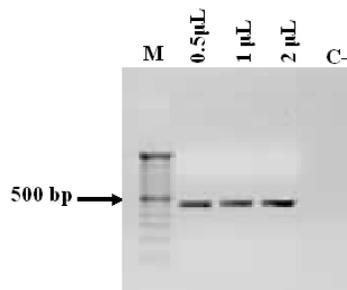


Figura 26. Reamplificación de la banda de 500 bp originada con la combinación E-GA/M-CTC empleando una temperatura de alineamiento de 60 °C. M: 100 bp DNA Ladder.

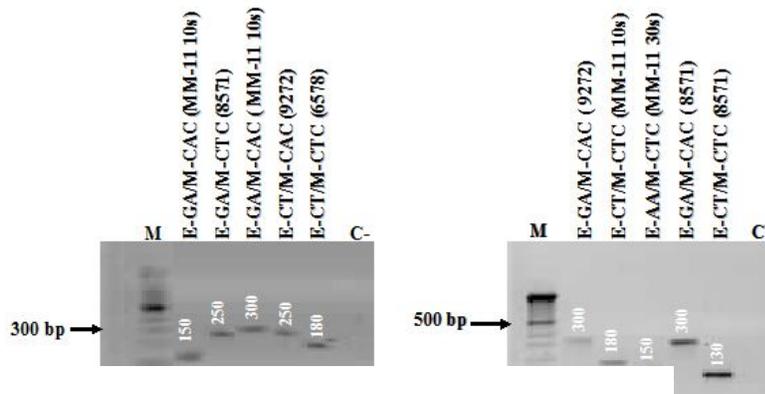


Figura 27. Reamplificación específica de diferentes bandas diferenciales asociadas a resistencia a ITC y VRC, detectadas en los patrones AFLP utilizando diferentes combinaciones de bases, a partir de aislados de *A. fumigatus* resistentes y sensibles a ITC y VRC. M: 100 bp DNA Ladder.

Clonación de los fragmentos purificados. Todos los fragmentos reamplificados con tamaño ≥ 200 bp fueron ligados, de manera independiente, al vector de clonación pGEM®-T Easy vector (Promega) y transformados en células competentes de *E. coli* JM109 (Promega), observando una eficiencia de transformación entre el 85 y 90%. La selección de las clonas recombinantes se hizo con base en el color que presentaron las colonias en el medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal, las clonas recombinantes presentaron un color blanco mientras las clonas que desarrollaron una pigmentación azul no tenían ningún fragmento integrado.

De cada fragmento clonado se eligieron 10 clonas recombinantes y se sembraron en medio LB/ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para caracterizarlas posteriormente. Las clonas seleccionadas se nombraron tomando en cuenta la combinación de oligonucleótidos que amplificaron el fragmento, el tamaño y el aislado que presentó dicho fragmento, como se describió anteriormente.

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia. Para verificar que las clonas seleccionadas tenían las bandas de interés, se llevó a cabo una PCR en colonia con oligonucleótidos universales, como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados de la PCR confirmaron la presencia de las bandas diferenciales seleccionadas, (Fig. 28), ya que se observaron amplicones del tamaño esperado. De cuatro clonas analizadas en cada caso, sólo una resultó positiva.

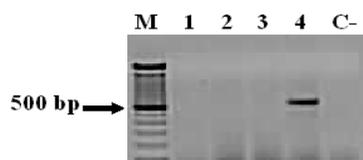


Figura 28. Caracterización de las clonas por PCR con oligonucleótidos universales. La figura muestra la amplificación de cuatro clonas obtenidas de la transformación con el fragmento de 300 bp generado con las combinaciones de oligonucleótidos E-GA/M-CAC. M: 100 bp DNA Ladder.

Purificación de plásmidos por método enzimático. Los plásmidos de las clonas caracterizadas como positivas para los fragmentos de interés, E-GA/M-CTC₂₅₀(8571), E-GA/M-CAC₃₀₀(9272), E-GA/M-CTC₅₀₀(8571), E-GA/M-CTC₃₅₀(8571) y E-CT/M-CAC₃₀₀(9272), fueron purificados y la presencia de los plásmidos se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, observando una banda superior a los 3015 bp, que es el tamaño del vector de clonación.

El resto de las bandas diferenciales detectadas por AFLP fueron purificadas y secuenciadas directamente, sin clonar (Fig. 29). Estos fragmentos se nombraron siguiendo el mismo criterio que se usó para nombrar las clonas.

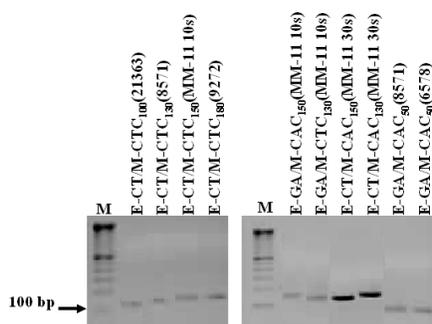


Figura 29. Purificación de las bandas diferenciales de tamaño ≤ 200 bp, observadas en los patrones AFLP de aislados de *A. fumigatus*. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.5%. M: 100 bp DNA Ladder.

Secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo usando los oligonucleótidos universales o los oligonucleótidos que se emplearon para generar las bandas diferenciales por AFLP. La secuencia obtenida ahora corresponde al marcador SCAR.

Comparación de las secuencias en GenBank. Las secuencias de las bandas diferenciales seleccionadas se alinearon con todas las secuencias depositadas en el GenBank, con la finalidad de determinar si las secuencias corresponden a fragmentos de genes asociados a resistencia a azoles en *A. fumigatus* o en otros hongos patógenos que también han desarrollado resistencia a estos antifúngicos, y con base en lo anterior se diseñaron los oligonucleótidos específicos de resistencia a ITC y VRC. La comparación de las secuencias (marcadores SCAR) en el GenBank reveló las similitudes resumidas en la Tabla 6.

Del análisis que se realizó con las secuencias de las bandas diferenciales detectadas en los patrones AFLP de aislados de *A. fumigatus* sensibles y resistentes a

ITC y VRC, resultaron de particular interés las secuencias de los fragmentos E-GA/M-CAC₃₀₀(8571 y 9272), debido a su homología con la secuencia de una proteína transportadora de drogas tipo ABC. Así mismo, los fragmentos E-GA/M-CTC₃₅₀(MM-11 10s, 8571 y 9272), E-CT/M-CAC₁₃₀(MM-11 10s, MM-11 30s, MM-11 50s, MM-11 70s y MM-11 90s) y E-CT/M-CTC₁₀₀(21363), son interesantes porque presentan homología con la secuencia correspondiente a una bomba de flujo, AtrD (Andrade *et al.*, 2000), lo cual también puede tener relevancia en *A. fumigatus*.

Diseño de oligonucleótidos específicos para detectar resistencia a antifúngicos. Con base en la secuencia de diferentes clonas, se diseñaron pares de oligonucleótidos, siete pares en total, tomando en cuenta los criterios descritos en Materiales y Métodos y se resumen en la Tabla 6. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Corp.

Evaluación de oligonucleótidos específicos para detectar resistencia a ITC en aislados de *A. fumigatus*. De los siete pares de oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia de las bandas diferenciales detectadas en los aislados resistentes a ITC o VRC, ninguno resultó específico para identificar resistencia, ya que el amplicón esperado se observó en el DNA de aislados de *A. fumigatus* sensibles y resistentes a ITC (Fig. 30).

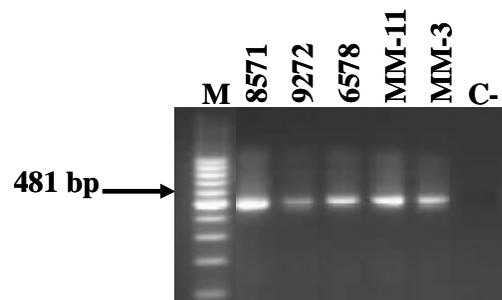


Figura 30. Ejemplo de la PCR con los oligonucleótidos diseñados para detectar resistencia a ITC en aislados de *A. fumigatus* sensibles y resistentes a ITC. Los oligonucleótidos amplifican un fragmento de 481 bp. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.5%. M: 100 bp DNA Ladder.

Tabla 6. Resumen de los marcadores SCAR obtenidos por AFLP

Combinación de oligonucleótidos AFLP	Tamaño de la banda diferencial	Aislados resistentes que presentan la banda diferencial	Antifúngico	Similitud	Oligonucleótidos diseñados	Especificidad
E-GA/M-CAC	100 bp	8571 y 9272	ITC	100% NADPH-ubiquinona oxidoreductasa de <i>A. fumigatus</i> Af293	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
E-GA/M-CAC	140 bp	8571 y mutantes	ITC	19 a 26% transportador multidrogas tipo ABC y transportador ABC de eflujo	Af481(F)5'- GCACCTACACAACGGTCCAG-3' Af481(R) 5'- CGAACACAACATTCTCGCC-3' Amplicón de 481 bp	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
E-GA/M-CAC	180 bp	8571	ITC	Proteínas hipotéticas en <i>N. fischeri</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> y <i>A. nidulans</i>	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
E-GA/M-CAC	300 bp	8571 y 9272	ITC	97% con transportador multidrogas tipo ABC de <i>A. fumigatus</i> Af293 y 97% con gen putativo de un transportador multidrogas tipo ABC en <i>N. fischeri</i> .	E-GA/M-CAC(F) ₂₀₃ 5'- GGGGTAAAGGCTGGTTGAAG- 3' y E-GA /M-CAC(R) ₂₀₃ 5'- ACCCATGCTGTCTCACGCCAAA-3' Amplicón de 203 bp fTabc(F)5' TGCCGCGGTTTACGCAGGAA -3' y AfTabc(R) 5'-AGTGGTTTTCCCGCAGCCGG-3' Amplicón de 636 bp	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
E-GA/M-CAC	50 bp	8571, 6578, 9272 y mutantes	ITC	No se pudo secuenciar por su pequeño tamaño.	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
E-GA/M-CTC	150 bp	MM-11 10s	ITC	10-13% con diferentes proteínas de <i>A. fumigatus</i> Af293, como una proteína rica en prolina de la pared celular, un transportador de monosacáridos (MFS),	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	

				factor de transcripción C6, hexocinasa, trihidroxitolueno oxigenasa.		
E-GA/M-CTC	180 bp	MM-11 10s	ITC	8 y 41% con proteínas hipotéticas de <i>A. fumigatus</i> y de otras especies de <i>Aspergillus</i> .	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
E-GA/M-CTC	350 bp	MM-11 10s, 8571 y 9272	ITC	20-36% con regiones de genes que codifican para diversas proteínas en <i>A. fumigatus</i> : anexina, factor de transcripción RegA, nucleasa de regulación postranscripcional, bomba de flujo tipo ABC (AtrD) y proteínas hipotéticas.	AfABC(F) 5'-ATCAGGGGTAAGGCTGGTT -3' AfABC(R) 5'-CTGTCTCACGCCAAAAACAC -3' Amplicón de 195 bp	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
E-GA/M-CTC	500 bp	8571 y 6578	ITC	17-24% con genes que codifican para factor de transcripción C6, GTPasa Rho, proteína cinasa, transportador de azúcar MFS y proteína hipotética conservada en <i>A. fumigatus</i> Af293.	5'-ATCAGGGGTAAGGCTGGTT -3' AfRight 5'-CATCACCCATGCTGCTCAC -3' Amplicón de 206 bp	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
E-CT/M-CAC	130 bp	Mutantes	ITC	19-34% con genes de <i>A. fumigatus</i> que codifican para proteínas hipotéticas, proteínas de ensamblaje Shy1, anexina, correpresor transcripcional de histona, factor de transcripción RegA, bomba de flujo AtrD y proteína reguladora Atg2.	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
E-CT/M-CAC	150 bp	Mutantes	ITC	12% con un transportador ABC de <i>A. fumigatus</i> Af293 y entre 13-17% de homología con otras proteínas hipotéticas de la misma cepa.	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
E-CT/M-CAC	300 bp	9272	ITC	8 y 41% con la secuencia de diferentes proteínas hipotéticas de <i>A. fumigatus</i> Af293.	AfABC(F) 5'-ATCAGGGGTAAGGCTGGTT -3' AfABC(R) 5'-ACGCCAAAAACACGTTGAAT -3' Amplicón de 188 bp	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
E-CT/M-CTC	100 bp	21363	VCZ	17-31% con COX1 (proteína de ensamblaje), anexina (ANX4), nucleasa de regulación postranscripcional (Mkt1),	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	

				bomba de flujo AtrD, factor transcripcional y diversas proteínas hipotéticas en <i>A. fumigatus</i> .		
E-CT/M-CTC	130 bp	8571	ITC	84% con NADH-ubiquinona oxidoreductasa, y entre 16-21% de homología con un transportador MFS, poligalacturonasa, proteína reparadora de DNA Mih1, MAP cinasa y riboflavin cinasa de <i>A. fumigatus</i> Af293	Af451(F) 5'-GCGGAGGTCTAAGTGCTTCG -3' Af451(R) 5'- ATAGTCAGAGGAGCGCCAACG -3' Amplicón de 451 bp	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
E-CT/M-CTC	150 bp	Mutantes	ITC	15 y 41% con proteínas hipotéticas conservadas en <i>N. fisheri</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>Uncinocarpus reesii</i> y glutamato deshidrogenasa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
E-CT/M-CTC	180 bp	Mutantes y 9272	ITC	10-44% con el transportador Arb1 tipo ABC, para ubiquinona, para una ciclina putativa (Clb3), Fosfolipasa C, aldehído reductasa, triosafosfato isomerasa, proteína cinasa (Gcn2), piruvato descarboxilasa y proteínas hipotéticas conservadas de <i>A. fumigatus</i> .	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	

La palabra mutantes se refiere al aislado MM-11 de *A. fumigatus* que fue expuesto a luz UV durante 10, 30, 50, 70 y 90 s para transformarlo en resistente a ITC.

OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR DE RESISTENCIA A ITC POR cDNA-AFLP

Extracción de RNA. Los dos métodos de extracción de RNA, a partir del micelio de los aislados de *A. fumigatus*, permitieron la obtención de ácidos nucleicos de buena calidad para llevar a cabo la síntesis de cDNA, ya que se observaron claramente las bandas del rRNA 18 y 28S (Fig. 31-33), además el cociente de absorbancia 260/280 fue mayor de 2, lo que indicó que el RNA era puro, libre de proteínas. Sin embargo, el segundo método de extracción de RNA, que involucró la ruptura celular con ayuda de nitrógeno líquido, fue el más adecuado para extraer el RNA de todos los aislados de *A. fumigatus* estudiados. Con este último método, la concentración de RNA de los aislados de *A. fumigatus* fue entre 555.31-1642.40 ng/ μ L y el cociente absorbancia 260/280 fue de 2.16-2.22, es decir, se obtuvo RNA de mayor calidad.

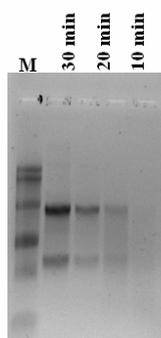


Figura 31. Extracción de RNA de los aislados de *A. fumigatus* resistentes a ITC y VRC, usando TRIZOL® (Invitrogen) y RNAlater en cultivos recientes y vórtex como homogenizador en diferentes tiempos. La electroforesis se llevó a cabo en gel desnaturizante en MOPS 1X a 80 V por 60 min. M: RNA ladder 0.2–9.5 Kb (Gibco BRL®).

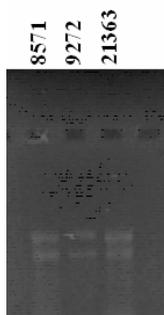


Figura 32. Extracción de RNA de los aislados de *A. fumigatus* resistentes a ITC y VRC, usando las condiciones óptimas. La electroforesis se llevó a cabo en gel desnaturizante en MOPS 1X a 80 V por 60 min. M: RNA ladder 0.2–9.5 Kb (Gibco BRL®).

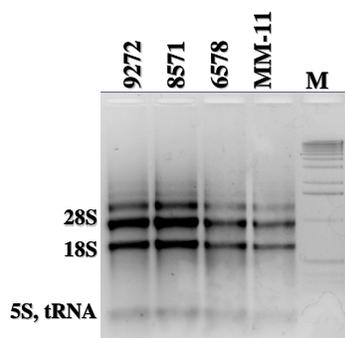


Figura 33. Purificación de RNA total de aislados de *A. fumigatus* resistentes y sensibles a ITC. M: marcador de tamaño molecular λ HindIII digerido con *EcoRI*.

Síntesis de cDNA primera y segunda hebra. La síntesis de la primera y segunda hebra del cDNA se corroboró por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 34). En la síntesis de la primera hebra se observa un barrido entre 500 y 4000 bp, en la segunda hebra también se observa un barrido en el mismo rango del marcador de tamaño molecular, pero de mayor intensidad debido a la síntesis de las dos hebras).

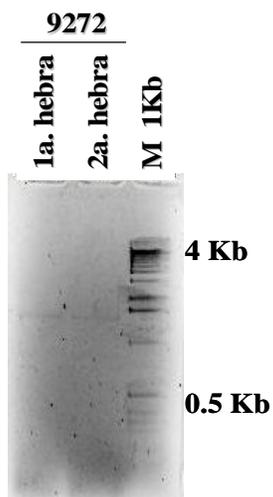


Figura 34. Síntesis de la primera y segunda hebra de cDNA de un aislado de *A. fumigatus* resistente a ITC. M: 1 Kb DNA Ladder.

El cDNA de doble hebra se obtuvo de buena calidad y en cantidad suficiente (50-180 ng/ μ L), para poder llevar a cabo las digestiones enzimáticas para la técnica del AFLP (Vuylsteke *et al.*, 2007).

cDNA-AFLP. Con las combinaciones de oligonucleótidos T-GA/M-A, T-TC/M-A, T-GA/M-C y T-TC/M-C usadas para la amplificación selectiva, se encontraron bandas que nos sugieren en algunos casos la sobreexpresión de algunos genes en los aislados resistentes. Mientras que las combinaciones T-GA/M-G, T-TC/M-G, T-GA/M-T y T-TC/M-T no generaron amplificaciones adecuadas para la identificación de bandas diferenciales entre aislados sensibles y resistentes a ITC o VRC (Fig. 35).

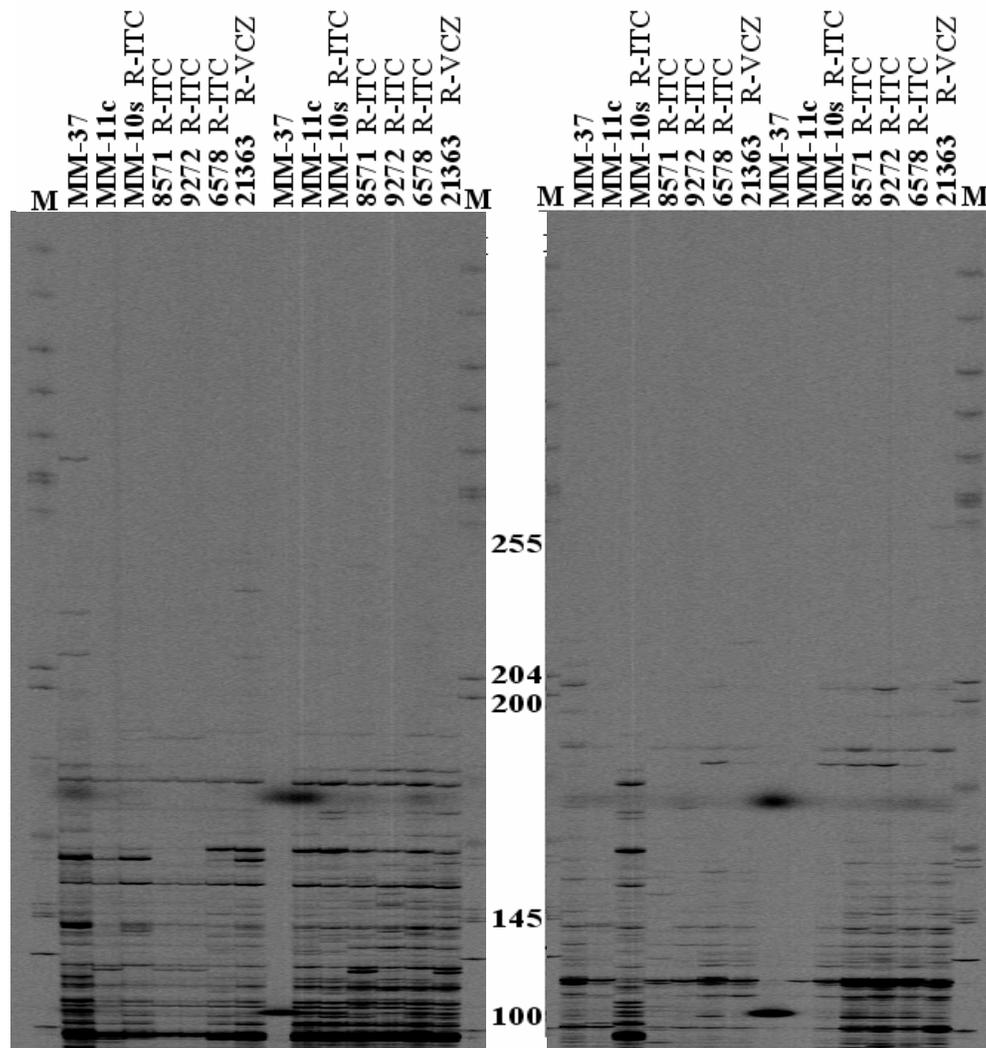


Figura 35. cDNA-AFLP de aislados clínicos de *A. fumigatus* con la combinación de oligonucleótidos T-GA/M-G, T-TC/M-G, T-GA/M-T y T-TC/M-T respectivamente. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 6%. M: 700 bp DNA Ladder.

Las combinaciones de oligonucleótidos, T-GA/M-A, T-TC/M-A, T-GA/M-C y T-TC/M-C, mostraron un total de 17 bandas diferenciales (Figs. 36-37), las cuales se detallan en la Tabla 8.

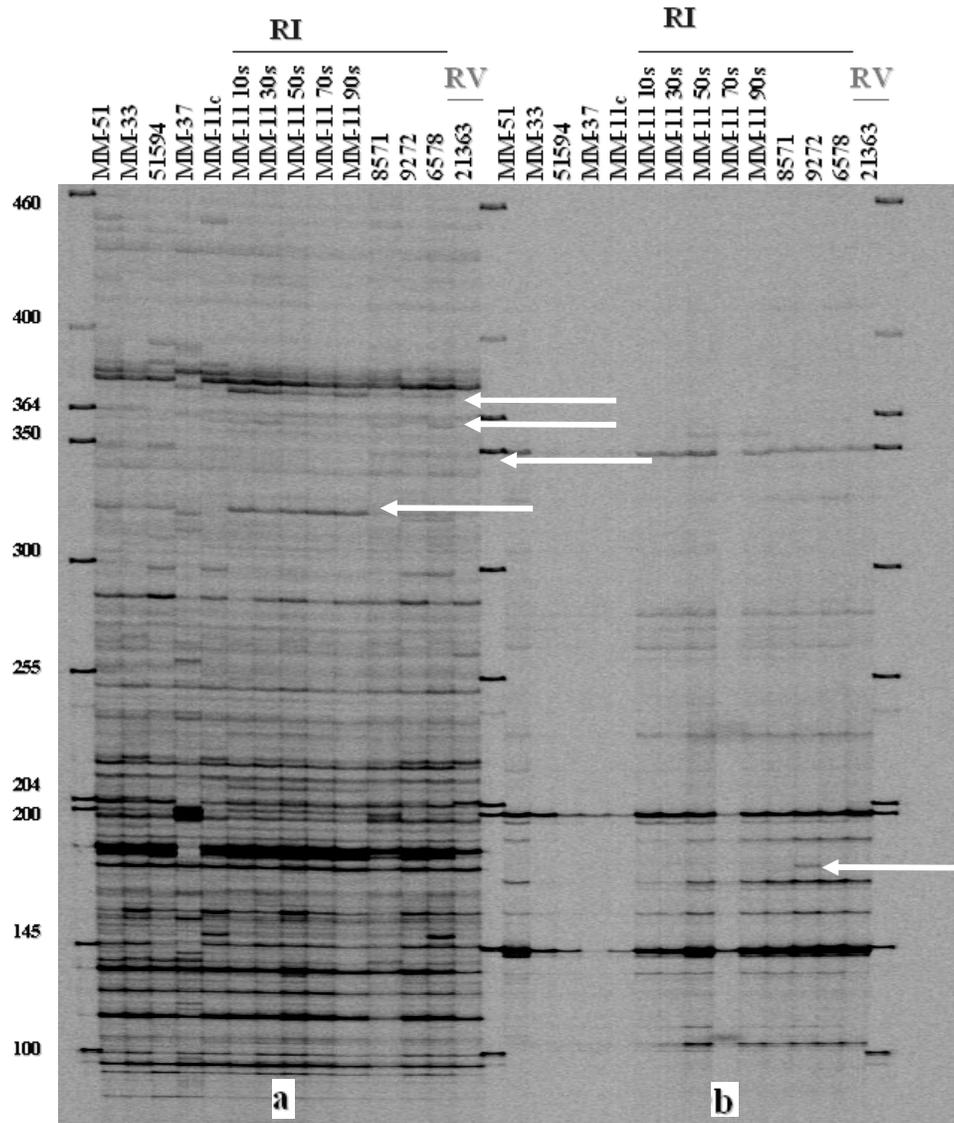


Figura 36. Patrón polimórfico de aislados de *A. fumigatus* resistentes (RI) y un aislado resistente a VRC (RV) generado por cDNA-AFLP con la combinación de oligonucleótidos T-GA/M-A (a) y T-TC/M-A (b) M: 700 bp DNA Ladder. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 6%. Las flechas indican las bandas diferenciales presentes en los aislados resistentes a ITC.

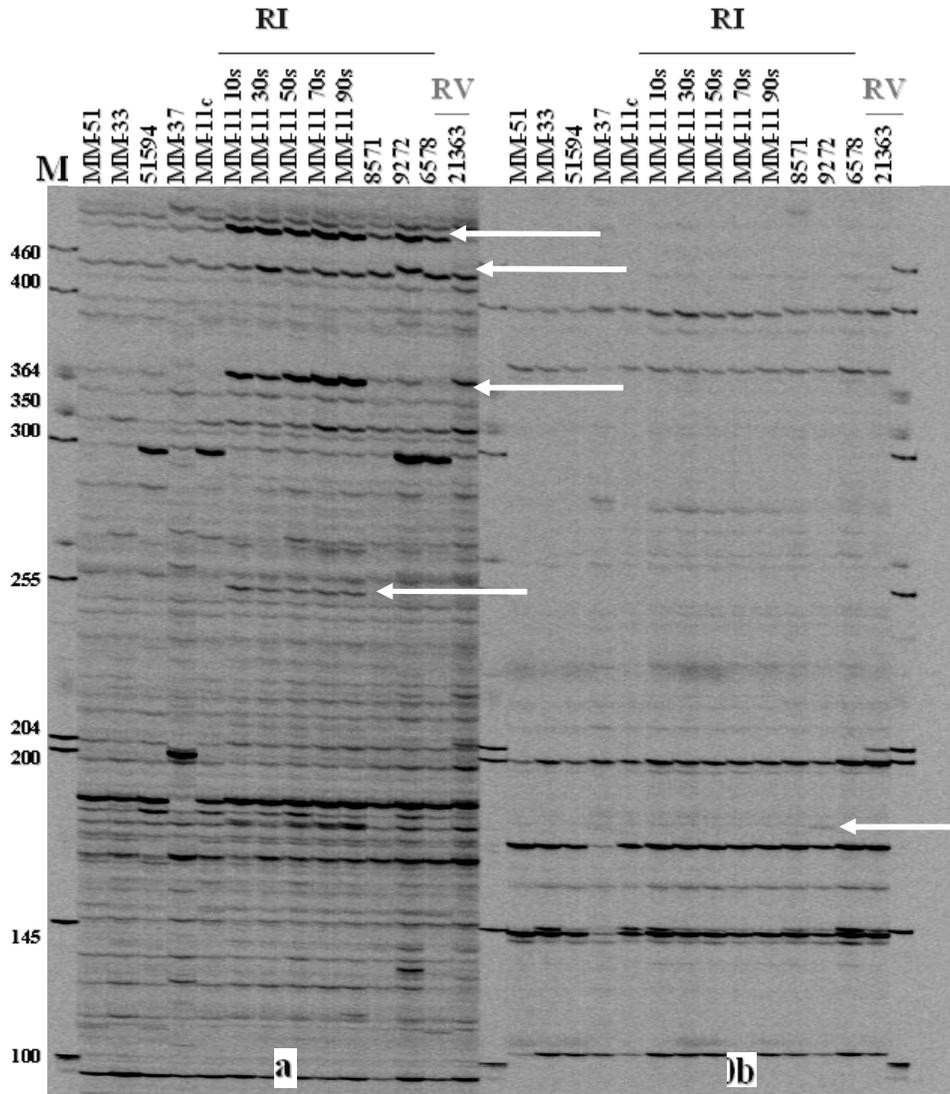


Figura 37. Patrón polimórfico de aislados de *A. fumigatus* resistentes (RI) y un aislado resistente a VRC (RV) generado por cDNA-AFLP con la combinación de oligonucleótidos T-GA/M-C (10a) y T-TC/M-C (10b) M: 700 bp DNA Ladder. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 6%. Las flechas indican las bandas diferenciales presentes en los aislados resistentes a ITC.

Purificación y reamplificación de fragmentos. Las 17 bandas diferenciales detectadas por cDNA-AFLP, fueron purificadas y reamplificadas. La reamplificación de las bandas diferenciales generó otras bandas inespecíficas de menor peso molecular cuando se utilizaron las condiciones de la amplificación selectiva por AFLP.

Para eliminar las bandas inespecíficas se modificó el programa de amplificación, el cual consistió de un ciclo de 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 1 min a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Debido a su pequeño tamaño, las bandas menores de 200 bp fueron purificadas y secuenciadas directamente (Fig. 38), mientras que las de mayor tamaño fueron clonadas para su posterior secuenciación.

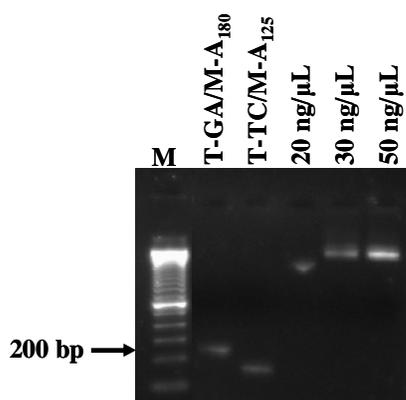


Figura 38. Purificación y cuantificación de fragmentos diferenciales menores de 200 bp para secuenciación. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.0%. La cuantificación se llevó a cabo por comparación con diferentes concentraciones de fago λ . M: 100 bp DNA Ladder.

Clonación de los fragmentos purificados cDNA-AFLP. Las bandas diferenciales de 460 (aislado 9272), 500 (aislado 6578) y 510 (aislado 21363) bp amplificadas con los oligonucleótidos T-GA/M-C; así como las bandas de 400 (aislados 6578 y 8571) bp generadas con los oligonucleótidos T-TC/M-C fueron ligados al vector de clonación pGEM®-T Easy vector (Fig. 39) y transformados en células competentes de *E. coli* JM109. La selección de las clonas recombinantes se hizo con base en el color de las colonias en el medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal, en donde las clonas que desarrollaron una pigmentación azul no tienen ningún fragmento integrado, por lo que conservan intacta la secuencia de la β -galactosidasa y por consecuencia tienen la capacidad de degradar la X-Gal presente en el medio (Fig. 40).

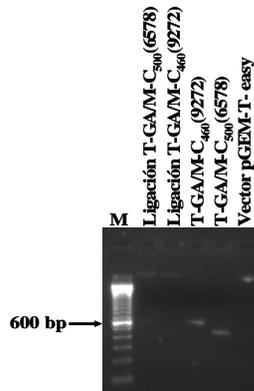


Figura 39. Ligación de los fragmentos T-GA/M-C₅₀₀ (aislado 6578) y T-GA/M-C₄₆₀ (aislado 9272) al vector pGEM-T-easy para su transformación en *E. coli* JM109. La electroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa al 1.5%. M: 100 bp DNA Ladder.



Figura 40. Selección de clonas recombinantes con el fragmento de 500 bp seleccionado del patrón polimórfico de cDNA-AFLP del aislado 6578, con la combinación T-GA/M-C. Las clonas crecieron en medio LB/ampicilina/X-Gal/IPTG.

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia. Para verificar que las clonas seleccionadas contenían las bandas purificadas a partir del cDNA-AFLP de aislados de *A. fumigatus*, se llevó a cabo una PCR en colonia utilizando oligonucleótidos universales, pUC/M13 izquierdo y derecho, como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados de la PCR revelaron las clonas que contenían los fragmentos deseados (Fig. 41). El tamaño observado en la figura es 250 bp mayor al observado en la reamplificación, debido a que se amplifica tanto el fragmento integrado como una parte del vector, lo que incrementa el tamaño de los fragmentos clonados.

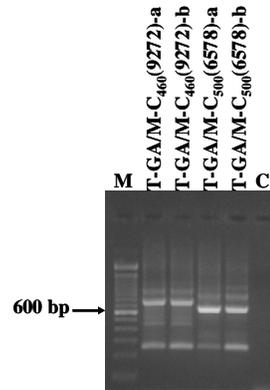


Figura 41. Caracterización de las clonas por PCR con oligonucleótidos universales pUC/M13. La figura muestra la amplificación de cuatro clonas, T-GA/M-C₄₆₀ (aislado 9272)-a y b y T-GA/M-C₅₀₀ (aislado 6578)-a y b, donde se observa la amplificación de fragmentos de 460 y 500 bp que corresponden a los fragmentos de 700 y 750 bp respectivamente (aumentó el tamaño en 250 bp por la amplificación de los extremos del vector). M: 100 bp DNA Ladder.

Purificación de plásmidos por método enzimático. De las clonas caracterizadas como positivas para los fragmentos de interés T-GA/M-C₅₀₀ (aislado 6578), T-GA/M-C₄₆₀ (aislado 9272), T-GA/M-C₅₁₀ (aislado 21363), T-TC/M-C₄₀₀ (aislado 8571) y T-TC/M-C₄₀₀ (aislado 8571) se purificaron sus plásmidos por el método enzimático, como se encuentra especificado en la metodología, y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, observando en todos los casos una banda mayor de 3015 bp, que es el tamaño del vector de clonación (Fig. 42).

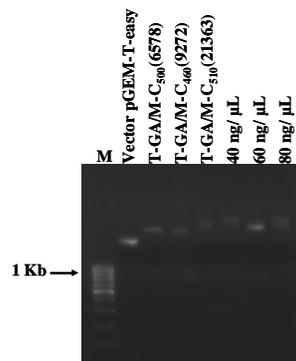


Figura 42. Purificación y cuantificación de los plásmidos de las clonas T-GA/M-C₅₀₀ (aislado 6578), T-GA/M-C₄₆₀ (aislado 9272), T-GA/M-C₅₁₀ (aislado 21363). La cuantificación de los plásmidos se realizó con base en la comparación con diferentes concentraciones de fago lambda (40, 60, 80 ng/µL). La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.0%. Vector: testigo sin inserto. M: 100 bp DNA Ladder.

El resto de las bandas diferenciales detectadas por cDNA-AFLP con un tamaño ≤ 400 bp fueron secuenciadas directamente con los oligonucleótidos que las generaron, ya que debido a su tamaño resulta difícil la clonación (Hernández *et al.*, 1999). Los fragmentos secuenciados directamente fueron nombrados siguiendo el mismo criterio para las clonas.

Secuenciación y comparación en GenBank. Las secuencias de los fragmentos diferenciales seleccionados de los patrones polimórficos, obtenidos por cDNA-AFLP, se compararon con todas las secuencias del GenBank, con la finalidad de determinar si las secuencias corresponden a fragmentos de genes asociados a resistencia a azoles en *A. fumigatus* o en otros hongos patógenos que también han desarrollado resistencia a ITC. Los resultados del alineamiento de las 17 secuencias de las bandas diferenciales se describen en la Tabla 7.

Diseño de oligonucleótidos. Con base en la secuencia de las clonas se diseñaron nueve pares de oligonucleótidos considerando los parámetros referidos en Materiales y Métodos, y se describen en la Tabla 7.

Análisis de la especificidad de los marcadores SCAR de resistencia a ITC. Los nueve pares de oligonucleótidos, diseñados con base en la secuencia de las bandas diferenciales seleccionadas, detectaron por PCR tanto el DNA de los aislados de *A. fumigatus* resistentes a ITC como el de los sensibles, mostrando en todos los casos el tamaño esperado de los amplicones (Fig. 43-44). No obstante, no hubo amplificación de la banda de interés en aislados cuando se probó el DNA de otros hongos son resistentes a ITC, *A. lentulus*, *C. albicans* y *C. glabrata*.

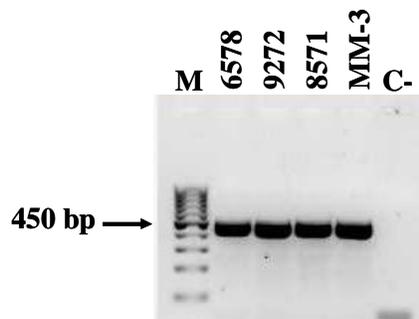


Figura 43. Amplificación del fragmento de 450 bp con los oligonucleótidos T-GA/M-C₄₅₀F y T-GA/M-C₄₅₀R con DNA de aislados de *A. fumigatus* resistentes (6578, 9272, 8571) y sensibles (MM-3) a ITC. M: 100 bp DNA Ladder. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.0%. C-: Testigo negativo.

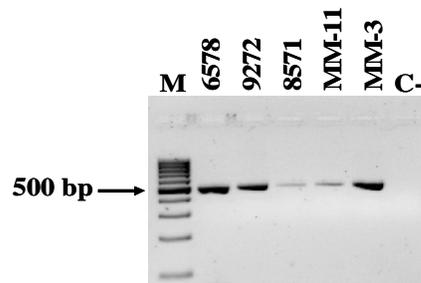


Figura 44. Amplificación del fragmento de 488 bp con los oligonucleótidos T-GA/M-C₄₈₈F y T-GA/M-C₄₈₈R con DNA de aislados de *A. fumigatus* resistentes (6578, 9272, 8571) y sensibles (MM-11, MM-3) a ITC. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.0%. M: 100 bp DNA Ladder. C-: Testigo negativo.

Tabla 7. Resumen de los marcadores SCAR obtenidos por cDNA-AFLP

Combinación de oligonucleótidos	Tamaño de la banda diferencial	Aislados resistentes que presentan la banda diferencial	Antifúngico	Similitud	Oligonucleótidos diseñados	Especificidad
TGA/MC	510 bp	21363	VCZ	15% con una proteína putativa de <i>A. fumigatus</i> Af293	Af120(F) 5'-CGAGAGGAAGCAATCGAC-3' Af120(R) 5'-CCCGACTGTCATATCATTTC-3'	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
TGA/MC	500 bp	78	ITC	17% con una ATPasa N/K putativa de <i>A. fumigatus</i> Af293 y <i>N. fischeri</i> NRRL181, además 16% con una proteína hipotética de <i>A. fumigatus</i> Af293	T-GA/M-C ₄₈₈ F 5'-GCCTCCTTCTCGACCATCA-3' con una T _m =65.6 °C y T-GA/M-C ₄₈₈ R 5'-CTGGCTCATTCATCGCGT-3' con una T _m =65.2 °C que amplifican un fragmento de 488 bp.	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
TGA/MC	460 bp	9272	ITC	69% con un represor transcripcional TupA/RocA de <i>A. fumigatus</i> Af293 y 54% con una proteína hipotética de <i>A. nidulans</i> FGSC	T-GA/M-C ₄₅₀ F 5'-GATGGACACTGGGTCATGAGC-3' con una T _m =67 °C y T-GA/M-C ₄₅₀ R 5'-AATCCGAAGCTGCGATGG-3' con una T _m =66.3 °C que amplifican un fragmento de 450 bp;	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
TGA/MA	370 bp	6578, 9272	ITC	13% con un transportador MFS y proteínas hipotéticas de <i>A. fumigatus</i> Af293	TGA-MA6578(F) 5'-CGAGAGGAAGCAATCGAC-3'	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>

					TGA-MA6578(R) 5'- CCCGACTGTCATATCATTT C-3'	
TGA/MA	250 bp	MM-11 10s	ITC	100% con una histidin fosfatasa ácida putativa de <i>A. fumigatus</i> Af293 y una homología entre 7 y 13% con un transportador MFS, una GTPasa transmembranal, una GABA proteasa y proteínas hipotéticas de <i>A. fumigatus</i> Af293.	TGA-MA ₁₉₁ (F) 5'- GATTTGAGCCGTTTCATTG -3' TGA-MA ₁₉₁ (R) 5'- ACGATGAGTCCTGACCGA -3' 191 bp	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A.</i> <i>fumigatus</i>
TGA/MA	180 bp	MM-11 10s	ITC	No mostró homología con ninguna de las secuencias depositadas en el Genbank	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
TGA/MA	300 bp	6578, 9272	ITC	24% con una proteína hipotética de <i>A. fumigatus</i> Af293.	Af187(F) 5'- GAAGTCGGAGATCCTGAC C -3' Af187(R) 5'- GCGATCGTGAGAAGAGAT G-3'	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A.</i> <i>fumigatus</i>
TGA/MA	160 bp	6578, 9272	ITC	92% con una proteína HLH DNA binding domain de <i>A. fumigatus</i> Af293 y <i>N. fischeri</i> NRRL 181, y 50% con la misma proteína de <i>A.</i> <i>niger</i> CBS 513.88	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
TGA/MA	370 bp	MM-11 10s	ITC	14% con una proteína hipotética de <i>A. fumigatus</i> Af293.	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	

TGA/MA	180 bp	6578, 9272	ITC	90% con una proteína HLH DNA binding domain de <i>A. fumigatus</i> Af293 y <i>N. fischeri</i> NRRL 181.	Afl 12(F) 5'- CGTCTGAATGTTGACACC C -3' Afl 12(R) 5'- TAACTCCAGCGCATGAGC -3'	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
TGA/MA	160 bp	MM-11 10s	ITC	45% con un factor de elongación EF-1 subunidad alfa de <i>A. fumigatus</i> Af293 y de <i>N. fischeri</i> NRRL 181; 44% con la misma proteína de <i>A. nidulans</i> FGSC.	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
TTC/MC	270 bp	6578	ITC	89% con una secuencia parcial del gen 28S de <i>A. fumigatus</i> y <i>Penicillium</i> sp.	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
TTC/MC	180 bp	9272	ITC	58% con una proteína hipotética conservada de <i>A. fumigatus</i> Af293, y 10-18% con la glicosil transferasa, alfa 1,2 manosiltransferasa, isocitrato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa de la misma cepa.	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
TTC/MC	400 bp	8571	ITC	95% con un factor de transcripción (Ace1) putativo de <i>A. fumigatus</i> Af293 y 70% con un factor de transcripción (Ace1) de <i>A. niger</i> .	Afl 15(F) 5'- AATATCCTCATAGCCGCC -3' Afl 15(R) 5'- TGACGATGAGTCCTGACC -3'	Detectan aislados sensibles y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
TTC/MC	270 bp	8571	ITC	88% con una proteína hipotética	Afl 14(F) 5'-	Detectan aislados sensibles

				conservada de <i>A. fumigatus</i> Af293 y <i>N. fischeri</i> NRRL 181; 87% con una reductasa de <i>A. clavatus</i> NRRL 1.	CATACATACCCGTAAATC CG -3' Afl 14(R) 5'- CACTTAAGTCAATTCCAC CG-3'	y resistentes a ITC de <i>A. fumigatus</i>
TTC/MA	185 bp	9272	ITC	64% con una proteína conservada hipotética de <i>A. fumigatus</i> Af293, y 9-15% con otras proteínas de la misma cepa, como una glicosil transferasa, chaperona Hsp70, citocromo P450 monooxigenasa putativa, alcohol deshidrogenasa y amino oxidasa	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	
TTC/MA	125 bp	9272	ITC	No mostró homología con ninguna secuencia de la base de datos.	No se consiguió diseño de oligonucleótidos por el tamaño del fragmento	

La palabra mutantes se refiere al aislado MM-11 de *A. fumigatus* que fue expuesto a luz UV durante 10, 30, 50, 70 y 90 s para transformarlo en resistente a ITC.

DISCUSIÓN

El incremento en la incidencia de la AI representa un grave problema para el manejo de los pacientes que padecen la enfermedad, debido a ciertas deficiencias que impiden el establecimiento del diagnóstico y tratamiento oportunos.

A nivel diagnóstico, el método microbiológico empleado para el aislamiento de *A. fumigatus*, a partir de muestras biológicas de pacientes inmunosuprimidos, tiene el inconveniente de no diferenciar entre colonización, invasión y contaminación, lo que hace necesario el uso de pruebas confirmatorias como las inmunológicas; sin embargo, éstas pueden presentar resultados falsos-positivos debido a reacción cruzada con otros hongos patógenos, lo que genera un diagnóstico erróneo. A nivel terapéutico, el uso incontrolado de los antifúngicos en tratamientos profilácticos o durante tiempo prolongado ha propiciado el desarrollo de resistencia a los antimicóticos más utilizados, entre éstos el ITC, lo que a su vez puede provocar fallas terapéuticas. Aunque hay métodos para evaluar la susceptibilidad de los aislados de *A. fumigatus* frente a los antifúngicos, no se han definido claramente los puntos de corte, por lo que no es fácil elegir el tratamiento adecuado para cada paciente. Actualmente, para cubrir estas limitaciones, en varios países se ha recurrido al uso de marcadores moleculares para identificar al patógeno o su resistencia a los antifúngicos, los cuales son detectados a través de diferentes técnicas, como la PCR.

En MX, aunado a las limitaciones de los métodos diagnósticos y terapéuticos convencionales, el uso de marcadores moleculares aún no está implementado en la rutina de los laboratorios intrahospitalarios, porque a pesar de que se han reportado en la literatura, hace falta que los marcadores sean validados y estandarizados para asegurar que los resultados que se obtengan en cualquier laboratorio sean reproducibles. Por ello, para cubrir estas deficiencias en nuestro país, en este trabajo planteamos la obtención de marcadores moleculares para identificar aislados de *A. fumigatus* y marcadores que identifiquen resistencia a ITC, a partir de la comparación de los patrones polimórficos de aislados de *A. fumigatus*, sensibles y resistentes a ITC, para detectar, por un lado bandas comunes en todos los aislados para el marcador de identificación, y por otro lado, bandas diferenciales entre aislados sensibles y resistentes a ITC para el marcador de resistencia a dicho antimicótico.

En este trabajo utilizamos aislados caracterizados como *A. fumigatus* procedentes de diferentes áreas geográficas, para estar seguros de que estos aislados correspondían verdaderamente a la especie *A. fumigatus* se llevó a cabo su

caracterización fenotípica. En la caracterización fenotípica no se encontraron datos diferentes a los reportados para la especie; no obstante, destacan observaciones interesantes relativas al tamaño de las vesículas de las cabezas aspergulares, termotolerancia y tasa de crecimiento a 28, 37 y 48 °C. Los aislados de PE y AR, se distinguieron por presentar los conidios más grandes, aunque el rango encontrado concuerda con los reportados por Rinyu *et al.* (1995), quienes determinaron que el tamaño de los conidios de aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* procedentes de diferentes países era de 2.5-3.5 µm. En el tamaño de las vesículas de las cabezas aspergulares también se observaron diferencias asociadas al origen geográfico, donde los aislados de PE presentaron las vesículas más anchas. Otra característica fenotípica interesante fue la termotolerancia a 28 y 48 °C, donde todos los aislados estudiados crecieron a ambas temperaturas, sin embargo, los aislados de PE presentaron la mayor tasa de crecimiento a 48 °C. Además, todos los aislados estudiados crecieron a 48 °C, lo cual es una característica fenotípica que puede ser usada para distinguir *A. fumigatus* de otras especies, como *A. lentulus*. La termotolerancia y tasa de crecimiento han sido propuestos como factores de virulencia (Araujo and Rodrigues, 2004; Bhabhra and Askew, 2005; Rhodes, 2006), por lo que es muy probable que los aislados de PE, dadas sus características fenotípicas, sean más virulentos que los de AR, MX y FR. En otros hongos también se ha observado que las cepas virulentas presentan características fenotípicas particulares que los diferencian de los menos virulentos. En *H. capsulatum* la velocidad de transición dimórfica a 37 °C es un factor determinante en la patogenicidad de tres cepas estudiadas con diferente grado de virulencia, ya que la de mayor virulencia se transforma a la fase levaduriforme (virulenta) más rápidamente (Keath *et al.*, 1989). En otros patógenos humanos también se han observado diferencias fenotípicas asociadas a áreas geográficas, por ejemplo, en la caracterización fenotípica y genotípica de aislados de *Sporothrix schenckii* procedentes de MX, Colombia (CO) y Guatemala (GT), se observó que los aislados de CO fueron termorresistentes y presentaron conidios más grandes que los de MX y GT. Además, la caracterización genotípica por RAPD-PCR demostró que dichos aislados se agrupan de acuerdo a su origen geográfico (Mesa *et al.*, 2002). Asimismo, los autores sugieren que estas características particulares en los aislados de CO tienen relación con la forma clínica de la enfermedad, puesto que en CO predomina la forma fija de la esporotricosis.

Debido a que los aislados procedentes de PE presentaron características diferentes al resto de los aislados estudiados, se evaluó la sensibilidad a los antifúngicos

AMB, ITC y VRC, ya que algunas especies nuevas de este hongo, como es el caso de *A. lentulus* presentan una asociación entre la resistencia a antifúngicos y esporulación lenta (Balajee *et al.*, 2004). Sin embargo, no se encontró tal asociación en el grupo de PE y sólo en los de AR se detectaron algunos aislados resistentes, por lo que la resistencia a antifúngicos no mostró ninguna relación con el origen geográfico, ni con las otras características fenotípicas (tamaño de conidios y termotolerancia) (Frías De León *et al.*, 2011). Por otro lado, el número de aislados resistentes detectados (cuatro) fue bajo, probablemente, debido a que éstos son primoaislamientos.

Una vez caracterizados los aislados de *A. fumigatus*, se procedió a la obtención de marcadores SCAR para la identificación del hongo, utilizando la técnica de AFLP, que además de ser una herramienta molecular que permite estudiar el polimorfismo del DNA en organismos fúngicos, nos permitió obtener marcadores SCAR. El marcador SCAR E-AA/M-CAC_{210(Af)} se diseñó con fines diagnóstico y epidemiológico, a partir de una banda repetitiva observada en el perfil de AFLP de los aislados de *A. fumigatus*. No obstante que existen numerosos marcadores moleculares para la identificación de *A. fumigatus*, se justifica la búsqueda de nuevos marcadores debido a que los existentes presentan poca sensibilidad o especificidad, escasa reproducibilidad, elevado costo o laboriosidad de las metodologías empleadas, pero quizá la razón más importante es la obtención de marcadores con amplio espectro de reconocimiento, debido a la diversidad genética que existe entre los aislados de *A. fumigatus* (Neuveglise *et al.*, 1996; Varga, 2003; Bain *et al.*, 2007; Hurst *et al.*, 2009). Dentro de los marcadores moleculares reportados, algunos se han obtenido a partir de genes ribosomales (Kami *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2003; Rantakokko-Jalava *et al.*, 2003; Spiess *et al.*, 2003; Buitrago *et al.*, 2005; Scotter and Chambers, 2005; Rickerts *et al.*, 2006), cuya naturaleza conservada dentro del reino de los hongos puede conducir a resultados inespecíficos con otros aislados fúngicos. En relación con las sondas diseñadas para emplearse en metodologías como qPCR en tiempo real, éstas han mostrado buenos resultados (Suarez *et al.*, 2008; Walsh *et al.*, 2011; Bernal-Martínez *et al.*, 2011; Luong *et al.*, 2011), pero su utilidad en laboratorios intrahospitalarios se limita debido a su complejidad, elevado costo y falta de protocolos estandarizados para llevarlos a cabo.

La especificidad del SCAR E-AA/M-CAC_{210(Af)} fue del 100% con aislados de *A. fumigatus* procedentes de diferente origen geográfico, de la misma manera cuando se probaron aislados de *P. brasiliensis*, *C. immitis*, *C. posadasii*, *S. schenckii*, *A. niger*, *A. lentulus*, *A. flavus*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *B. dermatitidis*,

Malbranchea sp., *C. carmichaelli*. Además, estos marcadores SCAR para la identificación de *A. fumigatus* mostraron buena sensibilidad (10 fg). Con base en los resultados obtenidos, creemos que el SCAR E-AA/M-CAC_{210(Af)} es candidato ideal para la identificación del hongo *A. fumigatus* en muestras clínicas y ambientales. La utilización de estos marcadores nos permitirá aumentar el conocimiento sobre la distribución endémica y epidémica de la aspergilosis en el país, así como definir no sólo sus formas clínicas en las áreas donde predomina la enfermedad, sino también sobre las fuentes de infección y zonas de alto riesgo para los pacientes, y la distribución del hongo en el ambiente natural. Sin embargo, para su aplicación en el diagnóstico de la AI, será necesaria una validación con muestras clínicas de pacientes con aspergilosis probable y confirmada. Asimismo, será conveniente determinar su utilidad, comparando los resultados del marcador en muestras clínicas, con los obtenidos con otro tipo de pruebas, como la detección de galactomanano, la cual ha demostrado ser hasta la fecha, una de las más específicas para el diagnóstico de la AI. No obstante la gran especificidad de esta prueba, el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas se justifica al considerar que el manejo de los pacientes con AI depende de manera importante de la identificación del agente causal.

Por otro lado, ante la necesidad de conocer la susceptibilidad a antifúngicos de los aislados clínicos de *A. fumigatus*, en este trabajo también se buscaron marcadores que identifiquen resistencia a ITC, debido a que el fenómeno de la resistencia en *A. fumigatus* ha sido reportado como emergente en pacientes con aspergilosis pulmonar crónica y aspergiloma pulmonar durante la terapia con azoles, además, se ha encontrado que dicha resistencia puede generarse en el ambiente, debido a la exposición del hongo a una gran cantidad de antifúngicos que son asperjados en el campo para combatir diversas plagas. La consideración de los reportes de resistencia a azoles en el ambiente es de gran importancia porque implica que las personas susceptibles a la AI, pueden estar expuestas a aislados altamente resistentes a los fármacos de elección, lo que sin lugar a dudas dificultará su manejo y probablemente repercutirá también en la tasa de mortalidad de la AI.

En otros países, los esfuerzos que, hasta la fecha, se han realizado con la finalidad de determinar la susceptibilidad de los aislados clínicos de *A. fumigatus* para proporcionar un tratamiento eficaz a los pacientes con AI, han estado dirigidos hacia la detección de mutaciones puntuales en el gen *cyp51A*; sin embargo, como se demuestra en diversos trabajos, no se ha encontrado un patrón de mutación constante, por lo que la

detección de mutaciones no es considerado un buen marcador. Incluso, recientemente Escribano *et al.* (2011), han confirmado que las mutaciones no son buen indicativo de resistencia, pues reportan la existencia de aislados sensibles a los azoles que presentan las mutaciones en *cyp51A*, esto indica que las mutaciones no son el único mecanismo de resistencia a los azoles. Por lo que para ampliar el espectro de detección de los marcadores moleculares que detecten resistencia a antifúngicos, es necesario recurrir a otras estrategias que no estén dirigidas hacia la detección de una mutación específica. Una alternativa son los marcadores SCAR, ya que por medio de éstos es posible obtener marcadores dirigidos hacia diferentes mecanismos de resistencia al antifúngico estudiado, ya que se pueden detectar diferencias en los patrones polimórficos entre los aislados sensibles y resistentes. Por lo que en este trabajo para obtener este tipo de marcadores, comparamos los patrones polimórficos de aislados de *A. fumigatus*, sensibles y resistentes a ITC, para detectar bandas correspondientes a genes o segmentos de DNA que pudieran estar participando en el fenotipo resistente de los aislados estudiados. Cabe destacar que, dado que en *A. fumigatus* se ha reportado la reversión de la resistencia a antifúngicos como consecuencia de múltiples resiembras en ausencia del antifúngico (da Silva Ferreira *et al.*, 2004), decidimos incluir aislados mutantes (MM-11 10s, MM-11 30s, MM-11 50s, MM-11 70s, MM-11 90s) como testigos de resistencia a ITC.

En otros organismos, esta estrategia ha resultado excelente para obtener marcadores SCAR de resistencia en otros organismos, en los que ésta se asocia a la presencia de ciertos genes específicos de resistencia, como es el caso de las plantas (Miao *et al.*, 2009); sin embargo, en *A. fumigatus*, el desarrollo del fenotipo resistente es multifactorial, y no está confinado a la presencia o ausencia de genes, como ocurre en otros organismos, lo que implica la necesidad de explorar todos los mecanismos de resistencia para encontrar el marcador molecular o los marcadores idóneos para detectar resistencia. Uno de los mecanismos que aún no se ha explotado como marcador, es la sobreexpresión de bombas de eflujo e interesantemente, en este trabajo, encontramos que algunas de las secuencias de las bandas diferenciales presentes en los aislados resistentes, tienen similitud con el gen que codifica para un transportador ABC y con el gen que codifica para una bomba de flujo (AtrD), de los cuales se ha reportado que su sobreexpresión, en *A. fumigatus* y *A. nidulans*, respectivamente, está relacionada con el desarrollo de resistencia a ITC y otros fármacos (Andrade *et al.*, 2000), lo que es relevante para la obtención del marcador de resistencia a ITC. No obstante que los marcadores moleculares para detectar aislados de *A. fumigatus* resistentes a ITC fueron

diseñados con base en la secuencia de bandas diferenciales, reveladas mediante AFLP o cDNA-AFLP, ninguno logró discriminar entre aislados con diferentes fenotipos. En el caso de los SCAR diseñados a partir de AFLP, es probable que las bandas seleccionadas pudieran estar presentes también en los aislados sensibles, pero en una concentración mínima, por lo que no se lograron visualizar. En relación con las bandas diferenciales seleccionadas por cDNA-AFLP, éstas indicaban la sobreexpresión de genes en los aislados resistentes, por lo que los oligonucleótidos diseñados con base en estas secuencias detectaron tanto sensibles como resistentes. Es importante mencionar que, quizá las limitantes del trabajo fueron, por un lado, el escaso número de aislados resistentes a ITC, lo cual impide asegurar que las bandas diferenciales que observamos sea una característica constante en aislados de *A. fumigatus* resistentes a ITC; y por otro lado, las combinaciones de oligonucleótidos, ya que en algunas no se observaron bandas diferenciales, por lo que quizá otras combinaciones diferentes permitan encontrar la banda diferencial que genere el marcador de resistencia a ITC, ya que en muchos trabajos involucran en el estudio un mayor número de aislados (Miao *et al.*, 2009).

Por lo que los marcadores moleculares de resistencia, diseñados con base en las bandas diferenciales reveladas por cDNA-AFLP, aun pueden ser útiles en la detección de resistencia, pero mediante otro tipo de técnicas como la RT-PCR (PCR con Transcriptasa Reversa), pero la utilización de esta técnica es más laboriosa que una PCR convencional.

CONCLUSIONES

Los marcadores SCAR para identificación de *A. fumigatus* resultaron específicos y sensibles, por lo que después de validarlos con muestras clínicas y ambientales, podrán ser aplicados en el diagnóstico de la AI y orientar en el tratamiento de los pacientes, ya que logra diferenciar entre *A. lentulus* y *A. fumigatus*.

Asimismo, los marcadores SCAR, diseñados con base en las secuencias de genes que se sobreexpresaron en los aislados de *A. fumigatus* resistentes a ITC (cDNA-AFLP), son una herramienta importante para detectar resistencia a ITC, mediante la utilización de técnicas adecuadas que revelen la sobreexpresión de estos marcadores, como la RT-PCR.

Por otro lado, los marcadores moleculares que se obtuvieron a través de AFLP y cDNA-AFLP, que no detectaron resistencia al antifúngico, serán de gran utilidad en estudios de tipificación del hongo, así como los marcadores que presentaron homología

con genes específicos de *A. fumigatus*, servirán para estudiar otros mecanismos de resistencia a antifúngicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J. 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol*; 27:155-182.
2. Abbasi PA, Miller SA, Meulia T, Hoiting HA, Kim J. 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes using molecular markers. *Appl Environ Microbiol*; 65: 5421-5426.
3. Alanio A, Sitterle E, Liance M. 2010. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother*; 66:371–374.
4. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, García-Effron G. 2008. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids*; 73:339-347.
5. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Res*; 25:3389-3402.
6. Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Peery RB, Skatrud PL, De Waard MA. 2000. The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol Gen Genet*; 263:966-977.
7. Ansorg R, Heintschel E, Rath PM. 1994. *Aspergillus* antigenemia compared to antigenemia in bone marrow transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 13:582-589.
8. Araujo R, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2007. Susceptibility of environmental versus clinical strains of pathogenic *Aspergillus*. *Int J Antimicrob Agents*; 29:108-111.
9. Araujo R, Rodrigues AG. 2004. Variability of germinative potencial among pathogenic species of *Aspergillus*. *J Clin Microbiol*; 42:4335-4337.
10. Bain JM, Tavanti A, Davidson AD. 2007. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*; 45:1469–1477.
11. Balashov SV, Gardiner R, Park S, Perlin DS. 2005. Rapid, high-throughput, multiplex, real-time PCR for identification of mutations in the *cyp51A* gene of *Aspergillus fumigatus* that confer resistance to itraconazole. *J Clin Microbiol*; 43:214-222.
12. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D and Marr KA. 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*; 4:625-

632.

13. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. 2006. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryotic Cell*; 5:1705–1712.
14. Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. 2007a. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol*; 45:475-490.
15. Balajee SA, Tay ST, Lasker BA, Hurst SF, Rooney AP. Characterization of a novel gene strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. *Eukaryot Cell*; 2007b; 6:1392-1399.
16. Balajee SA, Weaver M, Imhof A, Gribskov J, Marr KA. 2004. *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:1197-1203.
17. Baskova L, Landlinger C, Preuner S, Lion T. 2007. The Pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. *J Med Microbiol*; 56:1167-1173.
18. Bernal-Martínez L, Gago S, Buitrago MJ, Gómez-López A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2011. Analysis of performance of a PCR-based assay to detect DNA of *Aspergillus fumigatus* in whole blood and serum: a comparative study with clinical samples. *J Clin Microbiol*; 49:3596-3599.
19. Bertout S, Renaud F, Barton R, Symoens F, Burnod J, Piens MA. 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.
20. Bhabhra R, Askew DS. 2005. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Med Mycol*; 43:S87-S93.
21. Bow EJ. 2008. Considerations in the approach to invasive fungal infection in patients with haematological malignancies. *Br J Haematol*; 140:133–152.
22. Buitrago MJ, Gómez-López A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL y Cuenca-Estrella M. 2005. Detección de *Aspergillus* spp. mediante PCR en tiempo real en un modelo murino de infección pulmonar. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 23:464-468.
23. Calderón C, Ward E, Freeman J, McCartney A. 2002. Detection of airborne fungal spores sampled by rotating arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *J Aerosol Sci*; 33:283-296.

24. Camps SMT, van der Linden JWM, Li Y, Kuijper E, van Dissel JT, Verweij PE, Melchers WJG. 2011. Rapid induction of multiple resistance mechanism in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a cause study and review of the literature. *Antimicrob. Agents Chemother*, doi:10.1128/AAC.05088-11.
25. Cano-Ramírez C. 2003. Tesis de Maestría. Caracterización genotípica de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* por medio de RAPD-PCR y determinación *in vitro* de su virulencia en langosta (Orthoptera: Acrididae) Facultad de Ciencias, UNAM.
26. Castrillo LA, Vandenberg JD, Wraight SP. 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *J Invertebr Pathol*; 82:75-83.
27. Chowdhary A, Kathuria S, Randhawa HS, Gaur SN, Klaassen CH, Meis JF. 2012. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *J Antimicrob Chemother*; 67:362-366.
28. Chryssanthou E. 1997. *In vitro* susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B acquired resistance to itraconazole. *Scand J Infect Dis*; 29:509–512.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 2nd ed. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
30. Corné H, Klaassen W, de Valk HA, Curfs-Breuker IM, Meis JF. 2010. Novel mixed-format real-time PCR assay to detect mutations conferring resistance to triazoles in *Aspergillus fumigatus* and prevalence of multi-triazole resistance among clinical isolates in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother*; 65:901–905.
31. Cowen LE, Anderson JB, Kohn LM. 2002. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*; 56:139-165.
32. Cuenca-Estrella MT, Díaz-Guerra TM, Mellado E, Monzon A, Rodríguez-Tudela. 1999. Comparative *in vitro* activity of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* species from Spain. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis*; 18:432-435.
33. da Silva Ferreira ME, Capellaro JL, Reis Marques E, Malavazi I, Perlin D, Park S, Anderson JB, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA, Goldman MHS,

- Goldman GH. 2004. In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:4405-4413.
34. Denning DW, Venkateswarin K, Oakley L. 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 41:1364-1368.
35. Díaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. 2003. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 47:1120-1124.
36. Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Nava Ramírez O. 2009. Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*; 104:1-7.
37. Escribano P, Recio S, Peláez T, Bouza E, Guinea J. 2011. *Aspergillus fumigatus* strains with mutations in the *cyp51A* gene do not always show phenotypic resistance to itraconazole, voriconazole, or posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother*; 55:2460-2462.
38. Frías De León MG, Arenas López G, Taylor ML, Acosta Altamirano G, Reyes-Montes MR. 2012. Development of specific-SCAR markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol*. 50:673-679.
39. Frías-De-León MG, Zavala-Ramírez M, Cordoba S, Zúñiga G, Duarte-Escalante E, Perez-Torres A, Zepeda-Rodriguez A, López-Martínez I, Buitrago MJ, Reyes-Montes MR. 2011. Phenotypic characteristics of isolates of *Aspergillus* section *Fumigati* from different geographic origins and their relationships with genotypic characteristics. *BMC Infect Dis*; 11:116.
40. Garcia-Effron G, Dilger A, Alcazar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS. 2008. Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*; 46:1200-1206.
41. Goodman-Gilman A, Rall TW, Nies AS y Taylor P. 1998. Las bases farmacológicas de la terapéutica, pg. 1248-1251. 9 ed. McGraw-Hill Interamericana, México.
42. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. 1996. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect*; 33:23-32.

43. Güssow D, Clackson T. 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase reaction. *Nucleic Acids Res*; 17:4000.
44. Harari S. 1999. Current strategies in the treatment of invasive *Aspergillus* infections in immunocompromised patients. *Drugs*; 58:621-31.
45. 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.
46. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347:2080-2081.
47. Hernández P, Martín A, Dorado G. 1999. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. *Mol Breeding*; 5:245–253.
48. Hopwood V, Johnson EM, Cornish JM, Foot ABM, Evans EGV, Warnock DW. 1995. Use of the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Pathol*; 48:210-213.
49. Howard SJ, Arendrup MC. 2011. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol*; 49 Suppl 1:S90-S95.
50. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ. 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis*; 15:1068–1076.
51. Hurst SF, Kidd SE, Morrissey CO. 2009. Interlaboratory reproducibility of a single-locus sequence-based method for strain typing of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* ; 47:1562-1564.
52. Kami M, Fukui T, Ogawa S. 2001. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*; 33:1504–1512.
53. Keath EJ, Painter AA, Kobayashi G, Medoff G. 1989. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. *Infect Immun*; 57:1384-1390.
54. Kriengkauykiat J, Ito JI, Dadwa SS. 2011. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clin Epidemiol*; 3:175–191.
55. Lai CC, Tan CK, Huang YT, Shao PL, Hsueh PR. 2008. Current challenges in the management of invasive fungal infections. 14:77-85.

56. Latgé JP. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev; 12:310-350.
57. Latgé JP. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol; 9:382–389.
58. Luong ML, Clancy CJ, Vadnerkar A, Kwak EJ, Silveira FP, Wissel MC, Grantham KJ, Shields RK, Crespo M, Pilewski J, Toyoda Y, Kleiboeker SB, Pakstis D, Reddy SK, Walsh TJ, Nguyen MH. 2011. Comparison of an *Aspergillus* real-time polymerase chain reaction assay with galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in lung transplant recipients. Clin Infect Dis; 52:1218-1226.
59. Manavathu EK, Vazquez JA, Chandrasekar PH. 1999. Reduced susceptibility in laboratory-selected mutants of *Aspergillus fumigatus* to itraconazole due to decreased intracellular accumulation of the antifungal agent. Inter J Antimicrob Agents; 12:213–219.
60. Mellado E, García-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. 2004. Substitutions at methionine 220 in the 14 α -sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. Antimicrob Agents Chemother; 48:2747–2750.
61. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L. 2007. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. Antimicrob Agents Chemother; 51:1897–1904.
62. Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zúñiga G, Toriello C. 2002. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. J Clin Microbiol; 40:3004-3011.
63. Miao LE, Senyan Shou A, Jiayan Cai A, Fang Jiang A, Zhujun Zhu A, Hongbin Li. 2009. Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers Mol Biol Rep; 36:479–486.
64. Montgomery DC. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F.
65. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. 2010. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other Aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. Antimicrob Agents Chemother; 54:4545–4549.

66. Nascimento AM, Goldman GH, Park S, Marras SA, Delmas G, Oza U, Lolans K, Dudley MN, Mann PA, Perlin DS. 2003. Multiple Resistance Mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrobial Agents Chemother*; 47:1719-1726.
67. Neuveglise C, Sarfati J, Latge J, Paris S. 1996. Afut1, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. *Nucleic Acids Res*; 24:1428-1434.
68. Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V, Moghaddam A, Natarajan-Amé S, Fohrer C, *et al.* 2008. Factors associated with overall and attributable mortality in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*; 47:1176–1184.
69. Nowell JA, Parules JB: Preparation of experimental tissue for scanning electron microscopy. 1980, AMSO-HARE.
70. O’Sullivan CE, Kasai M, Francesconi A. 2003. Development and Validation of a Quantitative Real-Time PCR Assay using fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Aspergillus fumigatus* in experimental invasive pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*; 41:5676-5682.
71. Oshero N, Kontoyannis DP, Romans A, May GS. 2001. Resistant to itraconazole in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* is conferred by extra copies of the *A. nidulans* P-450 14-alpha-demethylase gene, *pdmA*. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:75–81.
72. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, Rinaldi MG, Stevens DA, Graybill JR. 2000. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. 13 *Aspergillus* Study Group. *Medicine (Baltimore)*. 79: 250-60.
73. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA. 2001. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis*; 33:1824-1833.
74. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, Diekema D. 2011. Use of Epidemiological Cutoff Values To Examine 9-Year Trends in Susceptibility of *Aspergillus* Species to the Triazoles. *J Clin Microbiol*; 49:586–590.
75. Rantakokko-Jalava, Laaksonen S, Issakainen J. 2003. Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol*; 41:4304-4311.

76. Rhodes JC. 2006. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. *Med. Mycol.* 44:S77-S81.
77. Rickerts V, Just-Nübling G, Konrad F. 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 25:8-13.
78. Ridell R: 1950. Permanent stained micological preparations obtained by slide culture. *Mycology*; 42:265-270.
79. Rinyu E, Varga J, Ferenczy L. 1995. Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*; 35:2567-275.
80. Saugier-Weber P, Devergie A, Sulahian A. 1993. Epidemiology and diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in bone marrow transplant patients: result of a 5 years retrospective study. *Bone Marrow Transplant*; 12: 121-124.
81. Scotter JM, Chambers ST. 2005. Comparison of galactomannan detection, PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, and real-time PCR for diagnosis of invasive Aspergillosis in a neutropenic rat model and effect of caspofungin acetate. *Clin Diagn Lab Immunol*; 12:1322-1327.
82. Serrano R, Gusmão L, Amorim A, Araujo R. 2011. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. *BMC Microbiology*; 11:82.
83. Slaven JW, Anderson MJ, Sanglard D, Dixon GK, Bille J, Roberts IS, Denning DW. 2002. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet Biol*; 36:199–206.
84. Snelders E, Huis RA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ. 2009 Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol*; 75:4053-4057.
85. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J. 2008. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*; 5 :e219.
86. Spiess B, Buchheidt D, Baust C. 2003. Development of a lightcycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol*; 41:1811-1818.
87. 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.

88. Treviño M, Rodríguez-Nóvoa S, Llovo J, García-Zabarte A, García-Riestra C, Regueiro BJ. 2003. Uso combinado de amplificación aleatoria de polimorfismo del ADN (RAPD) y reacción en cadena de la polimerasa (“Touch Down” PCR) en el estudio epidemiológico de *Aspergillus fumigatus*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21:472-476.
89. Varga J. 2003. Mating type gene homologues in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*; 149:816-819.
90. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJG. 2007. Multiple-triazoleresistant aspergillosis. *N Engl J Med*; 356:1481–1483.
91. Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJG. 2009. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis*; 9:789–795.
92. 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.
93. Vuylsteke M, Peleman JD, van Eijk MJ. 2007. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nat Protoc*; 2:1399–1413
94. Walsh TJ, Wissel MC, Grantham KJ, Petraitiene R, Petraitis V, Kasai M, Francesconi A, Cotton MP, Hughes JE, Greene L, Bacher JD, Manna P, Salomoni M, Kleiboeker SB, Reddy SK. 2011. Molecular detection and species-specific identification of medically important *Aspergillus* species by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*; 49:4150-4157.
95. Warnock D, Marks DI, Millar MR. 2000. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. *Br J Haematol*; 108:132–139.
96. Weber J, Díez J, Selosse M, Tagu D, Le Tacon F. 2002. SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations: Mycorrhiza; 12: 19-27.
97. Williams RH, Ward E, McCartney HA. 2001. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for the detection of airborne fungal spores. *Appl Environ Microbiol*; 67:2453-2459.
98. Wingard JR, Velas SV, Santos GW, Saral R. 1987. *Aspergillus* infections in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*; 2:175-181.
99. White TC, Marr KA, Bowden RA. 1998. Clinical, cellular, and molecular

- factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*; 11:382-402.
100. Wright MS, HK Clausen, TG Abrahamsen. 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.
 101. Xiao L, Madison V, Chau AS, Loebenberg D, Palermo RE, McNicholas PM. 2004. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob. Agents Chemother*; 48:568–574.
 102. Xu M, Huaracha E, Korban SS. 2001. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome*; 44:63-70.
 103. Xu M, Korban SS. 2003. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the *Vf* locus in apple genome. *Plant Mol Biol*; 50:803-818.
 104. Yaguchi T, Oiré Y, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K. 2007. Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *Jpn J Med Mycol*; 48:37-46.
 105. Zhao J, Kong K, Li R, Wang X, Wan Z, Wang D. 2001. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol*; 39:2261-2266.