



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**Tipificación molecular de aislados ambientales de  
*Aspergillus fumigatus* presentes en dos hospitales de la  
Ciudad de México**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**ÁLVAREZ AYALA LESLI SOFÍA**

DIRECTORA: **DRA. MARÍA GUADALUPE FRÍAS DE LEÓN**

ASESORA: **DRA. RAQUEL RETANA UGALDE**

México D.F., 02 de marzo del 2015



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.

---

---

**El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Epidemiología Molecular del Hospital Juárez de México y en la Unidad de Micología de la Facultad de Medicina, UNAM; bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Frías De León. El proyecto fue financiado por el programa PAPIIT-DGAPA (IN219212), UNAM y HJM 2088/12-C.**

---

---

## **Agradecimientos**

### **A las instituciones**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la formación académica, el apoyo, aprendizaje y porque más que mi escuela fue como mi segunda casa.

A la unidad de Micología del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo.

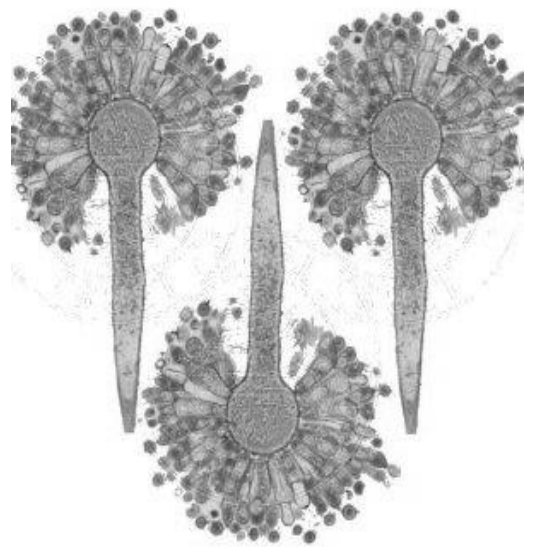
### **A las personas**

**Dra. María Guadalupe Frías De León** por la oportunidad de formar parte de este proyecto así como el apoyo, facilidades y asesoría brindada durante la realización de este trabajo.

**Dra. Rocío Reyes Montes** por el apoyo, facilidades y asesoría brindada para la realización de este trabajo.

**M. en C. Emmanuel Rosas de Paz** por el apoyo y asesoría brindada en el análisis bioinformático de este trabajo, así como en técnicas básicas de biología molecular.

**Dra. Esperanza Duarte Escalante** por la asesoría brindada en técnicas básicas de biología molecular para la realización de este trabajo.



---

---

## **Agradecimientos a título personal**

\*A los sinodales Q.F.B. **José Oscar González Moreno**, M. en C. **Araceli García del Valle**, Dra. **Raquel Retana Ugalde** y al Q.F.B. **Manuel Orduña Sánchez** por sus valiosas observaciones y comentarios.

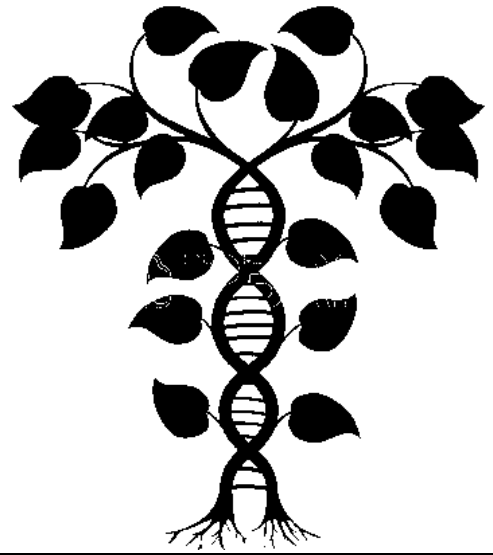
A todos mis profesores por todo el aprendizaje, formación académica y formación como persona.

A **Marcela Muñoz Calderón**, **Bruno Cuapio Chirino**, **Emmanuel Rosas de Paz** por el apoyo, complicidad y valiosa amistad brindada.

Al M. en C. **José Antonio Ramírez Bárcenas** por el apoyo técnico.

A la M. en C. **Laura Aguilar Vega** por el apoyo técnico en técnicas de biología molecular y su valiosa amistad.

A la laboratorista **Angélica Peña Becerril** por su apoyo, amistad y por la esterilización de material y preparación de medios de cultivo.



---

---

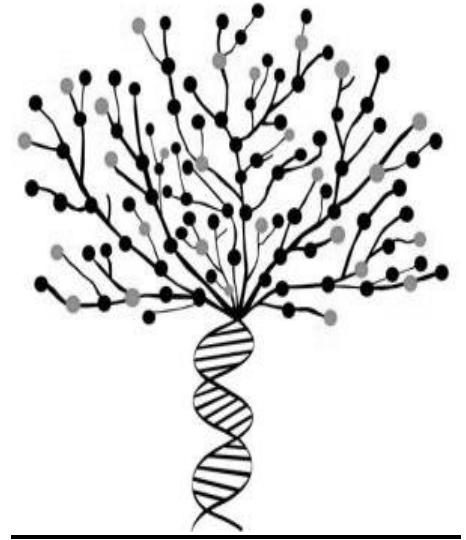
## Dedicatoria

A mis padres **Miguel Ángel Álvarez Torres** y **Raquel Ayala Flores** por el amor, tolerancia, apoyo, educación recibida y por permitirme crecer como persona, en fin no tengo palabras que cubran todo lo que siento y lo agradecida que estoy, GRACIAS.

A mis hermanos **Tania Álvarez Ayala** y **Miguel Álvarez Ayala** por la tolerancia, amor y buenos ratos de risas, GRACIAS.

A **Gustavo Alessandro Martínez Millán** por la tolerancia, apoyo, amor pero sobre todo por ser un compañero de vida incondicional, GRACIAS.

A **Charlin** y **Charlot** que aunque son pequeñas siempre me han dado buenos momentos y mucho amor.



---

---

*“Somos lo que hacemos día con día, de tal modo que la excelencia no es una virtud sino una costumbre” Aristóteles*

Q.F.B.

*“La agonía física, biológica, natural, de un cuerpo por hambre, sed o frío, dura poco, pero la agonía de un alma insatisfecha dura toda la vida”*

*Federico García Lorca*

	<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>1.</b>	RESUMEN	<b>1</b>
<b>2.</b>	INTRODUCCIÓN	<b>2</b>
<b>3.</b>	MARCO TEÓRICO	<b>3</b>
<b>3.1.</b>	Generalidades	<b>3</b>
<b>3.2.</b>	Identificación de <i>Aspergillus</i> spp.	<b>4</b>
<b>3.3.</b>	Calmodulina (CaM)	<b>4</b>
<b>3.4.</b>	Tipificación molecular	<b>5</b>
<b>3.5.</b>	Métodos de tipificación genotípica utilizados en aislados de <i>A. fumigatus</i>	<b>6</b>
<b>3.6.</b>	Microsatélites	<b>11</b>
<b>3.7.</b>	Método de tipificación utilizando el gen <i>CSP</i> que codifica una proteína de superficie celular	<b>11</b>
<b>4.</b>	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	<b>13</b>
<b>5.</b>	HIPÓTESIS	<b>14</b>
<b>6.</b>	OBJETIVOS	<b>14</b>
<b>7.</b>	MATERIALES Y MÉTODOS	<b>15</b>
<b>7.1.</b>	Aislados fúngicos	<b>15</b>
<b>7.2.</b>	Obtención de cultivos monospóricos	<b>17</b>
<b>7.3.</b>	Extracción de DNA	<b>18</b>
<b>7.4.</b>	Estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación de las secuencias parciales del gen <i>CaM</i>	<b>19</b>
<b>7.5.</b>	Estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación de las secuencias parciales del gen <i>CSP</i>	<b>20</b>
<b>7.6.</b>	Secuenciación de los productos de PCR	<b>21</b>
<b>7.7.</b>	Edición y análisis de secuencias	<b>21</b>
<b>7.8.</b>	Determinación de genotipo <i>CSP</i>	<b>21</b>
<b>7.9.</b>	Alineamiento múltiple	<b>22</b>
<b>7.10.</b>	Selección de modelo evolutivo	<b>23</b>
<b>7.11.</b>	Construcción de árbol filogenético	<b>23</b>
<b>8.</b>	RESULTADOS	<b>24</b>
<b>8.1.</b>	Extracción de DNA	<b>24</b>
<b>8.2.</b>	Estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación de las secuencias parciales del gen <i>CaM</i>	<b>26</b>
<b>8.3.</b>	Estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación de las secuencias parciales del gen <i>CSP</i>	<b>30</b>
<b>8.4.</b>	Secuencias de los productos de PCR	<b>32</b>



---

---

<b>8.5.</b>	Edición y análisis de secuencias	<b>33</b>
<b>8.6.</b>	Determinación de genotipo <i>CSP</i>	<b>36</b>
<b>8.7.</b>	Alineamiento múltiple	<b>37</b>
<b>8.8.</b>	Selección de modelo evolutivo	<b>41</b>
<b>8.9.</b>	Construcción del árbol filogenético	<b>41</b>
<b>9.</b>	DISCUSIÓN	<b>43</b>
<b>10.</b>	CONCLUSIONES	<b>46</b>
<b>11.</b>	PERSPECTIVAS	<b>46</b>
<b>12.</b>	GLOSARIO	<b>47</b>
<b>13.</b>	REFERENCIAS	<b>50</b>

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Representación de la estructura de la estructura de la proteína CaM, mostrando sus cuatro sitios de unión a Ca <sup>2+</sup> .	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b>	Cuantificación de DNAs obtenidos de aislados ambientales de <i>Aspergillus</i> spp.	<b>25</b>
<b>Figura 3.</b>	Curva de DNA para la amplificación de la secuencia parcial del gen <i>CaM</i> .	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b>	Curva de oligonucleótidos cmd5 y cmd6.	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b>	Curva de dNTPs para la amplificación de la secuencia parcial del gen <i>CaM</i> .	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b>	Curva de MgCl <sub>2</sub> para la amplificación de la secuencia parcial del gen <i>CaM</i> .	<b>27</b>
<b>Figura 7.</b>	Curva de temperatura de alineamiento para la amplificación de la secuencia parcial del gen <i>CaM</i> .	<b>28</b>
<b>Figura 8.</b>	Amplificación de DNAs de <i>Aspergillus</i> spp. utilizando las condiciones determinadas como óptimas durante las curvas de concentración de reactivos.	<b>29</b>
<b>Figura 9.</b>	Amplificación de la secuencia parcial del gen <i>CaM</i> en diferentes DNAs de <i>Aspergillus</i> spp., utilizando AmpliTaq Gold.	<b>29</b>
<b>Figura 10.</b>	Amplificación la secuencia parcial del gen <i>CaM</i> en dos DNAs de <i>Aspergillus</i> spp., utilizando las condiciones descritas por Rivera y Seifert (2011).	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b>	Curva de DNA para la amplificación de la secuencia parcial del gen <i>CSP</i> de un DNA de <i>Aspergillus</i> spp.	<b>30</b>
<b>Figura 12.</b>	Curva de MgCl <sub>2</sub> para la amplificación de la secuencia parcial del gen <i>CSP</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 13.</b>	Curva de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia parcial del gen <i>CSP</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 14.</b>	Amplificación de la secuencia parcial del gen <i>CSP</i> en diferentes aislados de <i>A. fumigatus</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 15.</b>	Análisis BLAST en el que se observa que la secuencia del aislado A39 no mostró similitud con la base de datos.	<b>32</b>
<b>Figura 16.</b>	Electroferograma de la secuencia parcial del gen <i>CaM</i> del aislado A39 con el programa Chromas Lite 2.1.1.	<b>32</b>
<b>Figura 17.</b>	Edición de secuencias parciales del gen <i>CSP</i> del aislado B20 realizada con el programa Bioedit.	<b>33</b>
<b>Figura 18.</b>	Representación del mejor alineamiento multiple de las secuencias parciales del gen <i>CSP</i> de <i>A. fumigatus</i> , obtenido con Multalin y visualizado con el programa MEGA 6.	<b>38</b>

---

**Figura 19.** Árbol filogenético con base en el método UPGMA de 27 secuencias parciales del gen *CSP* de aislados ambientales de *A. fumigatus* procedentes de dos hospitales de la Ciudad de México (HJM y CV).

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

## Página

<b>Tabla 1.</b>	Métodos de tipificación genotípica de aislados de <i>A. fumigatus</i> .	<b>7</b>
<b>Tabla 2.</b>	Secuencia de los 10 tipos de repetición en tándem de 12 pb y tipos de genotipo <i>CSP</i> reportados en el gen <i>CSP</i> .	<b>12</b>
<b>Tabla 3.</b>	Origen de los aislados ambientales de <i>Aspergillus</i> spp.	<b>15</b>
<b>Tabla 4.</b>	Programas utilizados para los alineamientos múltiples de las secuencias de <i>A. fumigatus</i> .	<b>22</b>
<b>Tabla 5.</b>	Determinación espectrofotométrica de la concentración y calidad de los DNAs obtenidos de los aislados ambientales de <i>Aspergillus</i> spp.	<b>24</b>
<b>Tabla 6.</b>	Resultados de parámetros de BLAST de los aislados del HJM y del CV.	<b>34</b>
<b>Tabla 7.</b>	Secuencia de los 10 tipos de repeticiones en tándem de 12 pb y genotipos de <i>CSP</i> encontrados en los aislados ambientales de <i>A. fumigatus</i> .	<b>36</b>
<b>Tabla 8.</b>	Comparación de los alineamientos múltiples realizados con seis programas.	<b>37</b>
<b>Tabla 9.</b>	Variaciones genéticas encontradas con el alineamiento múltiple de las secuencias parciales del gen <i>CSP</i> .	<b>39</b>

---

---

## 1. Resumen

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en suelo, agua y aire, son considerados hongos cosmopolitas y oportunistas. *Aspergillus* produce grandes cantidades de conidios que se dispersan fácilmente y penetran en los alvéolos pulmonares debido a su pequeño tamaño (2-3  $\mu\text{m}$ ). La inhalación de conidios es preocupante en el ambiente hospitalario, ya que se ha asociado directamente con la aparición de brotes de aspergilosis invasora, causados principalmente por *A. fumigatus*. Para implementar las medidas de prevención de estos brotes, es necesario llevar a cabo estudios de genotipificación que permitan conocer la prevalencia de los diferentes genotipos del hongo en el ambiente. El objetivo de este trabajo fue identificar y tipificar molecularmente aislados ambientales de *A. fumigatus*, obtenidos de dos hospitales de la Ciudad de México. A partir de 95 aislados de *Aspergillus* spp., previamente caracterizados fenotípicamente, se obtuvieron cultivos monospóricos, se extrajo el DNA y se amplificó la secuencia parcial del gen *CaM* (Calmodulina) para identificar genotípicamente los aislados. Se seleccionaron los aislados correspondientes a *A. fumigatus*, y se tipificaron mediante la amplificación y secuenciación de la región microsatélite del gen *CSP* (Cell Surface Protein). Estas secuencias se editaron, alinearon y utilizaron para determinar a qué genotipo *CSP*, de los 27 reportados en la literatura, corresponde cada uno de los aislados, también se buscaron las mutaciones en cada una de las secuencias. Posteriormente se construyó un árbol filogenético por el método de UPGMA (método de promedios aritméticos no ponderados). La identificación molecular de todos los aislados de *A. fumigatus* no se logró debido a la inespecificidad de los oligonucleótidos que amplifican la secuencia parcial del gen *CaM*. Respecto a genotipificación de *A. fumigatus*, se encontraron 7 genotipos *CSP* de los cuales 2 no han sido reportados en estudios anteriores. Los genotipos t04A, t03, t10, t01, t02 se presentaron en el 48.17%, 11.11%, 14.81%, 11.11% y 7.40%, respectivamente, mientras que el 7.40% de los aislados restantes presentaron genotipos no reportados. Se encontró que solo dos secuencias mostraron las mismas mutaciones y las otras 25 tuvieron mutaciones diferentes. El árbol filogenético mostró que de los 27 aislados de *A. fumigatus*, 24 forman un grupo que incluye aislados de ambos hospitales, los tres aislados restantes forman tres grupos independientes. Estos resultados muestran la

---

---

existencia tanto de variabilidad como de clonalidad entre los aislados ambientales de *A. fumigatus*.

## 2. Introducción

Las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprofitos y de distribución cosmopolita debido a que sus pequeños conidios pueden permanecer suspendidos en el aire durante periodos prolongados de tiempo y dispersarse a grandes distancias por el viento, contaminando cualquier superficie que tenga contacto con el aire (63). Debido a la ubicuidad de *Aspergillus* spp. en el ambiente, los individuos están expuestos constantemente a la inhalación de sus conidios. Esta situación es preocupante, particularmente en el ambiente hospitalario ya que se ha asociado con la aparición de brotes de aspergilosis invasora (AI) nosocomial (46). El agente etiológico más común es *Aspergillus fumigatus*, aunque también han sido asociados *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* (1). En diferentes países, el número de casos y la gravedad de la AI se ha incrementado en los últimos años debido al creciente número de pacientes susceptibles, como son los que cursan con neutropenia severa y los sometidos a trasplante de médula ósea o tratamiento inmunosupresor (12). En México existe poca información sobre la epidemiología de la AI nosocomial; sin embargo, dado que la población de individuos con riesgo de padecerla ha aumentado, es posible que la incidencia de esta enfermedad sea mayor de lo que se conoce, por lo que es necesario contar con herramientas que permitan detectar y dar seguimiento al curso de posibles brotes. Las técnicas de tipificación molecular permiten elucidar la compleja epidemiología en tales casos, demostrar la relación entre los aislados ambientales y clínicos de *A. fumigatus*, así como determinar las fuentes de infección y vías de transmisión (46), lo que sin duda ha ayudado a implementar medidas de prevención de la infección en personas susceptibles (49). Entre las diversas técnicas de tipificación molecular, la secuenciación parcial de genes ha mostrado excelentes resultados (30), tal es el caso de la región polimórfica del gen *Afua\_3g08990*, denominado *CSP* (Cell Surface Protein) y que codifica para una proteína putativa de superficie. La diversidad genética de este locus surge de repetidos en tándem y de mutaciones puntuales, deleciones e inserciones en el gen *Afua\_3g08990*, por lo que genera patrones de diversidad y permite distinguir aislados epidemiológicamente relacionados. Las ventajas de utilizar el marcador *CSP* sobre otros

---

---

son: alto nivel de polimorfismo, bajo costo, fácil estandarización e interpretación de resultados, reproducibilidad interlaboratorio, además de proporcionar información filogenética (6). Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se tipificaron 27 aislados de *A. fumigatus* recuperados del ambiente de dos hospitales de la Ciudad de México, utilizando el método de tipificación *CSP*.

### **3. Marco teórico**

#### **3.1. Generalidades**

*A. fumigatus* es un hongo filamentoso, cosmopolita, saprobio y ubicuo en el ambiente, produce un gran número de pequeños conidios con un diámetro de 2-3  $\mu\text{m}$  (25), lo que facilita su dispersión en el ambiente a través de las corrientes de aire. A diario inhalamos grandes cantidades de conidios, en personas inmunocompetentes esto raramente tiene un efecto adverso; sin embargo, en individuos inmunodeprimidos la inhalación de estas estructuras fúngicas puede originar infecciones oportunistas, como la AI (14). Lo que es de gran importancia ya que el número de casos de esta enfermedad se ha incrementado en los últimos años debido al aumento en el número de pacientes inmunocomprometidos, como son los pacientes con neutropenia prolongada, los que han sido sometidos a trasplante de médula ósea y pacientes bajo cuidados intensivos (44). Es pertinente señalar que la AI es causada por diferentes especies de *Aspergillus*, entre los que se encuentran *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. ustus* (44); sin embargo, *A. fumigatus* es el responsable del 90% de los casos (43).

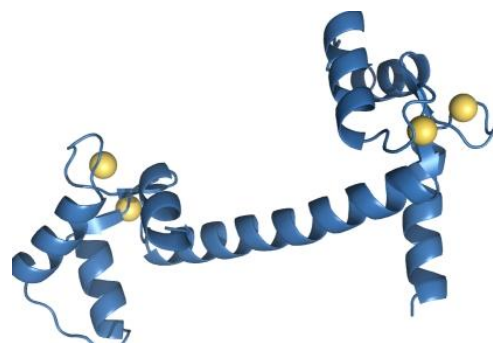
#### **3.2. Identificación de *Aspergillus* spp.**

Se han realizado importantes avances en la identificación a nivel de especie dentro del género *Aspergillus*, pero aún existen ciertas dificultades, ya que se realiza fundamentalmente con base en su morfología, lo que representa en muchos casos, un importante grado de inespecificidad, sobre todo para distinguir especies cercanas, cuyas características fenotípicas son muy similares. Por otra parte, la fiabilidad de la

identificación con base en características morfológicas depende de la experiencia del analista. Otra desventaja de la identificación fenotípica, es que los procedimientos microbiológicos tradicionales llegan a requerir días o semanas para obtener un resultado (19). Estas circunstancias plantean la necesidad de utilizar métodos alternativos que ofrezcan mayor rapidez en la obtención de resultados y especificidad (59). Dentro de estos métodos alternativos están las técnicas moleculares, tal como la secuenciación parcial de genes constitutivos (calmodulina, actina y  $\beta$ -tubulina), que han resultado eficaces para la correcta identificación de especies estrechamente relacionadas (15).

### 3.3. Calmodulina (CaM)

La CaM es una pequeña proteína ácida de 150 aminoácidos, altamente conservada, tanto funcional como estructuralmente. Esta proteína es el principal receptor intra y extracelular de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) presente en la mayoría de las células eucariontes y posee cuatro sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (40), como se observa en la figura 1. La CaM funciona como un biosensor que, al aumentar la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , responde activando las proteínas diana (41). Esta proteína no posee una actividad enzimática inherente; sin embargo, se ha demostrado que el complejo calcio-CaM, activa numerosas enzimas, tales como fosfodiesterasas, adenilciclasas, protein-cinasas y ATPasas entre otras (31).



**Figura 1.** Representación de la estructura de la estructura de la proteína CaM, mostrando sus cuatro sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . Tomado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC\\_2820514\\_figure/pcbi-1000675-g001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC_2820514_figure/pcbi-1000675-g001).



---

---

## Gen *CaM*

El gen *CaM* tiene cinco intrones putativos en la región codificante (31), es unicopia y altamente especie-específico (57), por lo que su secuencia es utilizada como diana para la identificación de *Aspergillus* (48). Este gen es esencial para la proliferación celular de *Aspergillus* (48) y está involucrado en la inducción de la germinación de conidios (56).

### 3.4. Tipificación molecular

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es importante y útil cuando se producen brotes epidémicos, ya que permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio, los vehículos de transmisión, así como evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a impedir la diseminación de estos clones (23).

La tipificación genotípica, basada en el estudio del DNA, comprende una gran variedad de técnicas que tienen como objetivo comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. De tal manera que es posible reconocer la relación entre aislados vinculados epidemiológicamente. Anteriormente, los estudios de tipificación de aislados se basaban en las características fenotípicas (propiedades antigénicas, metabólicas o de resistencia antibiótica) de los microorganismos, pero presentaban muchas limitaciones para establecer diferencias o similitudes concluyentes entre microorganismos. Por el contrario, la mayoría de los métodos moleculares no tienen estas limitaciones y presentan mayor poder discriminatorio entre aislados. La selección del método de tipificación debe hacerse considerando los criterios propuestos por Maslow *et al.* (1993):

**Capacidad de tipificación:** la capacidad del método para producir resultados claramente interpretables con la mayoría de los aislados de las especies evaluadas.

**Reproducibilidad:** la capacidad de obtener reiteradas veces el mismo perfil de tipificación con el mismo aislado.

---

---

**Poder de discriminación:** la capacidad de producir resultados que permitan la diferenciación clara de dos aislados no relacionadas de la misma especie.

**Practicidad:** versatilidad, rapidez y simplicidad metodológica.

### **3.5. Métodos de tipificación genotípica utilizados en aislados de *A. fumigatus***

Diversos métodos genotípicos han sido evaluados para la tipificación de *A. fumigatus* (tabla 1), sin embargo, los análisis de microsatélites (secuencias cortas repetidas en tándem, STR), son los que presentan mayor poder discriminatorio.

**Tabla 1.** Métodos de tipificación genotípica de aislados de *A. fumigatus*.

<b>Método</b>	<b>Referencia</b>	<b>Resumen</b>
<b>RAPD</b>	Aufauvre-Brown <i>et al.</i> , 1992	El método de RAPD utilizado en este estudio fue útil para distinguir entre aislados clínicos de <i>A. fumigatus</i> . Durante el estudio se observó que de 44 oligonucleótidos utilizados, 21 amplificaron bandas múltiples que eran difíciles de interpretar o que no eran reproducibles, 22 produjeron bandas claras y reproducibles y 15 produjeron patrones de fragmentos de DNA que diferenciaban los aislados.
<b>RFLP y RAPD</b>	Rinyu <i>et al.</i> , 1995	Se tipificaron aislados clínicos y ambientales de <i>A. fumigatus</i> por los métodos RAPD y RFLP. De 12 oligonucleótidos utilizados en RAPD, solo tres revelaron alta variabilidad entre los aislados estudiados. Por RFLP, los patrones de restricción obtenidos no revelaron variabilidad entre los aislados.
<b>Secuencias no ribosomales moderadamente repetitivas de DNA y Southern blot</b>	Girardin <i>et al.</i> , 1995	En este estudio el uso de Southern blot ayudó a diferenciar entre aislados de <i>A. fumigatus</i> y <i>Neosartorya fischeri</i> ya que se observaron diferentes patrones de restricción obtenidos con las endonucleasas <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>BglII</i> , y esto se confirmó con el uso de secuencias no ribosomales moderadamente repetitivas.
<b>RAPD, IEA y REA</b>	Lin <i>et al.</i> , 1995	En este estudio se demostró que el método IEA tiene poder discriminatorio bajo para diferenciar entre aislados de <i>A. fumigatus</i> . RAPD tuvo mayor poder discriminatorio, fue reproducible pero tuvo la desventaja de que cada oligonucleótido por separado mostró bajo poder discriminatorio. El método de REA fue un método reproducible y fiable, pero tuvo dificultad en su interpretación. Se encontró que combinar el uso de los métodos REA y RAPD ofrecía mayor poder discriminatorio para la tipificación de <i>A. fumigatus</i> .
<b>RAPD, RFLP y Southern blot</b>	Anderson <i>et al.</i> , 1996	Este estudio demostró que de cuatro oligonucleótidos utilizados en el método de RAPD, uno discriminó mejor los aislados de <i>A. fumigatus</i> . Se mostró que los métodos RFLP y Southern blot logran un mayor poder de discriminación cuando éstos se combinan.

<b>Southern blot</b>	Debeauvais <i>et al.</i> , 1997	Se analizaron aislados ambientales y clínicos de <i>A. fumigatus</i> , procedentes de pacientes con infección invasora o fibrosis quística mediante patrones de hibridación Southern, observando gran diversidad genética. Sin embargo, los aislados estudiados no pudieron ser agrupados de acuerdo con su ubicación geográfica.
<b>Amplificación de regiones IGS de rDNA</b>	Radford <i>et al.</i> , 1998	Los resultados de este estudio mostraron que la tipificación IGS de aislados de <i>A. fumigatus</i> permitió distinguir entre aislados clínicos y ambientales, así como evaluar su posible papel en el desarrollo de infección. Además tiene un papel potencial en la investigación de brotes hospitalarios y puede ser aplicable a la diferenciación de aislados de una amplia gama de especies de hongos.
<b>Microsatélites</b>	Bart-Delabesse <i>et al.</i> , 1998	Se investigó el uso de microsatélites como marcadores de DNA altamente polimórficos para la tipificación de aislados de <i>A. fumigatus</i> . Se encontró que esta técnica fue reproducible y con alto poder discriminatorio.
<b>RFLP, RAPD y MLP</b>	Bart-Delabesse <i>et al.</i> , 2001	Utilizaron RAPD, MLP y RFLP para la tipificación de <i>A. fumigatus</i> . El MLP dió resultados fiables y rápidos, pero con un alto costo y puede producir algunos artefactos durante la amplificación de repeticiones de dinucleótidos, que deben ser superados con la optimización de las condiciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). RFLP resultó ser la técnica que más discrimina entre los aislados estudiados, pero los patrones fueron difíciles de interpretar. Encontraron resultados discordantes entre RAPD y RFLP, ya que hay factores que afectan la reproducibilidad del RAPD, como los componentes de la PCR, calidad de DNA y la duración de la electroforesis.
<b>RAPD, SSDP, MSP y MLEE</b>	Bertout <i>et al.</i> , 2001	Mostraron la utilidad de la combinación de varios métodos de caracterización genotípica para llegar a una comprensión de la epidemiología de <i>A. fumigatus</i> . El MLEE tuvo buena capacidad discriminatoria y permitió la diferenciación de las poblaciones de <i>A. fumigatus</i> , sin embargo los autores sugieren la combinación de los cuatro métodos de tipificación para obtener un alto poder de discriminación.

<b>Microsatélites</b>	Rosehart <i>et al.</i> , 2002	Utilizaron microsatélites para examinar la relación genética de aislados clínicos y ambientales de <i>A. fumigatus</i> . Aunque no encontraron amplias diferencias genotípicas entre los aislados ambientales y clínicos, sugieren este método como confiable y de fácil interpretación.
<b>RFLP Afut1, RAPD, SSDP y PMM</b>	Lasker, 2002	Demostraron que el PMM y RFLP tienen un alto grado de discriminación entre aislados clínicos y ambientales. El SSDP fue el método más fácil de interpretar y realizar. Mientras que los perfiles obtenidos por análisis de PMM fueron más fáciles de interpretar que los obtenidos por RFLP o RAPD. La combinación de PMM y RFLP proporcionó el mejor poder discriminatorio, mayor reproducibilidad y facilidad de interpretación.
<b>RAPD y PCR touchdown</b>	Treviño-Castellano <i>et al.</i> , 2003	Mostraron que la combinación de PCR touchdown y RAPD proporcionó mayor sensibilidad para los estudios epidemiológicos de brotes causados por <i>A. fumigatus</i> , en comparación con las técnicas fenotípicas habituales disponibles en un laboratorio de microbiología clínica.
<b>AFLP</b>	Warris <i>et al.</i> , 2003	Demostraron que el método de AFLP tiene poder discriminatorio para determinar la relación epidemiológica entre aislados de <i>A. fumigatus</i> recuperados de diferentes fuentes (agua, aire y pacientes).
<b>RAMS</b>	Guarro <i>et al.</i> , 2005	Utilizaron la técnica de RAMS para analizar aislados clínicos y ambientales de <i>A. fumigatus</i> . Se demostró la utilidad de RAMS para estudiar brotes de aspergilosis nosocomial ya que reveló diferencias entre genotipos.
<b>MLST</b>	Bain <i>et al.</i> , 2007	El MLST demostró ser una herramienta útil para diferenciar aislados ambientales y clínicos. Sin embargo, para obtener un mayor poder de discriminación entre aislados los autores recomiendan los microsatélites.
<b>Repetidos en tándem codificados en el gen AFUA_3Go8990 A. fumigatus</b>	Levdansky <i>et al.</i> , 2007	Analizaron ORFs (open reading frames) que contienen regiones repetidas en tándem del genoma de <i>A. fumigatus</i> , y se evaluó la variabilidad en las longitudes de estas regiones en diferentes aislados. Sugirieron que un subconjunto de las proteínas de la superficie celular de <i>A. fumigatus</i> podía ser hipervariable debido a eventos de recombinación en sus repeticiones internas en tándem.

<b>Gen Afua_3g08990/CSP</b>	Balajee <i>et al.</i> , 2007	Demostraron que la tipificación de aislados de <i>A. fumigatus</i> con <b>CSP</b> , tiene ventajas significativas sobre otras técnicas de tipificación ya que es de fácil interpretación, rápida y barata.
<b>STR y AFLP</b>	De Valk <i>et al.</i> , 2007	Compararon los métodos de tipificación AFLP y STR utilizando aislados clínicos. El STR ofreció mayor poder discriminatorio, por lo que los autores sugirieron que éste debe ser preferido para la tipificación de los aislados clínicos de <i>A. fumigatus</i> .
<b>Microsatélite</b>	Vanhee <i>et al.</i> , 2008	Tipificaron aislados clínicos de <i>A. fumigatus</i> a través de microsatélites. Sus resultados demostraron que este método fue discriminatorio y reproducible, ya que logró determinar genotipos diferentes entre los aislados estudiados.
<b>CSP</b>	Hurst <i>et al.</i> , 2009	Probaron la reproducibilidad de la tipificación por <b>CSP</b> , de aislados de <i>A. fumigatus</i> entre siete laboratorios. Sus resultados revelaron que el método de tipificación por <b>CSP</b> fue un método reproducible y fácilmente transferible.
<b>AFLP</b>	Duarte-Escalante <i>et al.</i> , 2009	Encontraron que la técnica de AFLP fue útil para distinguir entre aislados clínicos y ambientales de <i>A. fumigatus</i> , así como para la identificación de la estructura de las poblaciones y sus relaciones con respecto al origen geográfico de los aislados.
<b>Gen CSP</b>	Lu-Juan Gao <i>et al.</i> , 2013	Tipificaron aislados clínicos de <i>A. fumigatus</i> , y encontraron que la tipificación <b>CSP</b> es altamente reproducible y estable, debe usarse como primera línea para la tipificación de aislados de <i>A. fumigatus</i> y para la determinación de su relación a nivel subpoblación.

**RAPD:** Random Amplified Polymorphic DNA, **RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism, **MLST:** Multilocus Sequence Typing, **IEA:** Isoenzyme analysis, **REA:** Restriction Endonuclease Analysis, **IGS:** Intergenic Spacer regions, **MLP:** Microsatellite Length Polymorphism, **SSDP:** Sequence Specific DNA Primer, **MSP:** Microsatellite Polymorphism, **MLEE:** Multilocus Enzyme Electrophoresis, **PMM:** Polymorphic Microsatellite Markers, **AFLP:** Amplified Fragment Length Polymorphism, **RAMS:** Random Amplified Microsatellites, **MLST:** Multilocus Sequence Typing, **STR:** Short Tandem, Repeat, **CSP:** Cell Surface Protein.

---

---

### 3.6. Microsatélites

Los microsatélites son regiones de DNA de secuencia corta repetida en tándem que están distribuidos a lo largo del genoma. Los microsatélites presentan un alto nivel de polimorfismo y están limitados por secuencias altamente conservadas a nivel de especie (53). Los microsatélites pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos), por dos (dinucleótidos), tres (trinucleótidos) y hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos) (65), y por lo tanto, el polimorfismo en este tipo de marcador depende del número de repeticiones en tándem en un determinado locus. Los microsatélites se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes (66), estos contienen secuencias de DNA repetitivo que pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otro tipo de secuencias (45). Estos marcadores permiten diferenciar por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), individuos estrechamente relacionados gracias al alto nivel de polimorfismo, a la generación de numerosas bandas informativas por reacción, la gran reproducibilidad y las altas tasas de mutación que poseen (8, 21). Por lo que, los microsatélites, están reemplazando rápidamente o complementando a otros marcadores o metodologías genéticas en las aplicaciones evolutivas y la conservación de las especies. En *A. fumigatus*, se han utilizado exitosamente para diferenciar aislados de esta especie (8, 6, 32, 30).

### 3.7. Método de tipificación utilizando el gen *CSP* que codifica una proteína de superficie celular

Uno de los métodos de tipificación que han sido utilizados exitosamente con aislados de *A. fumigatus*, es el denominado *CSP*, que se basa en el análisis de la variabilidad genética de secuencias de un solo locus. La diversidad genética de este locus surge de repetidos en tándem y mutaciones puntuales en el gen *Afua\_3g08990* (6). Este gen es conocido como *CSP* porque codifica una proteína putativa de superficie celular, y contiene regiones repetitivas en tándem de 12 pb (32). A la fecha, se han reportado 10 diferentes tipos de repetición de 12 pb (37) y 27 genotipos diferentes de *CSP*, los cuales están determinados por la sucesión de los repetidos en tándem (tabla 2). Este método de tipificación permite identificar genotipos distintos entre aislados estrechamente

relacionados, además es una estrategia de comparación de secuencias que no requiere de software especial para su análisis, es económica, reproducible y aplicable a estudios de detección de brotes de *A. fumigatus*, así como investigaciones epidemiológicas (30).

**Tabla 2.** Secuencia de los 10 tipos de repetición en tándem de 12 pb y tipos de genotipo *CSP* reportados en el gen *CSP*.

Tipo de repetición	Secuencia de la repetición	Genotipo <i>CSP</i>	Sucesión de repetición en tándem
<b>r01</b>	ACT TCT GTC CCG	t01	01-01-01-01-05-03-01-06-03-07
		t02	01-01-02-03-04-05-03-01-06-03-07
		t03	01-02-03-04-06-03-07
<b>r02</b>	ACT TCT GTC CCA	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07
		t04B	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07
		t05	01-01-01-03-01-06-03-07
<b>r03</b>	ACT CAA AACGCG	t06A	01-01-01-02-03-04-05-03-01-06-03-07
		t06B	01-01-01-02-03-04-05-03-01-06-03-07
		t07	01-02-03-04-05-03-04-05-03-01-06-03-07
<b>r04</b>	ACT TCA ATC CCG	t08	01-01-01-02-03-04-05-03-04-05-03-01-06-03-07
		t09	01-01-01-01-01-05-03-01-06-03-07
		t10	01-01-01-05-03-01-06-03-07
<b>r05</b>	ACT TTT GTC CCG	t11	01-01-08-03-01-06-03-07
		t12	01-01-01-01-01-02-03-04-05-03-01-06-03-07
		t13	01-01-02-03-04-05-03-04-05-03-01-06-03-07
<b>r06</b>	ACT TCA GTC CCG	t14	01-01-01-01-02-03-04-05-03-01-06-03-07
		t15	01-01-01-01-02-03-04-05-03-04-05-03-01-06-03-07
		t16	01-05-03-01-06-03-07
<b>r07</b>	ACT ACT ATT GTG	t17	01-01-02-03-04-05-03-09-06-03-07
		t18A	01-01-05-03-01-06-03-07
		t18B	01-01-05-03-01-06-03-07
<b>r08</b>	ACT TTT CTC CCG	t19	01-01-02-03-10-03-04-05-03-04-05-03-01-06-03-07
		t20	01-02-03-07
		t21	01-02-03-04-04-03-07
<b>r09</b>	ACT TCT GTT CCG	t22	01-01-02-03-01-06-03-07
		t23	01-01-02-03-04-05-03-07
<b>r10</b>	ACT TCA ATC CCA	t24	01-01-01-01-03-01-06-03-07



---

---

#### 4. Planteamiento del problema

En los últimos años se ha incrementado la incidencia de brotes de AI nosocomial (37) que afectan a pacientes inmunocomprometidos, principalmente los neutropénicos. Estos brotes se han asociado con obras de construcción o remodelación de áreas tanto intra como extrahospitalarias, ya que esta situación incrementa la concentración de conidios de *A. fumigatus* en el ambiente, principal agente etiológico de la AI (18, 1). En otros países, el registro de estos brotes ha promovido la utilización de unidades con filtros HEPA y luz ultravioleta germicida para mejorar la calidad del aire interior de los hospitales y con ello disminuir los brotes nosocomiales. Además, han implementado los estudios de epidemiología molecular para tratar de determinar las fuentes de infección y mecanismos de dispersión de este patógeno (37). En México, poco se sabe respecto a la epidemiología de la AI nosocomial, por lo que este tipo de estudios son necesarios ya que es un país que tiene una población creciente de pacientes inmunocomprometidos por diversas causas, lo que sugiere que la incidencia de la aspergilosis sea mayor de lo que se reporta. Asimismo, los estudios epidemiológicos moleculares nos ayudarán a entender la distribución de este patógeno en el ambiente intrahospitalario y conocer su variabilidad genética. Con base en los antecedentes, consideramos que uno de los métodos más idóneos para lograr este objetivo es el análisis de secuencias microsatélite, ya que son altamente polimórficas y permiten diferenciar aislados de *A. fumigatus* estrechamente relacionados (6).

---

---

## 5. Hipótesis

Si entre los aislados de *A. fumigatus* existe variabilidad genética entonces será posible tipificarlos con base en las secuencias parciales del gen *CSP*

## 6. Objetivos

### General

Tipificar los aislados de *A. fumigatus* recuperados del ambiente de dos hospitales de la Ciudad de México, con base en las secuencias parciales del gen *CSP*.

### Particulares

1. Obtener cultivos monospóricos de 95 aislados de *Aspergillus* spp., recuperados del ambiente de dos hospitales de la Ciudad de México.
2. Obtener el DNA de 95 cultivos monospóricos de *Aspergillus* spp., recuperados del ambiente de dos hospitales de la Ciudad de México.
3. Identificar genotípicamente 95 aislados de *Aspergillus* spp. con base en la secuenciación parcial del gen *CaM*.
4. Seleccionar los aislados correspondientes a *A. fumigatus*.
5. Estandarizar las condiciones de reacción para amplificar las secuencias parciales del gen *CSP*.
6. Amplificar las secuencias parciales del gen *CSP* de los aislados identificados como *A. fumigatus*.
7. Identificar los diferentes genotipos *CSP* en los aislados de *A. fumigatus*.
8. Realizar la construcción del árbol filogenético utilizando las secuencias parciales del gen *CSP*.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Aislados fúngicos

Se utilizaron 95 aislados ambientales de *Aspergillus* spp., previamente identificados fenotípicamente y obtenidos a partir de muestras de aire de dos hospitales de la Ciudad de México: Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana (CV) y Hospital Juárez de México (HJM) (tabla 3).

**Tabla 3.** Origen de los aislados ambientales de *Aspergillus* spp.

Clave del aislado	Origen	Identificación fenotípica
385B	HJM	<i>A. fumigatus</i>
B18	HJM	<i>A. fumigatus</i>
B11	HJM	<i>A. fumigatus</i>
B23	HJM	<i>A. fumigatus</i>
B43	HJM	<i>A. fumigatus</i>
392A	HJM	<i>A. fumigatus</i>
B21	HJM	<i>A. fumigatus</i>
100A	HJM	<i>A. fumigatus</i>
435A	HJM	<i>A. fumigatus</i>
270B	HJM	<i>A. fumigatus</i>
B4	HJM	<i>A. fumigatus</i>
262A	HJM	<i>A. fumigatus</i>
394A	HJM	<i>A. fumigatus</i>
B20	HJM	<i>A. fumigatus</i>
373C	HJM	<i>A. fumigatus</i>
312B	HJM	<i>A. fumigatus</i>
314A	HJM	<i>A. fumigatus</i>
387A	HJM	<i>A. niger</i>
412A	HJM	<i>A. niger</i>
395A	HJM	<i>A. niger</i>
50C	HJM	<i>A. niger</i>
264A	HJM	<i>A. niger</i>
140A	HJM	<i>A. niger</i>
B25	HJM	<i>A. niger</i>
312A	HJM	<i>A. niger</i>
250A	HJM	<i>A. niger</i>
B49	HJM	<i>A. niger</i>
87B	HJM	<i>A. niger</i>
B27	HJM	<i>A. niger</i>
B13	HJM	<i>A. niger</i>

<b>Clave del aislado</b>	<b>Origen</b>	<b>Identificación fenotípica</b>
146A	HJM	<i>A. niger</i>
88C	HJM	<i>A. niger</i>
373A	HJM	<i>A. niger</i>
B34	HJM	<i>A. niger</i>
B39	HJM	<i>A. niger</i>
B52	HJM	<i>A. niger</i>
55D	HJM	<i>A. niger</i>
B12	HJM	<i>A. niger</i>
360B	HJM	<i>A. niger</i>
316A	HJM	<i>A. flavus</i>
55C	HJM	<i>A. flavus</i>
323C	HJM	<i>A. flavus</i>
57B	HJM	<i>A. flavus</i>
370B	HJM	<i>A. flavus</i>
314C	HJM	<i>A. flavus</i>
B5	HJM	<i>A. terreus</i>
444D	HJM	<i>A. terreus</i>
B17	HJM	<i>A. terreus</i>
369B	HJM	<i>Aspergillus</i> sp.
233A	CV	<i>A. fumigatus</i>
A36	CV	<i>A. fumigatus</i>
A35	CV	<i>A. fumigatus</i>
A10	CV	<i>A. fumigatus</i>
235A	CV	<i>A. fumigatus</i>
257C	CV	<i>A. fumigatus</i>
176A	CV	<i>A. fumigatus</i>
9A	CV	<i>A. fumigatus</i>
222A	CV	<i>A. fumigatus</i>
A28	CV	<i>A. fumigatus</i>
281C	CV	<i>A. niger</i>
284B	CV	<i>A. niger</i>
217A	CV	<i>A. niger</i>
243A	CV	<i>A. niger</i>
103B	CV	<i>A. niger</i>
220A	CV	<i>A. niger</i>
314B	CV	<i>A. niger</i>
A13	CV	<i>A. niger</i>
166A	CV	<i>A. niger</i>
381D	CV	<i>A. niger</i>
A26	CV	<i>A. niger</i>
312B	CV	<i>A. niger</i>
219A	CV	<i>A. niger</i>
31E	CV	<i>A. niger</i>
A25	CV	<i>A. niger</i>
307A	CV	<i>A. niger</i>
2A	CV	<i>A. niger</i>
88C	CV	<i>A. niger</i>
A39	CV	<i>A. niger</i>
335B	CV	<i>A. niger</i>
202B	CV	<i>A. niger</i>

Clave del aislado	Origen	Identificación fenotípica
24C	CV	<i>A. niger</i>
87A	CV	<i>A. flavus</i>
27D	CV	<i>A. flavus</i>
24D	CV	<i>A. flavus</i>
A38	CV	<i>A. flavus</i>
24B	CV	<i>A. flavus</i>
127D	CV	<i>A. flavus</i>
A17	CV	<i>A. flavus</i>
A40	CV	<i>A. flavus</i>
A15	CV	<i>A. flavus</i>
202A	CV	<i>A. terreus</i>
237C	CV	<i>A. terreus</i>
343B	CV	<i>Aspergillus</i> sp.
237B	CV	<i>Aspergillus</i> sp.
283A	CV	<i>Aspergillus</i> sp.

HJM: Hospital Juárez de México

CV: Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana

## 7.2. Obtención de cultivos monospóricos

A partir de cada uno de los cultivos de los aislados incluidos en el estudio, se preparó una suspensión de conidios adicionando 1 mL de solución salina-tween 20 al 0.5% y homogeneizando en vórtex (Genie 2 Scientific Industries, USA). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas consecutivas de 1:10, y se tomaron 50 µL de la dilución, los cuales se inocularon en una caja Petri con agar Sabouraud (Bioxón, México) y con ayuda de un asa de Digralesky se extendió en el medio. Se incubó a 37°C hasta que se observó crecimiento. Posteriormente, se seleccionó una sola colonia, se sembró en una caja nueva con agar Sabouraud y se incubó a 37°C hasta observar esporulación de la colonia. Con ayuda de un asa micológica se tomaron los conidios de la superficie del cultivo y se resuspendieron en un tubo de plástico que contenía 1.5 mL de tween 20 estéril al 0.5%. Enseguida, se tomaron 10 alícuotas de 120 µL de esta suspensión, se colocaron en 10 tubos de plástico de 2 mL y a cada uno se les adicionó 1 mL de agua Milli Q estéril. Los tubos se conservaron a 4°C.

---

---

### 7.3. Extracción de DNA

Los cultivos monospóricos de cada aislado de *Aspergillus* spp. se sembraron en tubos con agar Sabouraud) y se incubaron a 37°C hasta observar esporulación abundante. A partir de cada cultivo, se preparó una suspensión de conidios agregando 1 mL de solución salina isotónica adicionada con tween 20 al 0.5% y agitando en vórtex (Genie 2 Scientific Industries, USA). Enseguida, se sembraron 100 µL de la suspensión en un matraz con medio YPD (1% extracto de levadura, 1% peptona, 2% glucosa) y se incubó a 37°C con agitación constante (130 rpm), durante 2 días o hasta que se observó crecimiento micelial. La biomasa micelial se filtró al vacío y se lavó con agua bidestilada estéril. El micelio seco se colocó en un tubo de plástico de 2 mL que contenían 0.2 g de perlas de vidrio (425-600 µm) estériles (Sigma, USA), teniendo la precaución de ocupar solo una tercera parte de la capacidad del tubo, para posteriormente agregar los reactivos para la extracción de DNA.

La extracción del DNA se llevó a cabo con el Kit DNeasy Plant (Qiagen, GE), de la siguiente manera: Se adicionó 400 µL de buffer AP1 a cada tubo con micelio, posteriormente los tubos se procesaron en un equipo FastPrep (Thermo Savant Instruments, USA) por 6 periodos de 40 s a una velocidad de 4 m/s, con 5 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo (67). Después se adicionaron 4 µL de RNAsa (100 mg/mL), se resuspendió con micropipeta y se incubó por 10 min a 65°C, mezclando por inversión 2 o 3 veces. Posteriormente, se adicionaron 130 µL del amortiguador AP2 y se incubó por 5 min en hielo, después se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente. Se transfirieron 450 µL del sobrenadante a una columna DNeasy Mini Spin (columna lila), sostenida en un tubo colector de 2 mL, se centrifugó a 13,200 rpm por 2 min. En el caso de que el volumen fuera mayor a 450 µL, este último paso se repitió las veces necesarias. El sobrenadante obtenido en el tubo colector se transfirió a un nuevo tubo y se le adicionaron 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E y se mezcló. Se transfirieron 650 µL de la mezcla anterior a la columna DNeasy mini spin (columna color blanco) sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó 1 min a 9,000 rpm, desechando el sobrenadante obtenido, este paso se repitió hasta acabar el volumen. Enseguida, se cambió el tubo colector y se

---

---

agregaron 500  $\mu\text{L}$  del amortiguador AW, se centrifugó por 1 min a 9,000 rpm dos veces. La columna se transfirió a un tubo de baja retención (Axygen, USA) de 1.5 mL, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de agua Milli Q y se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 9,000 rpm. La calidad y concentración de los DNAs obtenidos se determinó por espectrometría a 260 y 280 nm (DeNovix DS-11, USA), las lecturas se realizaron por duplicado. Los resultados se corroboraron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed 10,000X, (Biotium, USA), comparando con diferentes concentraciones (10, 20, 30, 50 y 100 ng/ $\mu\text{L}$ ) **del fago  $\lambda$**  (Gibco BRL®, USA). La electroforesis se realizó a 90 V durante 50 min en amortiguador TBE 0.5 X (Tris base 45 mM-ácido bórico 45 mM-EDTA 1 mM). El gel se observó en un fotodocumentador GelDoc XR (BioRad, USA). Todos los DNAs se ajustaron a una concentración de 10 ng/  $\mu\text{L}$ . Los DNAs se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

#### **7.4. Estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación de las secuencias parciales del gen *CaM***

Después de ajustar a 10 ng/ $\mu\text{L}$  la concentración de los 95 DNAs de *Aspergillus* spp., se realizó la amplificación de las secuencias parciales del gen *CaM*, utilizando los oligonucleótidos cmd5-F (5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3') y cmd6-R (5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3') (Sigma-Aldrich Corp., USA) que amplifican un fragmento de 500 pb (15). Con el propósito de encontrar las condiciones óptimas de amplificación, se realizaron curvas de concentración de reactivos (DNA, oligonucleótidos,  $\text{MgCl}_2$  y dNTPs). Inicialmente se realizó la curva de DNA, utilizando 10 y 20 ng. La mezcla de reacción (25  $\mu\text{L}$ ) consistió en dNTPs 200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  2.0 mM, 10 pmol de cada oligonucleótido cmd5-F y cmd6-R (Sigma-Aldrich Corp., USA) y 1 U de *Taq* polimerasa (Fermentas Inc., USA) en amortiguador 1X (Fermentas Inc.). El programa de amplificación utilizado fue: 1 ciclo de 8 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 15 s a 95°C, 20 s a 55°C, 60 s a 72°C y 1 ciclo de extensión final de 5 min a 72°C (12). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ESCO-Swift maxi versión 2006-1.0 (USA). Una vez determinada la cantidad adecuada de DNA, se procedió a realizar curvas de oligonucleótidos (15, 25, 50, 100 y 200 pmol), dNTPs (50, 100, 150 y 200

$\mu\text{M}$ ) y  $\text{MgCl}_2$  (1.5, 2.0, 2.5 mM). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con 0.8  $\mu\text{L}$  de GelRed (10,000 X, Biotium), el corrimiento se realizó a 90 V, en amortiguador TBE 0.5 X. Para definir el tamaño molecular de los amplicones se utilizó marcador de 100 pb (Gene Ruler DNA Ladder, Fermentas Inc., USA). Las imágenes de cada gel se capturaron en un fotodocumentador GelDoc XR (Bio-Rad)

### **7.5. Estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación de las secuencias parciales del gen *CSP***

La amplificación de las secuencias parciales del gen *CSP* de los 95 aislados de *Aspergillus* spp., se realizó utilizando los oligonucleótidos CSP-F (5´-TTGGGTGGCATTGTGCCAA-3´) y CSP-R (5´-GGAGGAACAGTGCTGTTGGTGA-3´) (Sigma-Aldrich Corp., USA) que amplifican un fragmento de ~550 a ~700 pb (6). Con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de amplificación, se realizaron curvas de concentración de reactivos (DNA, oligonucleótidos y  $\text{MgCl}_2$ ). Inicialmente, se llevó a cabo la curva de DNA, utilizando 10, 20, 25 y 30 ng. La mezcla de reacción (25  $\mu\text{L}$ ) consistió en dNTPs 200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1.2 mM (Fermentas Inc.), 100 pmol de cada oligonucleótido CSP-F y CSP-R (Sigma-Aldrich Corp.) y *Taq* polimerasa 1 U (Fermentas Inc.) en amortiguador 1 X (Fermentas Inc., USA). El programa de amplificación fue: 1 ciclo de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 62°C, 30 s a 68°C, 1 ciclo de extensión final de 2 min a 68°C y un ciclo de enfriamiento de 5 min a 4°C (6). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador ESCO-Swift (USA). Una vez determinada la cantidad adecuada de DNA, se realizaron las curvas de oligonucleótidos (10, 25, 50, 100, 200 pmol) y  $\text{MgCl}_2$  (1.2, 1.5, 2.0, 2.5 mM). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con 0.8  $\mu\text{L}$  de GelRed (10,000 X, Biotium), el corrimiento se realizó a 90V, en amortiguador TBE 0.5 X. Para definir el tamaño molecular de los amplicones, se utilizó un marcador de 100 pb (Fermentas) Las imágenes obtenidas de cada gel se capturaron en un fotodocumentador GelDoc XR (Bio-Rad).



---

---

## 7.6. Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR, obtenidos tanto de la amplificación del gen *CaM* como del gen *CSP*, fueron secuenciados, en ambos sentidos, en el High Throughput Genomics Center de la Universidad de Washington, Seattle, WA (<http://www.htseq.org/>), utilizando los oligonucleótidos cmd5/ cmd6 y CSP-F y CSP-R, respectivamente.

## 7.7. Edición y análisis de secuencias

Los electroferogramas correspondientes a las secuencias parciales de los genes *CaM* y *CSP* se visualizaron con el programa Chromas Lite 2.1.1 ([http://technelysium.com.au/?page\\_id=13](http://technelysium.com.au/?page_id=13)), después fueron editadas con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit/html>). La edición de las secuencias, sentido y antisentido, consistió en cortar los extremos en los que la calidad de la lectura era baja, así como en la corroboración visual de la correspondencia de picos de diferentes colores (a cada base se le asigna un pico de color distinto) con la secuencia de bases que aparece en la parte superior del electroferograma, para corregir nucleótidos que mostraron ambigüedades. Posteriormente, las secuencias editadas se alinearon utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), para confirmar que las secuencias correspondían a los genes *CaM* y *CSP* de *A. fumigatus* y después se guardaron en un solo archivo, en formato FASTA, con el programa UGENE versión 1.13.3 (<http://ugene.unipro.ru/>).

## 7.8. Determinación de genotipo *CSP*

Las secuencias parciales del gen *CSP* de *A. fumigatus*, se cargaron en el programa GeneDoc versión 2.7.000 (<http://genedoc.software.informer.com/2.7/>), para determinar los diferentes genotipos *CSP* (37) presentes en las secuencias analizadas.

## 7.9. Alineamiento múltiple

Se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias, utilizando seis programas (tabla 4).

**Tabla 4.** Programas utilizados para los alineamientos múltiples de las secuencias de *A. fumigatus*.

PROGRAMA	DIRECCIÓN ELECTRÓNICA
<b>muscle</b>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/</a>
<b>clustalw2</b>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2</a>
<b>mafft</b>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft</a>
<b>kalign</b>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/</a>
<b>multalin</b>	<a href="http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/">http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/</a>
<b>t-cofee</b>	<a href="http://tcofee.crg.cat/apps/tcofee/do:regular">http://tcofee.crg.cat/apps/tcofee/do:regular</a>

Los alineamientos múltiples se evaluaron con el programa GeneDoc versión 2.7.000, en donde se calculó la suma de pares de bases, mínima entropía. También se editó el alineamiento múltiple eliminando los fragmentos que no fueran informativos. Para elegir el mejor alineamiento, a cada uno de los alineamientos múltiples, se aplicaron las fórmulas de suma de pares de bases, mínima entropía y mejor alineamiento múltiple, para cada uno de los alineamientos múltiples, tomando en cuenta que el alineamiento múltiple con la cifra más grande en suma de pares se le asignó un valor de 10, y al alineamiento con la cifra más pequeña en mínima entropía se le asignó un valor de 10, se comparó cada uno de los alineamientos con el de valor asignado de 10 y el alineamiento con mayor valor en AI (mejor alineamiento múltiple) se eligió para la construcción del árbol filogenético.

$$\text{Suma de pares de bases} = \frac{\mathbf{Sa}}{\mathbf{Sb}} \times 10 = \mathbf{Sc}$$

**Sa**= Valor de suma de pares de bases del alineamiento múltiple con menor valor de suma de pares

**Sb**= Valor de suma de pares de bases del alineamiento múltiple con mayor valor de suma de pares

**Sc**= Valor asignado de suma de pares de bases

$$\text{Mínima entropía} = \left[ \frac{\mathbf{Ma}}{\mathbf{Mb}} \times 10 \right] - 10 = \mathbf{Mc}$$

**Ma**= Valor de mínima entropía del alineamiento múltiple con menor valor de mínima entropía

**Mb**= Valor de mínima entropía del alineamiento múltiple con mayor valor de mínima entropía

**Mc**= Valor asignado de Mínima entropía

$$\mathbf{Al} = \mathbf{Sc} + \mathbf{Mc}$$

**Al**=Mejor Alineamiento múltiple

**Sc**= Valor asignado de Suma de pares de bases

**Mc**= Valor asignado de Mínima entropía

Ya seleccionado el mejor alineamiento múltiple, se analizó cada una de las secuencias comparando la variabilidad (mutaciones, inserciones y deleciones) entre ellas, utilizando el programa PhyDE versión 0.9971 (<http://www.phyde.de/>).

### 7.10. Selección de modelo evolutivo

Para elegir el modelo evolutivo se utilizó el programa jModeltest versión 2.1.3 (<https://code.google.com/p/jmodeltest2/>), aplicando los criterios de información de Akaike (AIC), Bayesiano (BIC), la teoría de decisiones (DT) y verosimilitudes (LH).

### 7.11. Construcción de árbol filogenético

La construcción del árbol filogenético se realizó con el programa MEGA6 versión 6.0 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>), utilizando el método UPGMA (método de promedios aritméticos no ponderados) y se validó con el método de bootstrap (remuestreo con reemplazamiento) con 1000 repeticiones.

## 8. Resultados

### 8.1. Extracción de DNA

De acuerdo con la determinación espectrofotométrica, los DNAs extraídos de los 95 aislados ambientales de *Aspergillus* spp. se obtuvieron en un rango de concentración de 8-132 ng/ $\mu$ L, con una pureza adecuada para su utilización en ensayos de PCR, como se muestra en la tabla 5.

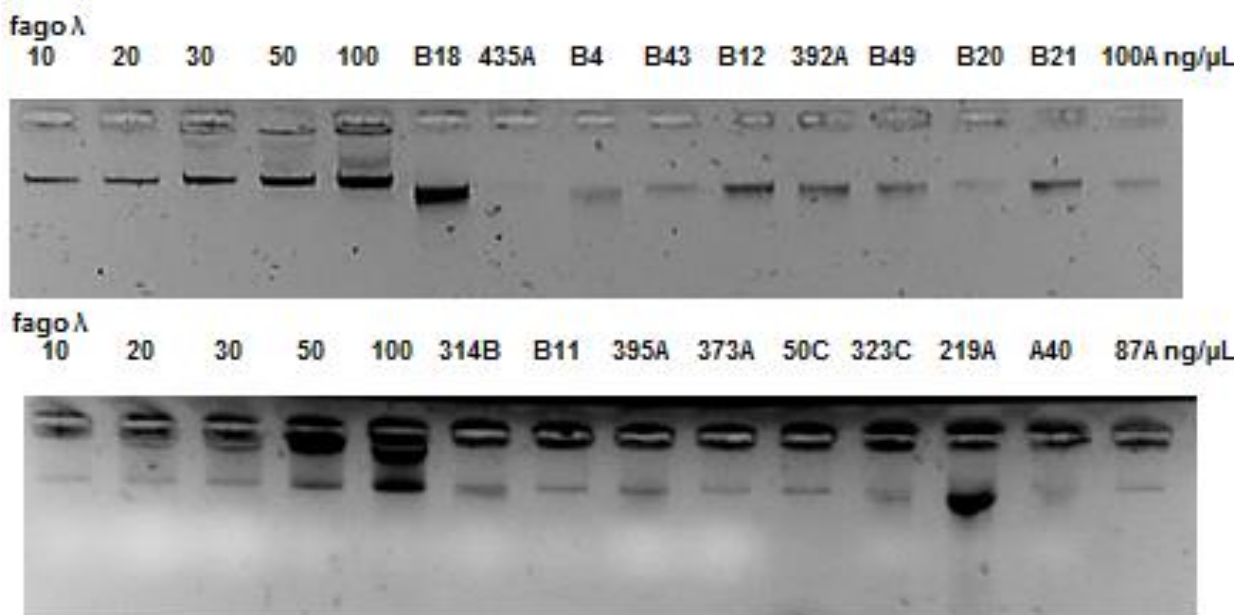
**Tabla 5.** Determinación espectrofotométrica de la concentración y calidad de los DNAs obtenidos de los aislados ambientales de *Aspergillus* spp.

Muestra	Concentración de DNA (ng/ $\mu$ L)	A260/A280	Muestra	Concentración de DNA (ng/ $\mu$ L)	A260/A280
<b>385B</b>	54.74	1.75	<b>373C</b>	12.70	1.90
<b>B18</b>	96.01	1.87	<b>312B</b>	18.28	2.56
<b>B11</b>	20.96	2.21	<b>314A</b>	64.64	2.27
<b>B23</b>	55.91	1.62	<b>387A</b>	59.99	1.52
<b>B43</b>	9.46	2.07	<b>412A</b>	71.03	1.84
<b>392A</b>	13.97	1.92	<b>395A</b>	23.79	2.11
<b>B21</b>	15.56	1.95	<b>50C</b>	12.08	1.75
<b>100A</b>	9.77	2.31	<b>264A</b>	38.92	1.85
<b>435A</b>	8.56	1.96	<b>140A</b>	88.51	2.14
<b>270B</b>	77.50	2.23	<b>B25</b>	70.52	1.93
<b>B4</b>	9.21	1.80	<b>312A</b>	76.05	1.67
<b>262A</b>	67.70	1.91	<b>250A</b>	27.36	1.32
<b>394A</b>	34.07	2.04	<b>B49</b>	11.52	1.99
<b>B20</b>	9.16	1.85	<b>87B</b>	66.34	2.78
<b>B27</b>	78.44	2.45	<b>257C</b>	33.81	1.56
<b>B13</b>	38.23	1.24	<b>176A</b>	55.85	2.10
<b>146A</b>	75.79	2.16	<b>9A</b>	132.05	2.07
<b>88C</b>	29.77	2.12	<b>222A</b>	45.72	1.60
<b>373A</b>	11.14	1.43	<b>A28</b>	100.57	1.45
<b>B34</b>	12.61	2.24	<b>281C</b>	31.98	1.76
<b>B39</b>	76.44	1.87	<b>284B</b>	60.24	2.34
<b>B52</b>	63.46	1.66	<b>217A</b>	88.86	1.59
<b>55D</b>	33.29	1.78	<b>243A</b>	19.75	2.17
<b>B12</b>	16.03	2.09	<b>103B</b>	21.38	1.68
<b>360B</b>	74.33	2.12	<b>220A</b>	54.96	1.89
<b>316A</b>	62.59	2.23	<b>314B</b>	31.80	2.23
<b>55C</b>	54.54	1.70	<b>A13</b>	61.35	2.34
<b>323C</b>	11.95	1.85	<b>166A</b>	87.71	1.56
<b>57B</b>	45.20	1.59	<b>381D</b>	27.99	1.72
<b>370B</b>	98.72	1.77	<b>A26</b>	35.20	2.55

Muestra	Concentración de DNA (ng/μL)	A260/A280	Muestra	Concentración de DNA (ng/μL)	A260/A280
314C	66.87	2.23	312A	87.20	1.79
B5	18.79	1.92	219A	109.99	2.06
444D	56.88	1.54	31E	8.98	1.87
B17	13.93	1.67	A25	42.73	1.89
369B	75.76	1.87	307A	94.51	1.76
233A	83.19	2.02	2A	98.51	1.70
A36	64.72	1.89	88C	28.18	1.97
A35	29.50	2.21	A39	110.10	2.08
A10	84.94	1.86	335B	26.14	1.76
235A	42.02	1.62	202B	76.26	2.10
24C	41.75	1.53	A40	9.52	1.74
87A	11.98	2.43	A15	45.67	1.89
27D	34.27	1.98	202A	28.05	1.42
24D	21.89	1.63	237C	80.36	2.27
A38	106.99	1.78	343B	88.91	1.34
24B	79.35	2.32	237B	22.30	2.20
127D	32.26	1.56	283A	42.60	1.43
A17	57.07	2.40			

A260/A280: Cociente de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm para determinar la pureza de DNA

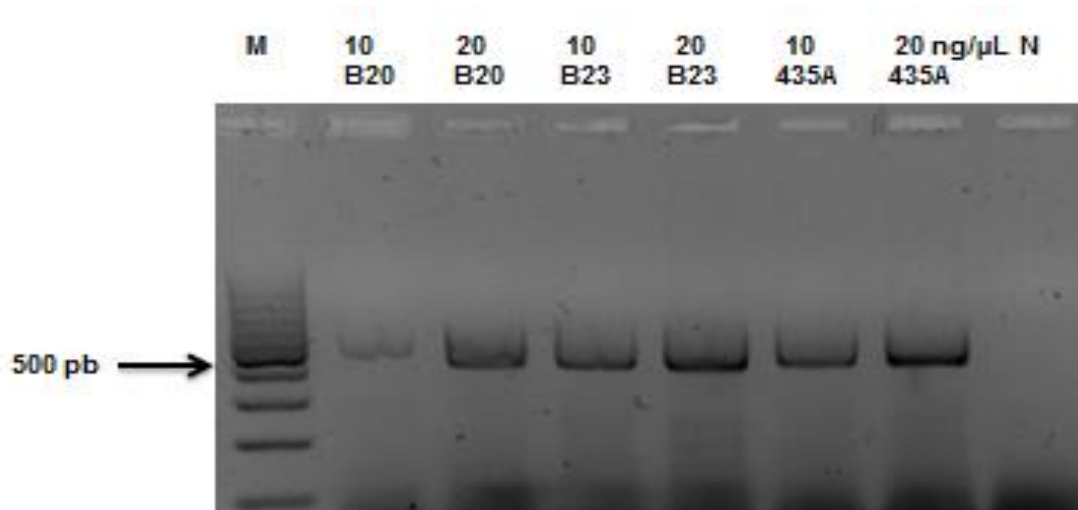
El análisis electroforético permitió comprobar que los DNAs se obtuvieron íntegros (no degradados) y libres de proteínas y RNA, ya que solo se observa una banda correspondiente a DNA (figura 2). Además, las concentraciones determinadas por espectrofotometría y electroforesis coincidieron en todos los DNAs analizados.



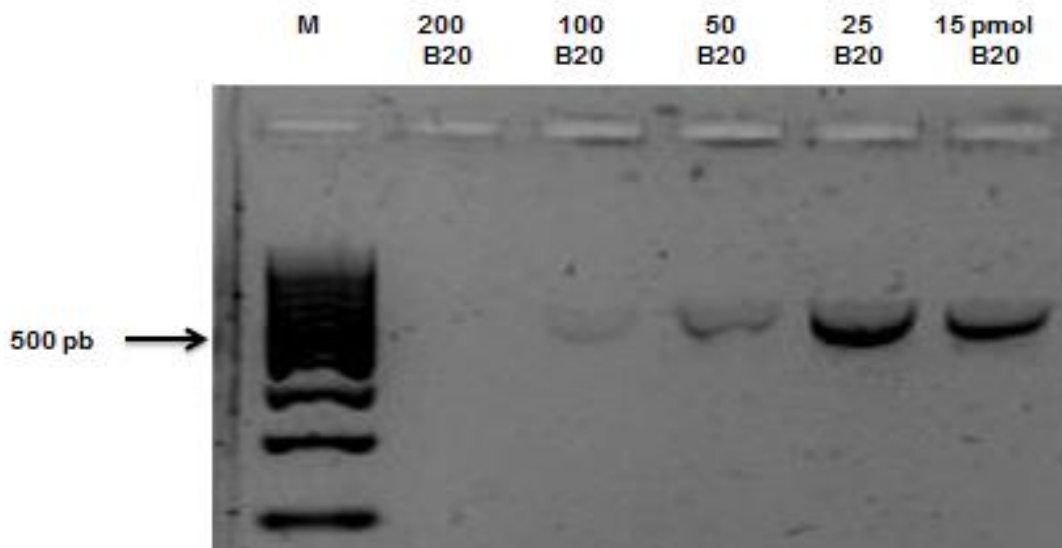
**Figura 2.** Cuantificación de DNAs obtenidos de aislados ambientales de *Aspergillus* spp.

## 8.2. Estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación de las secuencias parciales del gen *CaM*

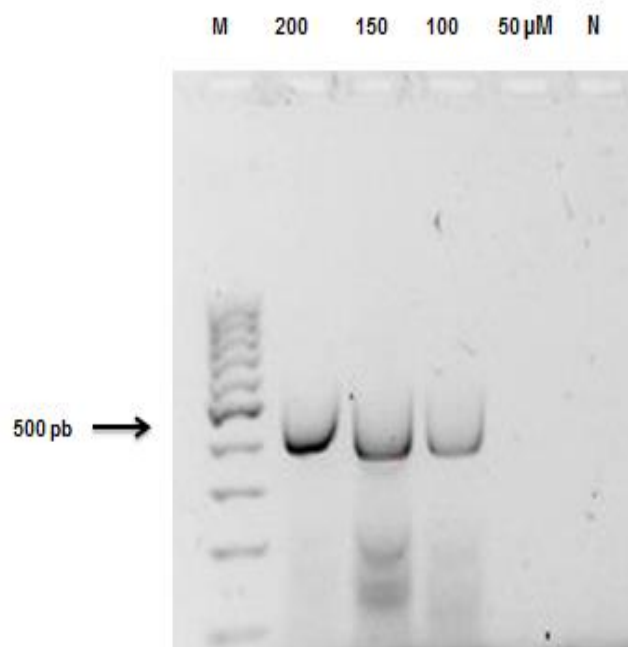
De acuerdo con los resultados obtenidos, se determinó que las condiciones adecuadas para la amplificación de las secuencias parciales del gen *CaM* eran: dNTPs 200  $\mu$ M, oligonucleótidos 25 pmol y  $MgCl_2$  1.5 mM, utilizando 1 U *Taq* polimerasa (figuras 3-7).



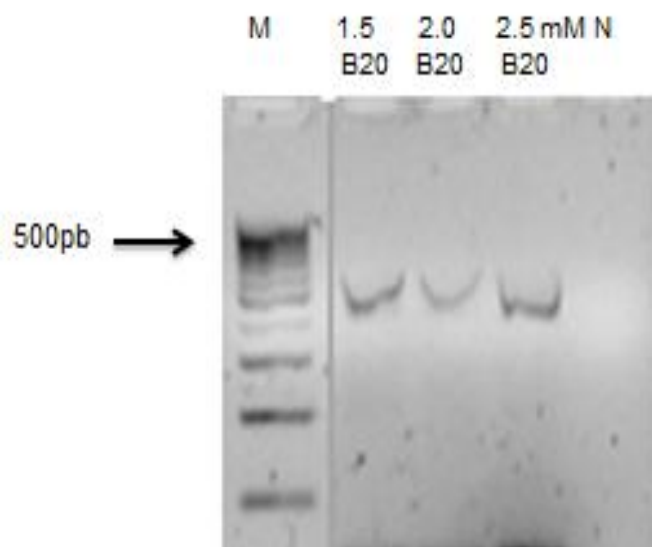
**Figura 3.** Curva de DNA para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CaM*. La amplificación óptima del fragmento de 500 pb se observó con 20 ng/ $\mu$ L de DNA.



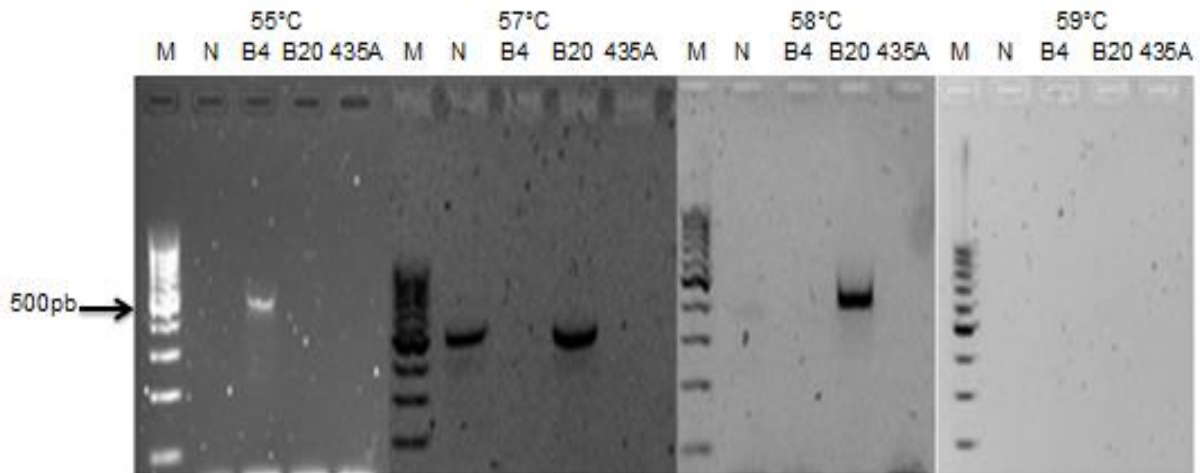
**Figura 4.** Curva de oligonucleótidos cmd5 y cmd6. La amplificación del fragmento de 500 pb fue óptima con 25 pmol de cada oligonucleótido.



**Figura 5.** Curva de dNTPs para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CaM*. La amplificación óptima del amplicón de 500 pb se observó con 200 μM de dNTPs.



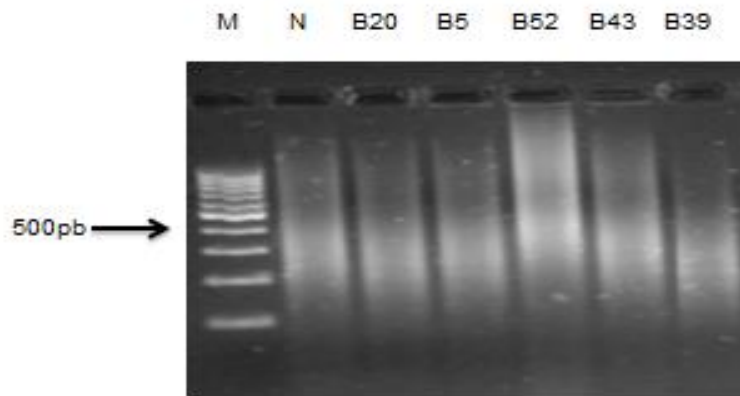
**Figura 6.** Curva de  $MgCl_2$  para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CaM*. La amplificación de la banda de 500 pb fue óptima con 1.5 mM de  $MgCl_2$ .



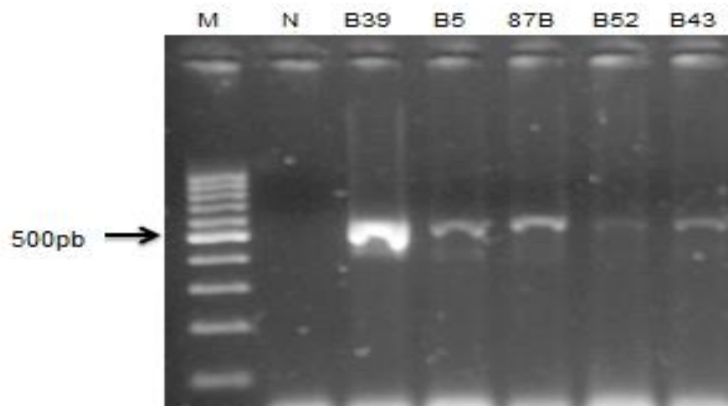
**Figura 7.** Curva de temperatura de alineamiento para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CaM*, utilizando tres DNAs de *Aspergillus* spp. La temperatura óptima fue 58°C.

Cabe mencionar que cuando se procedió a amplificar los 95 DNAs de *Aspergillus* spp., utilizando las condiciones de reacción determinadas, no se logró la amplificación adecuada de todos los DNAs (figura 8). Por lo que con el fin de obtener una mayor eficacia en la amplificación, se cambió la *Taq* polimerasa (Fermentas, Inc.) por la AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, USA), asimismo, el volumen final de reacción se aumentó a 50  $\mu$ L, pero aún con las modificaciones realizadas no se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que se observaron bandas inespecíficas (figura 9). Finalmente, se probaron nuevas condiciones de amplificación, con base en lo descrito por Rivera y Seifert (52), que consistieron en: 0.08  $\mu$ M de cada oligonucleótido cmd5 y cmd6, dNTPs 0.1  $\mu$ M, 0.5 U de *Taq* polimerasa y 10 ng de DNA, en un volumen final de 10  $\mu$ L por reacción (figura 10). El programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo de 3 min a 94°C seguido de 42 ciclos de 94°C 60 s, 30 s a 62°C, 90 s a 72°C y un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. No obstante, la reproducibilidad de la amplificación con estas condiciones no resultó adecuada para los 95 DNAs de los aislados estudiados, únicamente en 48 DNAs se logró obtener el amplicón esperado de 500 pb.

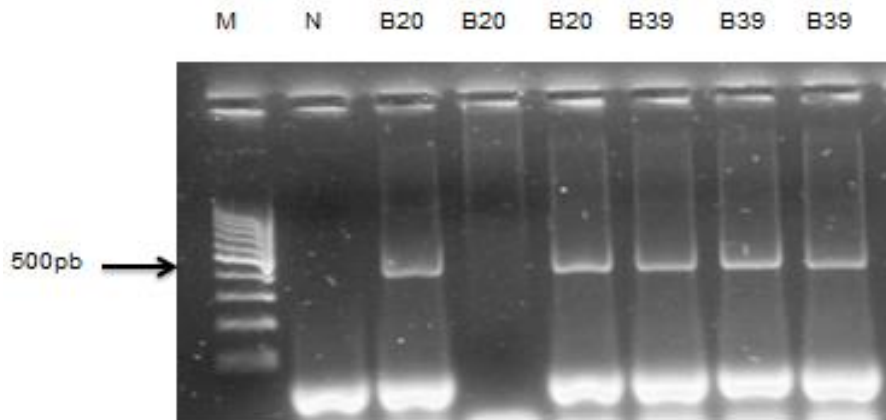




**Figura 8.** Amplificación de DNAs de *Aspergillus* spp., utilizando las condiciones determinadas como óptimas durante las curvas de concentración de reactivos.



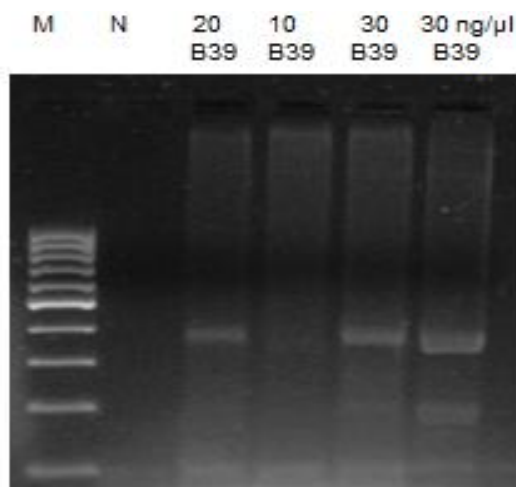
**Figura 9.** Amplificación de la secuencia parcial del gen *CaM* en diferentes DNAs de *Aspergillus* spp., utilizando AmpliTaq Gold.



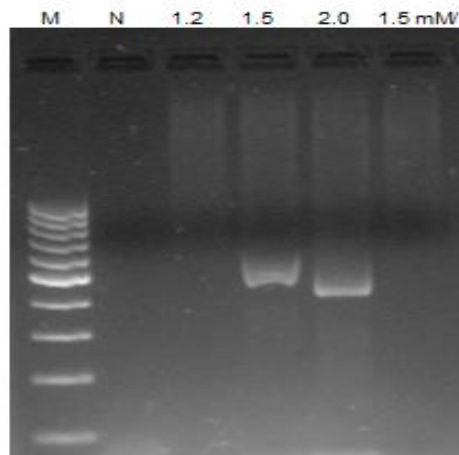
**Figura 10.** Amplificación la secuencia parcial del gen *CaM* en dos DNAs de *Aspergillus* spp., utilizando las condiciones descritas por Rivera y Seifert (2011).

### 8.3. Estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación de las secuencias parciales del gen *CSP*

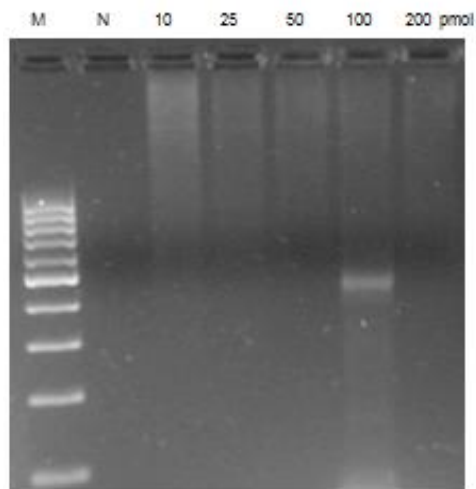
De acuerdo con los resultados obtenidos de las curvas de concentración de reactivos, se determinó que las condiciones óptimas para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP* fueron: oligonucleótidos 100 pmol,  $MgCl_2$  2.0 mM, DNA 20 ng, dNTPs 200  $\mu M$  y *Taq* polimerasa 1 U (figuras 11-13). Con estas condiciones se lograron amplificar los 27 DNAs de los aislados que, con base en su morfología, habían sido tipificados como *A. fumigatus*.



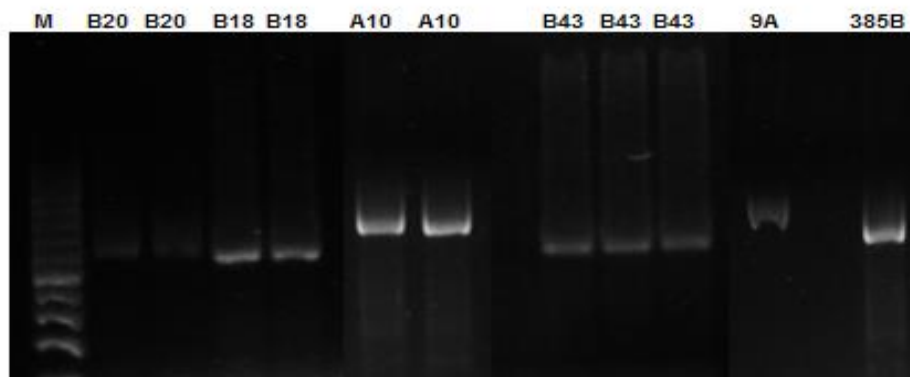
**Figura 11.** Curva de DNA para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP* de un DNA de *Aspergillus* spp. La concentración óptima de DNA fue de 20 ng/ $\mu L$ .



**Figura 12.** Curva de  $MgCl_2$  para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP*. La concentración adecuada fue de 2.0.



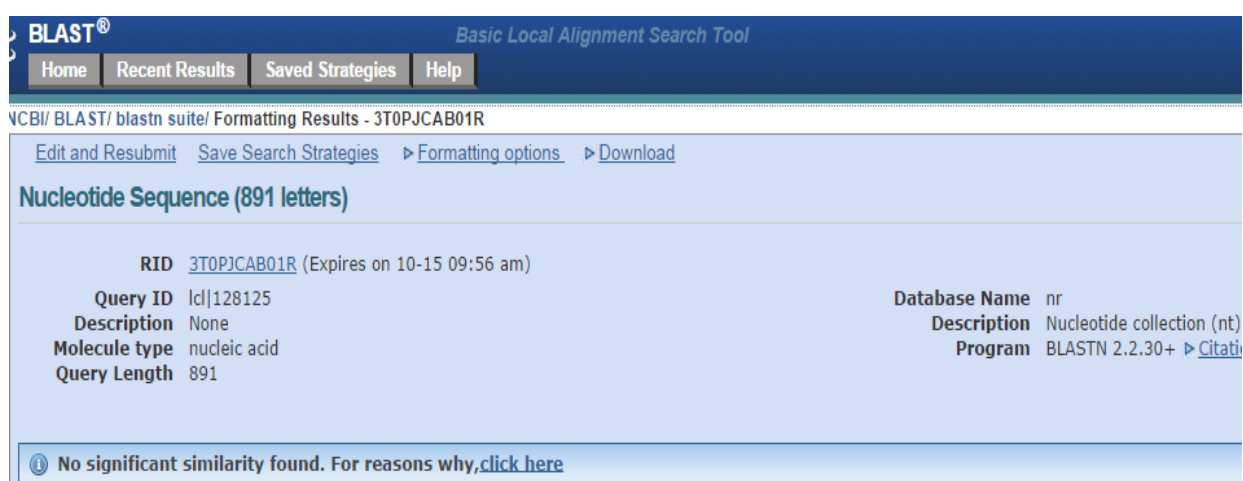
**Figura 13.** Curva de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP*. La concentración adecuada de oligonucleótidos fue 100 pmol.



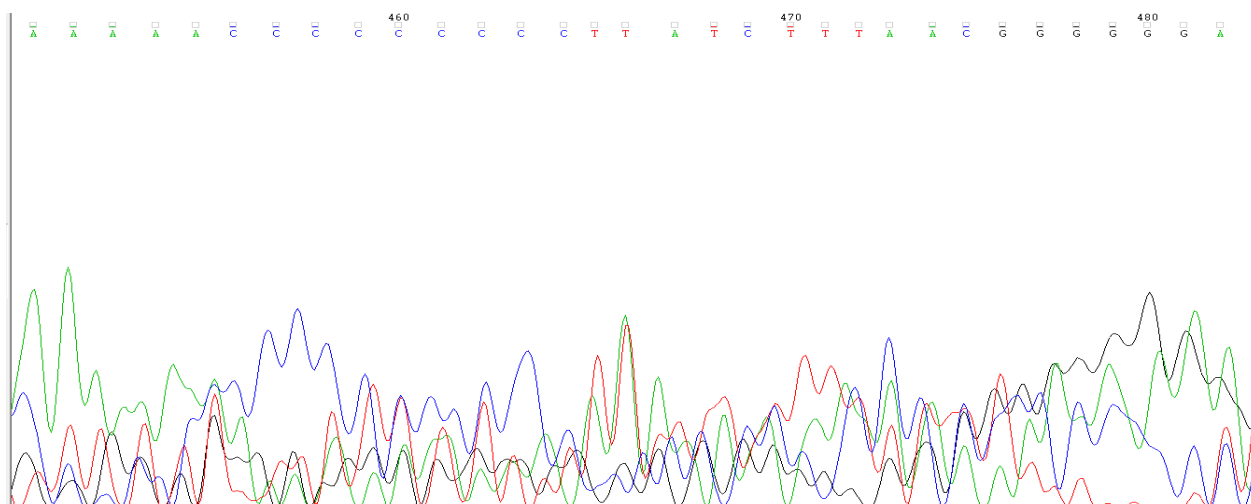
**Figura 14.** Amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP* en diferentes aislados de *A. fumigatus*.

## 8.4. Secuencias de los productos de PCR

De los 48 amplicones obtenidos de diferentes aislados de *Aspergillus* spp., correspondientes a la región del gen *CaM*, solo se obtuvieron 11 secuencias. De éstas, cuatro correspondieron a *A. fumigatus* y las otras 37 secuencias no mostraron similitud cuando se compararon con las secuencias depositadas en el GenBank (figura 15), además en los electroferogramas los picos no estaban bien definidos (figura 16).



**Figura 15.** Análisis BLAST en el que se observa que la secuencia del aislado A39 no mostró similitud con la base de datos.

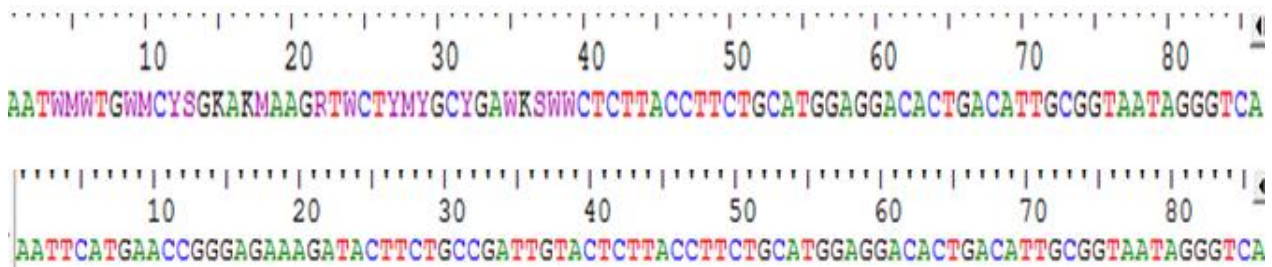


**Figura 16.** Electroferograma de la secuencia parcial del gen *CaM* del aislado A39 con el programa Chromas Lite 2.1.1.

Respecto al gen *CSP*, se obtuvieron adecuadamente las secuencias parciales correspondientes a los 27 aislados de *A. fumigatus*.

### 8.5. Edición y análisis de secuencias

En la figura 17 se muestra una secuencia parcial del gen *CSP* del aislado B20 no editada (arriba) y la secuencia editada (abajo). La edición se realizó en las 27 secuencias de *A. fumigatus*, utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Posteriormente se realizó el alineamiento con BLAST, en donde se observaron parámetros de similitud superiores a 75%, valores de expectación menores a cero, valores de identidad superiores a 89% , con lo que se confirmó que las secuencias correspondían al gen *CSP* de *A. fumigatus*.(Tabla 6).



**Figura 17.** Edición de secuencias parciales del gen *CSP* del aislado B20 realizada con el programa Bioedit. Arriba se muestra la secuencia sin editar y abajo la secuencia editada.

**Tabla 6.** Resultados de parámetros de BLAST de los aislados del HJM y del CV.

Aislado	Gen	Parámetros del análisis BLAST	Resultados	Aislado	Gen	Parámetros del análisis BLAST	Resultados
385B HJM	<b>CSP</b>	Similitud	83%	373C HJM	<b>CSP</b>	Similitud	76%
		Expectación	4E-148			Expectación	5E-122
		Identidad	92%			Identidad	98%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
B18 HJM	<b>CSP</b>	Similitud	82%	312B HJM	<b>CSP</b>	Similitud	77%
		Expectación	3E-144			Expectación	1E-158
		Identidad	93%			Identidad	94%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
B11 HJM	<b>CSP</b>	Similitud	83%	314A HJM	<b>CSP</b>	Similitud	76%
		Expectación	6E-161			Expectación	5E-122
		Identidad	94%			Identidad	98%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
B23 HJM	<b>CSP</b>	Similitud	80%	233A CV	<b>CSP</b>	Similitud	77%
		Expectación	2E-90			Expectación	0.0
		Identidad	99%			Identidad	97%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
B43 HJM	<b>CSP</b>	Similitud	83%	A36 CV	<b>CSP</b>	Similitud	81%
		Expectación	3E-158			Expectación	4E-158
		Identidad	94%			Identidad	94%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
392A HJM	<b>CSP</b>	Similitud	81%	A35 CV	<b>CSP</b>	Similitud	81%
		Expectación	2E-90			Expectación	3E-159
		Identidad	99%			Identidad	94%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
B21 HJM	<b>CSP</b>	Similitud	83%	A10 CV	<b>CSP</b>	Similitud	77%
		Expectación	4E-147			Expectación	1E-158
		Identidad	94%			Identidad	94%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
100A HJM	<b>CSP</b>	Similitud	76%	235A CV	<b>CSP</b>	Similitud	77%
		Expectación	3E-159			Expectación	1E-158
		Identidad	94%			Identidad	94%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>

435A HJM	<b>CSP</b>	Similitud	81%	257C CV	<b>CSP</b>	Similitud	81%
		Expectación	5E-122			Expectación	3E-159
		Identidad	98%			Identidad	94%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
270B HJM	<b>CSP</b>	Similitud	82%	176A CV	<b>CSP</b>	Similitud	81%
		Expectación	2E-110			Expectación	0.0
		Identidad	89%			Identidad	97%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
B4 HJM	<b>CSP</b>	Similitud	76%	9A CV	<b>CSP</b>	Similitud	78%
		Expectación	2E-90			Expectación	3E-149
		Identidad	99%			Identidad	94%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
262A HJM	<b>CSP</b>	Similitud	81%	222A CV	<b>CSP</b>	Similitud	81%
		Expectación	3E-159			Expectación	6E-151
		Identidad	94%			Identidad	92%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
94A HJM	<b>CSP</b>	Similitud	81%	A28 CV	<b>CSP</b>	Similitud	81%
		Expectación	2E-161			Expectación	4E-158
		Identidad	94%			Identidad	94%
		Especie	<i>A. fumigatus</i>			Especie	<i>A. fumigatus</i>
B20 HJM	<b>CSP</b>	Similitud	81%				
		Expectación	4E-158				
		Identidad	94%				
		Especie	<i>A. fumigatus</i>				

## 8.6. Determinación de genotipo CSP

En las secuencias parciales del gen *CSP* de los aislados de *A. fumigatus* estudiados, se encontraron 7 de las 10 repeticiones de 12 pb, también se encontró una incidencia de genotipos de 48.17% correspondiente a t04A, 14.81% a t10, 11.11% a t03, 11.11% a t01, 7.40% a t02, y 7.40% a dos genotipos que no han sido reportados en estudios previos (37).

**Tabla 7.** Secuencia de los 10 tipos de repeticiones en tándem de 12 pb y genotipos de *CSP* encontrados en los aislados ambientales de *A. fumigatus*.

.Tipo de repetición	Secuencia encontrada	Aislado	Sucesión de repetición en tándem	Tipo de CSP
<b>r01</b>	✓	385B	01-x-03-04-05-03-x-06-03	no reportada
		B18	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		B11	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
<b>r02</b>	✓	B23	01-02-03-04-06-03-07	t03
		B43	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		392A	01-02-03-04-06-03-07	t03
<b>r03</b>	✓	B21	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		100A	01-01-01-05-03-01-06-03-07	t10
		435A	01-01-01-05-03-01-06-03-07	t10
<b>r04</b>	✓	270B	03-04-x-03-x-x-03	no reportada
		B4	01-02-03-04-06-03-07	t03
		262A	01-01-01-01-05-03-01-06-03-07	t01
<b>r05</b>	✓	394A	01-01-01-01-05-03-01-06-03-07	t01
		B20	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		373C	01-01-01-05-03-01-06-03-07	t10
<b>r06</b>	✓	312B	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		314A	01-01-01-05-03-01-06-03-07	t10
		233A	01-01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t02
<b>r07</b>	✓	A36	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		A35	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		A10	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
<b>r08</b>	*	235A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		257C	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		176A	01-01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t02
<b>r09</b>	*	9A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A
		222A	01-01-01-01-05-03-01-06-03-07	t01
<b>r10</b>	*	A28	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	t04A

x: tipo de repetición no reportada



## 8.7. Alineamiento múltiple

De los seis alineamientos múltiples evaluados con el programa GeneDoc el mejor fue el obtenido con el programa Multalin (tabla 8), como se observa en la figura 18, donde las regiones conservadas son las que presentan uniformidad de color en las filas del alineamiento, así mismo, se encontraron diferentes mutaciones, deleciones e inserciones (tabla 9). Posteriormente este alineamiento se utilizó para realizar la construcción del árbol filogenético.

**Tabla 8.** Comparación de los alineamientos múltiples realizados con seis programas.

<b>PROGRAMA</b>	<b>SUMA DE PARES DE BASES</b>	<b>VALOR ASIGNADO</b>	<b>MINIMA ENTROPIA</b>	<b>VALOR ASIGNADO</b>	<b>PROMEDIO DE VALORES ASIGNADOS</b>
<b>T-COFEE</b>	3393391	10	1711031	5.49	15.49
<b>CLUSTAL W</b>	2142964	6.31	1432161	4.61	10.92
<b>MAFFT</b>	2002342	5.90	844114	0.84	6.74
<b>KALIGN</b>	2003725	5.91	814230	0.51	6.41
<b>MUSCLE</b>	2001194	5.89	790595	0.22	6.11
<b>MULTALIN</b>	2010740	5.92	773270	10	<b>*15.92</b>



**Tabla 9.** Variaciones genéticas encontradas con el alineamiento múltiple de las secuencias parciales del gen *CSP*.

<b>Aislado</b>	<b>Mutación</b>	<b>Inserción</b>	<b>Delección</b>
<b>B20 HJM</b>	A → T posición 685		
<b>100A HJM</b>	A→G posición 489, C→ T 493, A→C 494, A→T 495, A→G 496, A→T 497, A→T 507, A→G 508	G posición 631	
<b>435A HJM</b>	A→T posición 507, →A→G posición 508		posición 489-500
<b>262A HJM</b>	A→G posición 489, C→T 493, A→C 494, A→T 495, A→G 496, A→T 497, A→T 507, A→G 508		
<b>B11 HJM</b>	G→A posición 179,	G posición 19, G posición 31, T posición 111, C posición 135, G posición 177, T posición 186	posición 248
<b>314A HJM</b>	A→T posición 507, A→G posición 508, A→T posición 685		posición 489, 666
<b>394A HJM</b>	A→G posición 489, C→T posición 493, A→C posición 494, A→T posición 495, A→G posición 496, A→T posición 497, A→T posición 507, A→G posición 508		
<b>373C HJM</b>	C→G posición 1, A→C posición 2		posición 489-500
<b>B43 HJM</b>		A posición 19,	posición 52
<b>B21 HJM</b>	C→T posición 62		
<b>312B HJM</b>	G→A posición 27		
<b>B18 HJM</b>	G→T posición 51	C posición 660	
<b>385B HJM</b>	A→C posición 175	G posición 101, G posición 111, A posición 176, G posición 177, A posición 237, T posición 546	posición 586, 632
<b>392A HJM</b>	C→A posición 13, C→T posición 62, G→A posición 528, T→A posición 548, G→A posición 549		posición 489 -527
<b>B23 HJM</b>	G→A posición 528, T→A en posición 548, G→A posición 549		posición 489 -527
<b>B4 HJM</b>	A→C posición 2, G→A posición 528		posición 489 -527

<b>270B HJM</b>	G→A posición 27, C→T posición 236, C→A posición 515, C→T posición 547, T→G posición 548, C→T posición 640, T→A posición 641, C→T posición 643, T→G posición 644	C posición 130, A posición 135, C posición 237, G posición 247, A posición 256, A posición 261, G posición 283, T posición 296, A posición 305, A posición 334, A posición 342, A posición 345, C posición 379, C posición 397, C posición 429, C posición 444, G posición 459, C posición 516, T posición 517, C posición 524, C posición 546, G posición 563, C posición 557, A posición 589, G posición 611, G posición 621, C posición 660,	posición 53
<b>A36 CV</b>	A→T posición 685		
<b>176A CV</b>		G posición 477, A posición 478, C posición 479, T posición 480, T posición 481, C posición 482, T posición 483, G posición 484, T posición 485, C posición 486, C posición 487, C posición 488	
<b>*257C CV</b>	*	*	*
<b>235A CV</b>	C→G posición 1, A→C posición 2		
<b>233A CV</b>	C→G posición 10, T→C posición 3	G posición 477, A posición 478, C posición 479, T posición 480, T posición 481, C posición 482, T posición 483, G posición 484, T posición 485, C posición 486, C posición 487, C posición 488	
<b>A10 CV</b>	A→C posición 10, A→T posición 685		
<b>*A35 CV</b>	*	*	*
<b>A28 CV</b>	A→T posición 685		
<b>222A CV</b>	A→G posición 489,	C posición 48, A posición 412,	posición

	C→T posición 493, A→C posición 494, A→T posición 495, A→G posición 496, A→T posición 497, G→C posición 499, A→T posición 507, A→G posición 508, G→C posición 629, C→A posición 659	A posición 537,G posición 621, G posición 631	661,662
<b>9A CV</b>	T→G posición 88, T→A posición 102		Posición 36, 84

HJM: Hospital Juárez de México

CV: Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana

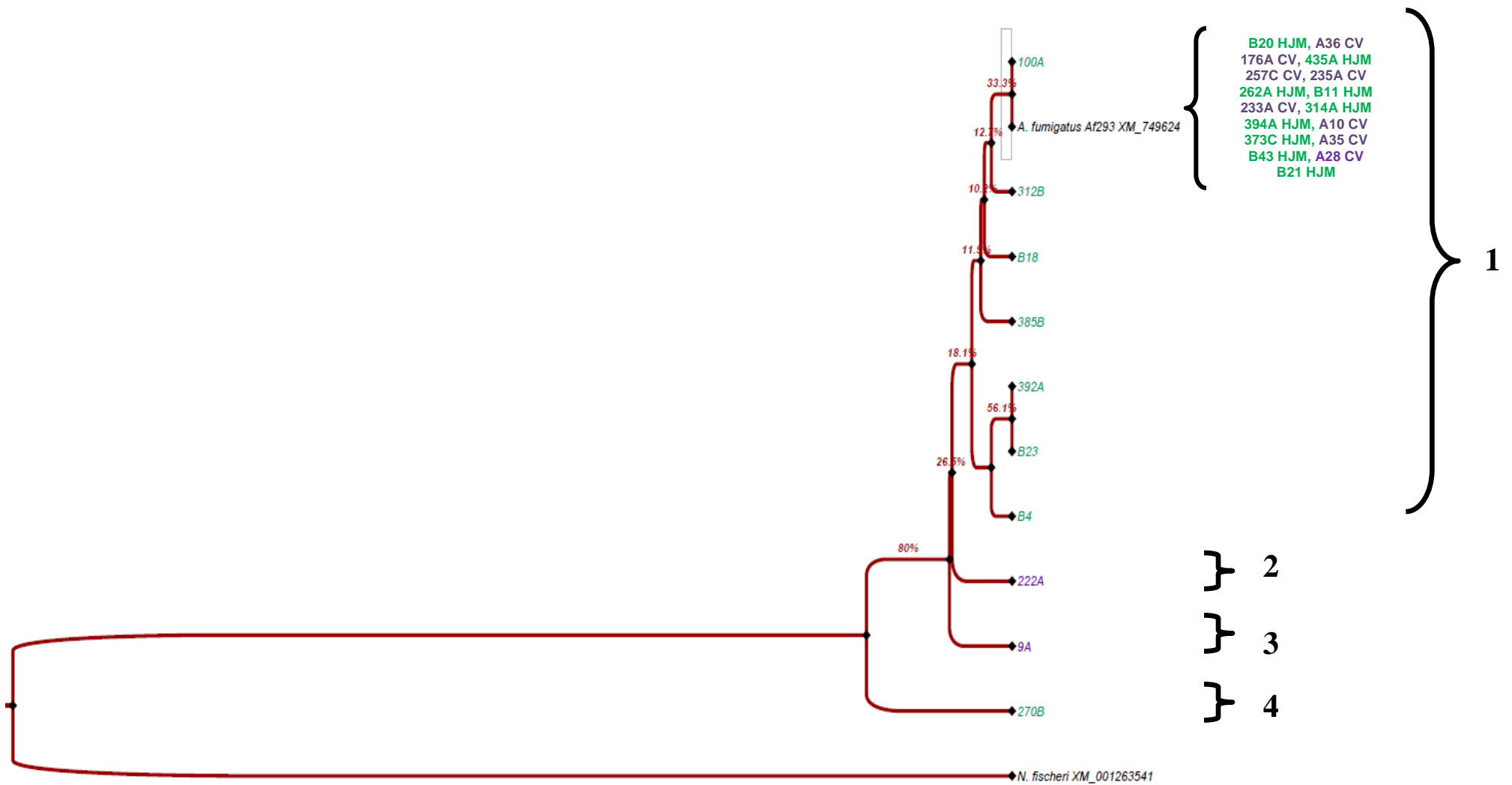
\* Secuencias que mostraron las mismas mutaciones

## 8.8. Selección de modelo evolutivo

De acuerdo con los criterios de AIC, BIC, DT y LH determinados con el programa jModeltest versión 2.1.3, el mejor modelo evolutivo para la realización del árbol filogenético fue JC (Jukes-Cantor).

## 8.9. Construcción del árbol filogenético

La construcción del árbol filogenético se realizó con el programa MEGA6 versión 6.0, utilizando el alineamiento múltiple de Multalin y el método de reconstrucción filogenética UPGMA. El dendrograma muestra la formación de cuatro grupos. El grupo 1 se formó con 24 aislados de los dos hospitales, 16 de los cuales se obtuvieron del HJM (B20, 100A, 435A, 262A, B11, 314A, 394A, 373C, B43, B21, 312B, B18, 385B, 392A, B23, B4) y ocho del CV (A36, 176A, 257C, 235A, 233A, A10, A35, A28), en este grupo también se integró la secuencia de *A. fumigatus* Af293, utilizada como control en el análisis. Los grupos 2 (222A) y 3 (9A) fueron integrados por aislados obtenidos del CV, mientras que el grupo 4 (270B) se formó con un aislado procedente del HJM. El grupo externo (*N. fischeri*) permaneció fuera de estas agrupaciones. El árbol filogenético se validó por el método de bootstrap, con valores de hasta 80% (figura 19).



**Figura 19.** Árbol filogenético con base en el método UPGMA de 27 secuencias parciales del gen *CSP* de aislados ambientales de *A. fumigatus* procedentes de dos hospitales de la Ciudad de México (HJM y CV). El grupo testigo fue *A. fumigatus* Af293 y el grupo externo *N. fischeri*. En color verde se muestran los aislados del HJM, color morado los aislados del CV. Del lado derecho se señalan los cuatro grupos encontrados. Los números sobre las ramas corresponden a los valores porcentuales de bootstrap.

---

---

## 9. Discusión

En los últimos años se ha reportado un aumento en el número de casos de AI en diferentes países europeos (38), mientras que en México la información sobre la incidencia de esta micosis es escasa. Sin embargo, dado que en nuestro país ha incrementado la población susceptible a desarrollar la AI, es posible que la incidencia de esta micosis aumente. Por lo que es necesario contar con herramientas que apoyen en el diseño de medidas apropiadas, tales como la utilización de luz UV y filtros HEPA para la prevención y control de posibles brotes de AI nosocomial. Para estos fines, las técnicas de tipificación molecular son las más adecuadas, ya que permiten conocer la variabilidad o clonalidad entre diferentes aislados, y con ello identificar reservorios, vías de transmisión y dispersión de probables clonas multirresistentes en los centros hospitalarios (24). Diferentes técnicas han sido empleadas en la tipificación genotípica de *A. fumigatus*, como RAPD, AFLP, RFLP, MLST, STR y tipificación **CSP** (tabla 1). De éstas, destaca la tipificación **CSP**, propuesta por Hurst *et al.* (30), debido a que ha sido evaluada por diferentes autores, quienes han reportado un alto poder discriminatorio en aislados de *A. fumigatus* (6). Por lo que en este trabajo, se empleó la tipificación **CSP** para analizar 27 aislados ambientales de *A. fumigatus*, provenientes de dos hospitales de la Ciudad de México.

Inicialmente, se pretendía confirmar molecularmente la identificación de los 27 aislados, mediante la amplificación y secuenciación de una región parcial del gen **CaM** (15). No obstante que esta región ha sido reportada como un buen marcador en estudios de filogenia de *Aspergillus* spp. (29, 33), en los aislados procedentes de México no se obtuvo una amplificación adecuada, aun cuando se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de los componentes de la PCR para tratar de ajustar las condiciones de reacción. Estos hallazgos proporcionan evidencias de que los aislados de *Aspergillus* spp. procedentes de México presentan alto nivel de variabilidad genética con respecto a los de otros orígenes geográficos. Esta variabilidad genética entre aislados fúngicos procedentes de diferentes regiones del mundo ha sido reportada por Duarte-Escalante *et al.* (22), quienes analizaron los marcadores AFLP obtenidos de aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* procedentes de diferentes países, y encontraron que los aislados están altamente estructurados con respecto al origen geográfico y fuente de aislamiento. Esta variabilidad relacionada con el origen

---

---

de los aislados también ha sido reportada en otros hongos. Por ejemplo, Carter, *et al.* (16), utilizando marcadores SNP y un microsatélite, demostraron que existe una clara diferenciación genética entre los aislados del hongo *Histoplasma capsulatum* procedentes de Norte América con los procedentes de Sudamérica, particularmente Colombia. De ahí la importancia de obtener marcadores moleculares que puedan ser aplicados en diferentes áreas geográficas, de tal manera que se puedan comparar resultados y obtener un conocimiento verdadero sobre la taxonomía de *Aspergillus* spp.

Aunque que no se logró la identificación genotípica de los 95 aislados involucrados en este estudio, se procedió a la tipificación *CSP* de los aislados caracterizados como *A. fumigatus* con base en su fenotipo, ya que el gen *CSP* es específico para este hongo (6, 30). Respecto a los genotipos *CSP* encontramos 5 que han sido reportados en la literatura (t01, t02, t03, t04A, t10) y 2 que no habían sido reportados, lo que demuestra una vez más que la variabilidad de *A. fumigatus* está relacionada con el origen geográfico, ya que los genotipos reportados en la literatura corresponden a aislados de otros países como Australia, China y Holanda. (37). El genotipo de mayor incidencia entre los aislados estudiados fue el t04A lo cual concuerda con otros estudios en donde se han analizado aislados clínicos como ambientales (37). Las secuencias parciales del gen *CSP* lograron ubicar a los 27 aislados de *A. fumigatus*, en cuatro genotipos diferentes (grupos 1-4), cada genotipo estuvo representado por un aislado, excepto el grupo 1, que se integró por 24 aislados procedentes de los dos hospitales (16 del HJM y 8 del CV) y la secuencia de referencia de *A. fumigatus* Af293. Estos aislados, a pesar de estar integrados en un solo grupo, presentaron genotipos diferentes, debido a la presencia de mutaciones, deleciones e inserciones (tabla 10), excepto los aislados 257C del HJM y A35 del CV, que mostraron un genotipo idéntico, no obstante que proceden de distintos hospitales.

El dendrograma revela variabilidad genética entre los aislados ambientales de *A. fumigatus*, obtenidos de dos hospitales ubicados a una distancia de 10.9 km entre ellos. La existencia de variabilidad y de genotipos clonales de aislados procedentes de las dos instituciones incluidos en un mismo grupo (grupo 1), puede deberse a la dispersión del hongo a través de las corrientes de aire, ya que los conidios de *A. fumigatus* tienen una alta capacidad de dispersión, aun con una mínima perturbación



---

---

o corriente de aire, gracias a su notable hidrofobicidad, y contenido de melanina en la pared celular, la cual les confiere resistencia contra los rayos ultravioleta y favorece su persistencia en el ambiente (13, 58). Cabe mencionar que aunque todas los conidios producidos en las hifas aéreas o conidióforos de *Aspergillus* spp. son hidrofóbicos, el grado varía de leve a altamente hidrofóbica, lo cual afecta la eficiencia de la dispersión del conidio. Los conidios de *A. fumigatus* son considerablemente más hidrofóbicos que los de otras especies de *Aspergillus*, como *A. nidulans*, lo que explica que *A. fumigatus* sea la especie más prevalente tanto en ambientes intra como extramuros (10, 64).

La variabilidad genética encontrada entre los aislados estudiados concuerda con lo reportado por otros autores (54, 17, 28), quienes asocian esta variabilidad a procesos de recombinación genética, ya que este hongo presenta una fase sexual (42), así como a mutaciones (51). Esta variabilidad encontrada entre los aislados ambientales de *A. fumigatus* puede tener implicaciones relevantes en la clínica, ya que propicia el origen de aislados con nuevos genotipos asociados a una mayor virulencia, una mayor habilidad para evadir la respuesta inmune del hospedero e incluso al desarrollo de diferentes manifestaciones clínicas, así como resistencia a los antifúngicos (16, 2).

No obstante que la tipificación *CSP* reveló la presencia de 4 grupos o genotipos diferentes entre los aislados de *A. fumigatus* estudiados, el marcador tiene limitaciones, ya que no logró discriminar entre los aislados del grupo 1, ya que todos poseen diferentes genotipos, excepto los aislados 257C y A35 del CV. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Balajee *et al.* (7), quienes explican que esto se debe a eventos de microvariación asociados a la inestabilidad de los microsatélites la cual puede ocurrir debido a la polimerasa y al deslizamiento de la hebra durante la replicación (7). Por lo que la aplicación de este método de tipificación para discriminar entre aislados clínicos y ambientales de *A. fumigatus* en brotes nosocomiales debe ser interpretada cuidadosamente.

---

---

## **10. Conclusiones**

Se logró tipificar los aislados de *A. fumigatus* recuperados del ambiente de dos hospitales de la Ciudad de México, con base en las secuencias parciales del gen *CSP*. Se encontró que solo dos aislados presentaron clonalidad y el resto de los aislados presentaron gran variabilidad genética. Se encontraron 7 genotipos *CSP* dos de los cuales no habían sido reportados anteriormente.

## **11. Perspectivas**

A partir del estudio y discusiones presentados en este trabajo, las perspectivas se orientan principalmente, en el caso del gen de *CaM*, al rediseño de los oligonucleótidos y respecto al gen *CSP*, a su implementación para el análisis de brotes de aspergilosis nosocomial en México, ya que este tipo de estudios son escasos en nuestro país.

---

---

## 12. Glosario

**AFLP** (Amplified fragment length polymorphism): Esta técnica se basa en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción de un digerido total de DNA genómico. La técnica consiste en tres etapas: 1. restricción del DNA y ligación de adaptadores de oligonucleótidos, 2. la amplificación selectiva de los conjuntos de fragmentos de restricción, y 3. análisis en gel de los fragmentos amplificados. La amplificación por PCR de fragmentos de restricción se logra mediante el uso de la secuencia del sitio de restricción-adaptador y como sitios diana para la hibridación del oligonucleótido. La amplificación selectiva se logra mediante el uso de oligonucleótidos que se extienden dentro de los fragmentos de restricción, amplificando sólo aquellos fragmentos en los que las extensiones del oligonucleótido coinciden con los nucleótidos que flanquean los sitios de restricción.

**AIC** (Akaike Information Criterion): Criterio de información para la selección de modelo evolutivo. Compara simultáneamente todos los modelos en competición y permite seleccionar modelos. Constituye un estimado formal de la divergencia, entre el modelo verdadero y el que se somete a prueba. Puede ser interpretado como un estimado de la probabilidad con un factor de corrección para penalizar los modelos que tienen demasiados parámetros.

**BIC** (Bayesian information criterion): Criterio de información para la selección de modelo evolutivo, se basa en la verosimilitud integrada en la teoría bayesiana, además compara simultáneamente todos los modelos en competición y permite seleccionar modelos, pero comparado con AIC penaliza los modelos complejos de manera más fuerte.

**IEA** (Isoenzyme analysis): El análisis de isoenzimas o MLEE (multi locus enzyme electrophoresis) podría definirse como un método genético indirecto, que analiza la movilidad electroforética de un número concreto (generalmente entre 15 y 20) de enzimas metabólicas en geles de almidón o poliacrilamida. Las variaciones observadas en estas movilidades corresponden con variaciones en el locus o gen codificante de cada enzima. Por lo tanto, cada variante se define como "variante alélica" y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico que a su vez define el tipo electroforético.

**IGS** (Intergenic spacer regions): Son regiones específicas del genoma, muy útiles para la realización de análisis molecular. Las copias adyacentes de la unidad repetitiva DNAr se encuentran separadas por la región IGS, la cual generalmente es más variable que la ITS y contiene a menudo elementos subrepetitivos, los cuales se piensa que funcionan como aumentadores de la transcripción.

**JC** (Jukes-Cantor): El modelo de evolución de nucleótidos más sencillo es el conocido como Jukes-Cantor y asume que cualquier cambio entre nucleótidos tiene la misma probabilidad de ocurrir y que las frecuencias de los cuatro nucleótidos son iguales.

---

---

**LH** (Verosimilitud): Bajo el enfoque probabilístico de verosimilitud, se examina la probabilidad de que el árbol obtenido explique los datos observados.

**MLP** (Microsatellite length polymorphism): El análisis MLP consiste en la amplificación por PCR de aislados que contienen secuencias microsatélites utilizando oligonucleótidos específicos y el dimensionamiento preciso de los productos de PCR con un secuenciador automático. Una sola diferencia de tamaño entre los loci de microsatélites conduce a un genotipo diferente. Tiene la capacidad para detectar mezclas de aislados.

**MLST** (Multilocus sequence typing): Mide directamente las variaciones de la secuencia de DNA en un conjunto de genes seleccionados y caracteriza cepas por sus perfiles alélicos únicos. El principio de MLST es simple: la técnica consiste en la amplificación por PCR seguida de secuenciación de DNA. Este método permite la identificación de grupos de microorganismos con genotipos idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales). Esto permite identificar todas las variaciones, no sólo aquellas que produzcan un cambio en la movilidad electroforética de la enzima codificante.

**Modelos evolutivos:** Son descripciones matemáticas de la evolución de las secuencias y constituyen el engranaje que nos permite conectar los datos (alineamientos) con los métodos de reconstrucción filogenética. En función de lo que consideremos la unidad de evolución, existen modelos para nucleótidos, aminoácidos o codones.

**MSP** (Microsatellite polymorphism): Existen en el DNA numerosas regiones donde se encuentran secuencias repetidas (microsatélites), las cuales se pueden identificar utilizando iniciadores de PCR que hibridan secuencias únicas que flanquean los microsatélites. Estos polimorfismo difieren en el número de repeticiones; cada sitio en un cromosoma que contenga repeticiones tiene un número diferente de copias de las repeticiones en la población. Estos polimorfismos son codominantes.

**PMM** (Polymorphic microsatellite markers): Se basa en la PCR, los cebadores que flanquean estas repeticiones (CA) se diseñan para amplificar cada locus. Un cebador de cada par se marca con un fluoróforo, y los productos de PCR se analizan con un secuenciador automático y software. A cada banda se le asigna un alelo, esto cuando el organismo es haploide.

**RAMS** (Random amplified microsatellites): Los RAMS se basan en la PCR, el método es altamente reproducible y permite la detección de polimorfismo en el DNA intra e interespecífico. Los fragmentos de DNA amplificados en la reacción están compuestos de dos microsatélites suficientemente cercanos para amplificar por PCR el área entre ellos. Este método utiliza un solo oligonucleótido de secuencia

---

---

arbitraria, por lo cual la secuencia blanco también es desconocida; difiere de los RAPD porque estos tienen menor tamaño del oligonucleótido que los RAMS. Al igual que los RAPD, los RAMS detectan un solo alelo por locus.

**RAPD** (Random amplified polymorphic DNA): Este método consiste en usar varios oligonucleótidos de secuencia arbitraria, para realizar reacciones de PCR independientes. Las muestras se analizan por electroforesis buscando aquellas que presenten patrones reproducibles de bandas bien definidas y distintivas.

**REA** (Restriction endonuclease analysis): Este método implica la comparación de la cantidad y el tamaño de fragmento producido por la digestión del DNA cromosómico con una endonucleasa de restricción que corta el DNA en una posición constante dentro de un sitio de reconocimiento específico, por lo general compuesta de 4 a 6pb. Debido a la alta especificidad de la endonucleasa de restricción se obtiene un conjunto de fragmentos. La separación de los fragmentos es por electroforesis.

**RFLP** (Restriction fragment length polymorphism): Es un método que detecta polimorfismos en la molécula de DNA, detectables mediante variaciones en los fragmentos de restricción generados por el tratamiento con enzimas de restricción.

**SSDP** (Sequence specific DNA primer): Es un método de tipificación que utiliza PCR desarrollado a partir de RAPD y utilizando oligonucleótidos específicos. Este método utiliza PCR a una mayor rigurosidad, evitando así el inconveniente de la falta de reproducibilidad del método RAPD. Este método se ha utilizado siempre y validado para la investigación de la diversidad genética de *A. fumigatus*.

**STR** (Short tandem repeat): Son regiones de secuencias repetidas (conocidas también como microsatélites) que están distribuidas a lo largo del genoma. Dichas regiones repetidas presentan un alto nivel de polimorfismo, aunque están bordeadas por secuencias altamente conservadas a nivel de especie. Como consecuencia de esta característica, dichas secuencias pueden ser amplificadas por PCR usando oligonucleótidos específicos. Los marcadores de este tipo son usados para identificar polimorfismos entre genotipos, pues permiten la detección (de la presencia o ausencia) de alelos específicos.

**Southern blot:** Es un método de hibridación en donde se extrae el DNA, se aísla y se corta con una enzima de restricción. Los fragmentos se ordenan por tamaño en un gel de agarosa en un campo eléctrico. Los fragmentos más pequeños migran más rápido del cátodo al ánodo; los fragmentos más grandes migran más lento. Luego los fragmentos contenidos en el gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de nylon, donde el DNA se desnaturaliza con álcali y se fija a la membrana mediante calentamiento o UV, la muestra se incuba con una sonda de DNA de cadena simple, la sonda hibrida solo con el fragmento complementario buscado y no con otros.

---

---

### 13. Referencias

- 1) Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev. Iberoam. Micol. 2000; 17: S79-S84.
- 2) Álvarez-Pérez S, Blanco JL, Alba P, García ME. Sexualidad y patogenicidad en *Aspergillus fumigatus*: ¿existe alguna relación? Rev. Iberoam. Micol. 2010; 27: 1-5.
- 3) Anderson MJ, Gull K, Denning DW. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 87-93.
- 4) Aufauvre-Brown A, Cohen J, Holen DW. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2991-2993.
- 5) Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NAR, Odds FC. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 2007; 45: 1469-1477.
- 6) 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. 2007; 6: 1392-1399.
- 7) Balajee SA, de Valk HA, Lasker BA, Meis JFGM, Klaassen CHW. Utility of a microsatellite assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Microbiol. Methods. 2008; 73:252-256.
- 8) Bart-Delabesse E, Jean-Francois H, Delabesse É, Bretagne S. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 2413-2418.
- 9) Bart-Delabesse E, Sarfati J, Debeauvais JP, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Bretagne S, Latge JP. Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 2683-2686.
- 10) Beever RE, Dempsey GP. Function of rodlets on the surface of fungal spores. Nature. 1978; 272: 608-610.
- 11) Bertout FR, Barton R, Symoens F, Burnod J, Piens MA, Lebeau B, Viviani A, Chapuis F, Bastide M, Grillot R, Mallié M. Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: Investigation using multiple typing methods. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 1731-1737.

- 
- 
- 12) Borges SM, Fiederling AL. Presentaciones clínicas de la aspergilosis nosocomial. Rev. Iberoam. Micol. 2000; 17: S85-S89.
- 13) Brakhage AA, Liebmann B. *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. Med. Mycol. 2005; 43:S75-82.
- 14) Cano J, Soler M. Epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes de aspergilosis nosocomial. Rev. Iberoam. Micol. 2000; 17: S97-S99.
- 15) Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycol. 1999; 91: 553-556.
- 16) Carter DA, Taylor JW, Dechairo B, Burt A, Koenig GL, White TJ. Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)(n) microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. Fungal Genet. Biol. 2001; 34: 37-48.
- 17) Debeaupuis JP, Sarfati J, Chazalet V, Latgé JP. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. Infect. Immun. 1997; 65: 3080-3085.
- 18) Del Palacio A, Cuétara MS, Pontón J. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. Rev. Iberoam. Micol. 2003; 20: 90-98.
- 19) Del Palacio A, Cuétara MS, Pontón J. La aspergilosis invasora. Rev. Iberoam. Micol. 2003; 20: 77-78.
- 20) De Valk HA, Meis JFGM., de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CHW. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 2007; 45: 1415-1419.
- 21) De-Xing Z. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. Trends Ecol. Evol. 2004; 19(10): 507-509.
- 22) Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Nava Ramírez O, Córdoba S, Refojo N, Arenas R, Delhaes L, Reyes-Montes MR. Population structure and diversity in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolates from different sources and geographic origins. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104: 427-433.

- 23) Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2004; 22: 355-360.
- 24) Fernández-Cuenca F, López CL, Pascual HA. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de infección. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2013; 31: 20-25.
- 25) García VC, Carratalá J. Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2012; 30: 151-158.
- 26) Girardin H, Monod M, Latgé JP. Molecular characterization of the food-borne fungus *Neosartorya fischeri* (Malloch and Cain). *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 1378-1383.
- 27) Guarro J, Solé M, Castany R, Cano J, Teixidó A, Pujol I, Gene J, Castro A, Sarda P. Use of random amplified microsatellites to type isolates from an outbreak of nosocomial aspergillosis in a medical Ward. *Med. Mycol.* 2005; 43: 365-371.
- 28) Guinea J, García VD, Pelaéz T, Escribano P, Muñoz P, Meis JF, Klaassen CHW, Bouza E. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus*: an in-depth genotypic analysis of isolates involved in an outbreak of invasive *Aspergillosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 3498-3503.
- 29) Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycol.* 2005; 97: 1316-1329.
- 30) Hurst SF, Kidd SE, Morrissey CO, Snelders E, Melchers WJG, Castelli MV, Mellado E, Simmon K, Petti CA, Richardson S, Zhang S, Romanelli AM, Wickes BL, de Valk HA, Klaassen CHW, Balajee AA. Interlaboratory reproducibility of a Single-Locus sequences-based method for strain typing of *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 1562-1564.
- 31) Katsuhiko Y, Katsuhiko K, Katsuya G, Chieko K, Yoshikazu O, Gakuzo T. Cloning and nucleotide sequence of the calmodulin-encoding gene (cmdA) from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995; 59: 1444-1449.
- 32) Klaassen HWC, de Valk AH, Balajee AA, Meis FGMJ. Utility of CSP typing to sub-type clinical *Aspergillus fumigatus* isolates and proposal for a new CSP type nomenclature. *J. Microbiol. Methods.* 2009; 77: 292-296.
- 33) Krimitzas A, Pyrri I, Kouvelis, Kapsanaki-Gotsi E, Typas MA. A phylogenetic analysis of greek isolates of *Aspergillus* species based on morphology and nuclear and mitochondrial gene sequences. *BioMed. Res. Int.* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/260395>.



- 
- 
- 34) Lasker Brent A. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 2886-2892.
- 35) Levdansky E, Romano J, Shadkchan Y, Haim S, Verstrepen KJ, Fink GR, Osherov N. Coding tandem repeats generate diversity in *Aspergillus fumigatus* genes. Eukar. Cell. 2007; 6: 1380-1391.
- 36) Lin D, Lehmann FP, Hamory HB, Padhye AA, Durry E, Pinner RW, Lasker BA. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 1596-1601.
- 37) Lu-Juan G, Yi S, Zhe W, Ruo-Yu L, Jin Y. CSP typing of chinese *Aspergillus fumigatus* isolates: identification of additional CSP types. Med. Mycol. 2013; 51: 683-687.
- 38) Marr KA, Carter FC, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin. Infect. Dis. 2002; 34: 909-917.
- 39) Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin. Infect. Dis. 1993; 17:153.
- 40) Merchant Larios Horacio. Biología celular y molecular. Primera edición. Pearson Educación, 2002.
- 41) Müller-Sterl Werner. Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. Segunda edición. Editorial Reverté. 2008.
- 42) O'Gorman CM, Fuller H, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature. 2009; 457: 471-474.
- 43) O'Gorman MC. Airborne *Aspergillus fumigatus* conidia: a risk factor for aspergillosis. Fungal Biol. Rev. 2011; 25:151-157.
- 44) Pasqualotto CA. Aspergillosis: From diagnosis to prevention. 2ed. Springer, 2010.
- 45) Phillips-Mora W, Rodríguez H, Fritz JP. Marcadores de DNA: Teoría y aplicaciones de protocolo de trabajo. CATIE. 1995.

- 
- 
- 46) Pontón J, Cabañes FJ. *Aspergillus* y aspergilosis nosocomial. Rev. Iberoam. Mycol. 2000; 17: s77-s78.
- 47) Radford SA, Johnson EM, Leeming JP, Millar MR, Cornish JM, Foot AB, Warnock DW. Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences. J. Clin. Microbiol. 1998; 36 (5): 1294-1299.
- 48) Rasmussen CD, Raylene LM, Kun PL, Gregory SM, Means AR. Characterization and expression of the unique calmodulin gene of *Aspergillus nidulans*. The J. Biol. Chem. 1990; 265: 13767-13775.
- 49) Refojo N, Duarte-Escalante E, Dignani MC, Hevia AI, Abrantes RA, Davel G, Canteros C, Frías de León MG, Acosta-Altamirano G, Zuñiga G, Reyes-Montes MR. Genotipificación de aislamientos clínicos de *Aspergillus flavus* y su relación con aislamientos ambientales de un centro oncohematológico. Rev. Iberoam. Micol. 2013; 30: 25-30.
- 50) Rinyu E, Varga J, Ferenczy L. Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 2567-2575.
- 51) Rivera Coto G. Conceptos introductorios a la fitopatología. 1ª ed. Costa Rica. Editorial universidad estatal a distancia; 2007.
- 52) Rivera KG, Seifert KA. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. Stud. Mycol. 2011; 70: 139-158.
- 53) Rocha SPJ. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. Palm. 2003; 24: 1-15.
- 54) Rosehart K, Richards MH, Bidochka MJ, Microsatellite analysis of environmental and clinical isolates of the opportunist fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. J. Med. Microbiol. 2002; 51: 1128-1134.
- 55) Rohini JM, Kibbler CC. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. J. Hosp. Infec. 1998; 39: 95-109.
- 56) Samson RA. Food Mycology: A multifaceted Approach to Fungi and Food. CRC Press, 2007.

- 
- 
- 57) Soriano del Castillo M. Micotoxinas. 1ª ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2007.
- 58) Taha MP, Pollard SJ, Sarkar U, Longhurst P. Estimating fugitive bioaerosol releases from static compost windrows: feasibility of a portable wind tunnel approach. *Waste Manag.* 2005; 25:445-450.
- 59) Treviño-Castellano M, Rodríguez-Novoa S, Llovo-Taboada J, García-Zabarte A, García-Riestra C, Regueiro-García B. Combined use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and touchdown polymerase chain reaction (PCR) for *Aspergillus fumigatus* epidemiologic studies. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2003; 21: 472-476.
- 60) Unda F, Agüero J, Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2011; 29:282-285.
- 61) Vanhee LME, Symoens F, Nelis HJ, Coenye T. Microsatellite typing of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from deep organ samples of patients with invasive aspergillosis. *Diagnostic Microbiol. Infect. Disease.* 2008; 62: 96-98.
- 62) Warris A, Klassen HW, Meis JFGM, de Ruyter MT, de Valk HA., Abrahamsen TG, Gaustad P, Verweij PE. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 4101-4106.
- 63) Warris A, Voss A, Verweij PE. Hospital sources of *Aspergillus*: New routes of transmission? *Rev. Iberoam. Micol.* 2001; 18:156-162.
- 64) Yassin MF, Almouqatea S. Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 2010; 7: 535-544.
- 65) You-Chun L, Korol AB, Tzion F, Avigdor B, Eviatar N. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 2002; 11: 2453-2465.
- 66) Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 2002; 11: 1-16.
- 67) Zavala-Ramírez AOM. Modo de Reproducción y variación genética de aislados del hongo *Aspergillus fumigatus* obtenidos en México y otros países [tesis de maestría]. México: IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2011.