



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA ASPERGILOSIS MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE PATRONES POLIMÓRFICOS RAPD-PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CINCO ESPECIES DE *ASPERGILLUS* CON IMPORTANCIA MÉDICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CASTRO FUENTES CARLOS ALBERTO

DRA. MARÍA DEL ROCÍO ALICIA REYES MONTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/242/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **17 de enero de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **CASTRO FUENTES CARLOS ALBERTO** con número de cuenta **520019294** con la tesis titulada **“DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA ASPERGILOSIS MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE PATRONES POLIMÓRFICOS RAPD-PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CINCO ESPECIES DE *Aspergillus* CON IMPORTANCIA MÉDICA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL ROCÍO ALICIA REYES MONTES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
Vocal: DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
Vocal: DRA. MARTHA LYDIA MACIAS RUBALCAVA
Vocal: DRA. ROSA ARELI MARTÍNEZ GAMBOA
Secretario: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de marzo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Al Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) por la formación recibida

Al CONACYT por el apoyo otorgado para la realización de la maestría

En especial a...

Dra. Maria del Rocio Alicia Reyes Montes
Dra. María Del Carmen Auxilio González Villaseñor
Dra. Concepción Toriello Nájera

Agradezco enormemente al equipo de la Dra. Reyes por haberme recibido de la mejor manera posible, cada uno compartió conmigo de sus conocimientos y me brindó su valiosa amistad.

Dra. Reyes gracias por la confianza, por enseñarme con paciencia, alegría y darse el tiempo para ayudarme a transitar este camino formativo.

Dra. Esperanza le agradezco la oportunidad de integrarme a este proyecto tan interesante e innovador.

Dr. Omar gracias por ser mi compañero de laboratorio, por enseñarme a cuestionarme tantas cosas y buscar responder a ellas. Agradezco la paciencia, y el tiempo que pasamos también en el trayecto a casa. Además, por tu valiosa aportación a este proyecto.

Maestra Angélica, cuando nos conocimos, fue emocionante saber que había en el mismo laboratorio alguien más, intentado alcanzar una meta semejante, te volviste colega, complice, maestra y amiga. Gracias por compartirme parte de tus conocimientos empíricos e intelectuales.

Q.F.B. Ana, fuiste la primera persona que me enseñó técnicas de biología molecular, por lo que estoy tan agradecido contigo, también por que fuiste pieza importante en este maravilloso producto que entrego. Gracias por eso y por tu amistad.

Q.F.B. Isai, te agradezco el tiempo de enseñanza, al igual que tu aportación al proyecto.

Quiero agradecer a todas las personas que me proporcionaron una o varias palabras alentadoras para lograr lo que hoy logré.

Gracias por confiar

Dedico con mucho cariño este producto a una mujer tan especial en mi vida, una persona que siempre me ha alentado a perseguir mis sueños, a no rendirme, a ser constante, a aprender de los fracasos, y entender que mejores cosas vienen.

Gracias, por escucharme, consolarme, apoyarme en todos los sentidos, por creer en mi incluso cuando yo no lo hacía. Gracias por recordarme que en la vida no siempre se gana, pero se aprende. Gracias por disfrutar mis logros y estar ahí cuando más lo necesito.

Gracias porque desde hace mas de ocho años nos hemos separado pero seguimos estando juntos.

Gracias por cuidar de mi perrhijo.

Madre gracias infinitas...

Ahora viene una agradecimiento diferente pero con mucho cariño para otra gran mujer,

Hermana, gracias por la paciencia, apoyo incondicional y confianza.

Y por último otra gran mujer

Olivita, esa mujer guerrera, trabajadora y soñadora. Abue, gracias por recordarme seguir mis sueños y buscar volar muy alto.

Gracias por el amor, apoyo y confianza

Las amo mucho...

Índice

Lista de figuras

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Características y clasificación taxonómica del género <i>Aspergillus</i>	3
1.2 Aspergilosis humana.....	7
Objetivos.....	14
2. Antecedentes.....	14
2.1 Planteamiento del problema.....	18
Hipótesis.....	19
3. Metodología.....	19
4. Resultados.....	27
5. Discusión.....	42
6. Conclusiones.....	47
7. Referencias Bibliográficas.....	48
8. Anexo (RAPD-PCR obtenidos con los 34 oligonucleótidos)	56

Lista de figuras

Figura 1. Clasificación del género *Aspergillus*

Figura 2. Morfología microscópica del conidióforo característico de *Aspergillus*

Figura 3. Ciclo de vida de *Aspergillus fumigatus*/*Neosartorya fumigata*

Figura 4. Factores de *Aspergillus* que contribuyen al éxito como patógeno oportunista

Figura 5. Cuantificación de DNA de los aislados *Aspergillus*

Figura 6. Amplificación del gen *BenA* de los aislados

Figura 7. Análisis filogenético de secuencias amplificadas con el gen *BenA*

Figura 8. Curvas ROC de los oligonucleótidos seleccionados cuantitativamente

Figura 9. Sensibilidad y especificidad de los oligonucleótidos seleccionados cualitativa y cuantitativamente

Figura 10. RAPD-PCR de *A. flavus* con el oligonucleótido OPC-06

Figura 11. RAPD-PCR de *A. fumigatus* con el oligonucleótido OPF-01

Figura 12. RAPD-PCR de *A. niger* con el oligonucleótido OPF-07

Figura 13. RAPD-PCR de *A. tubingensis* con el oligonucleótido OPG-13

Figura 14. RAPD-PCR de *A. fumigatus* y *A. lentulus* con el oligonucleótido OPF-01

Figura 15. RAPD-PCR de *A. niger* y *A. tubingensis* con el oligonucleótido OPF-07

Figura 16. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido 1281

Figura 17. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido 1283

Figura 18. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido R108

Figura 19. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido 1253

Figura 20. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPA-19

Figura 21. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPA-16

Figura 22. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPB-12

Figura 23. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPA-17

Figura 24. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPA-15

Figura 25. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPF-05

Figura 26. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPA-08

Figura 27. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPC-07

Figura 28. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPG-01

Figura 29. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPG-03

Figura 30. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPG-13

Figura 31. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPG-15

Figura 32. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPC-06

Figura 33. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPG-05
Figura 34. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPM-12
Figura 35. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPH-03
Figura 36. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPG-07
Figura 37. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPH-18
Figura 38. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPF-01
Figura 39. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPF-07
Figura 40. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPF-09
Figura 41. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPE-02
Figura 42. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido P54
Figura 43. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido P160
Figura 44. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido PELF
Figura 45. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido B04
Figura 46. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPH-17
Figura 47. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido T3B
Figura 48. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPA-02
Figura 49. RAPD-PCR de las cinco especies con el oligonucleótido OPA-03

Resumen

La aspergilosis es un grupo de enfermedades causadas por varias especies de *Aspergillus*, y afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos. Entre las especies más relevantes están *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger*; no obstante, se han reportado especies crípticas que presentan una susceptibilidad diferente a los antifúngicos, por lo que es necesario el diagnóstico temprano y confiable para su tratamiento adecuado. Como los métodos fenotípicos y genotípicos que se siguen para la identificación de las especies presentan limitaciones, el objetivo de esta investigación fue seleccionar patrones polimórficos a través de un análisis cualitativo y cuantitativo para diferenciar las especies *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. tubingensis* mediante la técnica de amplificación aleatoria de DNA polimórfico por reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Los aislados de *Aspergillus* incluidos en este estudio fueron tipificados por métodos fenotípicos (macro y micromorfología) y genotípicos (secuenciación parcial del gen *BenA*). Después, para el análisis cualitativo, se obtuvieron los patrones polimórficos de 34 oligonucleótidos y se seleccionaron los patrones especie-específicos para discriminar a cada especie. Para el análisis cuantitativo, a partir de una base de datos de los patrones polimórficos se construyeron modelos de regresión logística y se evaluó el modelo que presentó el mayor valor de sensibilidad contra especificidad a través de las curvas ROC (características operativas del receptor). La selección cualitativa mostró que los oligonucleótidos OPA-19, P54 y 1253 discriminan las diferentes especies utilizadas en el presente estudio. El análisis cuantitativo, con base en el análisis de regresión logística obtuvo una correlación especie-específica de sensibilidad y especificidad mayores al 90% para los oligonucleótidos: OPC-06 con el 96.32% para *A. flavus*, OPF-01 con el 100% para identificar a *A. fumigatus*, OPG-13 con el 98.01% para *A. tubingensis* y OPF-07 con 99.71% para *A. niger*. El oligonucleótido OPF-01, discriminó todas las especies, así como especies estrechamente relacionadas. Los resultados del análisis cuantitativo con los oligonucleótidos seleccionados permiten discriminar entre especies por lo que es evidente su utilidad para tipificar especies con relevancia médica del género *Aspergillus* permitiendo un diagnóstico oportuno y preciso.

Abstract

Aspergillosis is a group of diseases caused by various species of *Aspergillus*, and mainly affects immunocompromised patients. Among the most relevant species are *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* and *A. niger*; however, cryptic species have been reported that have a different susceptibility to antifungals, so early and reliable diagnosis is necessary for adequate treatment. As the phenotypic and genotypic methods that are followed for the identification of species have limitations, the objective of this research was to select polymorphic patterns through a qualitative and quantitative analysis to differentiate the species *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. tubingensis* by random amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). The *Aspergillus* isolates included in this study were typified by phenotypic (macro and micromorphology) and genotypic methods (partial sequencing of the *BenA* gene). Then, for the qualitative analysis, the polymorphic patterns of 34 oligonucleotides were obtained and the species-specific patterns were selected to discriminate each species. For the quantitative analysis, from a database of polymorphic patterns, logistic regression models were built and the model that presented the highest value of sensitivity against specificity was evaluated through the ROC (receiver operating characteristics) curves. The qualitative selection showed that the oligonucleotides OPA-19, P54 and 1253 discriminate the different species used in the present study. The quantitative analysis, based on the logistic regression analysis, obtained a species-specific correlation of sensitivity and specificity greater than 90% for the oligonucleotides: OPC-06 with 96.32% for *A. flavus*, OPF-01 with 100% for identify *A. fumigatus*, OPG-13 with 98.01% for *A. tubingensis* and OPF-07 with 99.71% for *A. niger*. Oligonucleotide OPF-01 discriminated all species as well as closely related species. The results of the quantitative analysis with the selected oligonucleotides make it possible to discriminate between species, which is why its usefulness for typifying species of medical relevance of the *Aspergillus* genus is evident, allowing an opportune and precise diagnosis.

1. Introducción

Género *Aspergillus*

1.1 Características y clasificación taxonómica del género *Aspergillus*

El Biólogo Italiano Pier Micheli catalogó a *Aspergillus*; posteriormente Haller (1968) validó el género y Fries (1832) confirmó el nombre genérico. El género *Aspergillus*, pertenece al orden *Eurotiales* (clase *Eurotiomycetes*), incluye más de 400 especies y, a más de 40 especies se les atribuyen infecciones oportunistas en el humano, aunque algunas de ellas solo infectan ocasionalmente (Sklenár et al., 2020) (Figura 1).

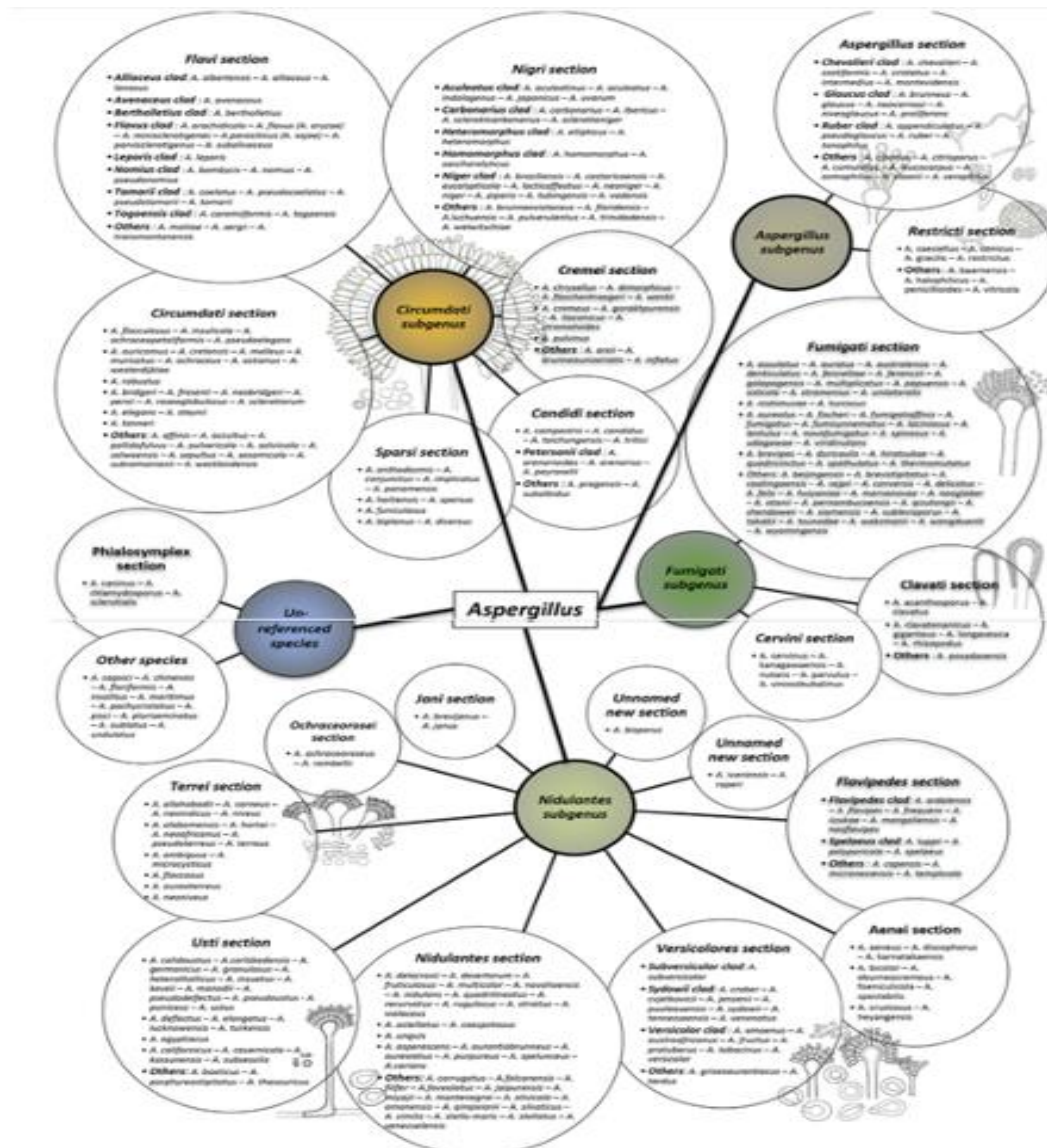


Figura 1. Clasificación del género *Aspergillus* que incluye subgéneros y secciones de las especies (Tomado de: Gautier et al., 2016).

La identificación de *Aspergillus* se realiza tradicionalmente con base en sus características morfológicas como el tamaño y la disposición de las cabezas aspergílares, el color de los conidios, la tasa de crecimiento en diferentes medios y sus características fisiológicas (Samson et al., 2014) (Figura 2). De acuerdo con estas características, Raper y Fennell (1965) dividieron al género *Aspergillus* en 18 grupos. La clasificación en grupos no tenía ningún estatus en la nomenclatura y por lo tanto Gams et al. (1985) introdujeron el nivel de subgéneros y secciones en *Aspergillus*. Estos estudios mostraron que los grupos de Raper y Fennell (1965), con base en las características fenotípicas, coinciden en gran parte con las clasificaciones actuales. Peterson (2008) aceptó cinco subgéneros y 16 secciones en *Aspergillus*.

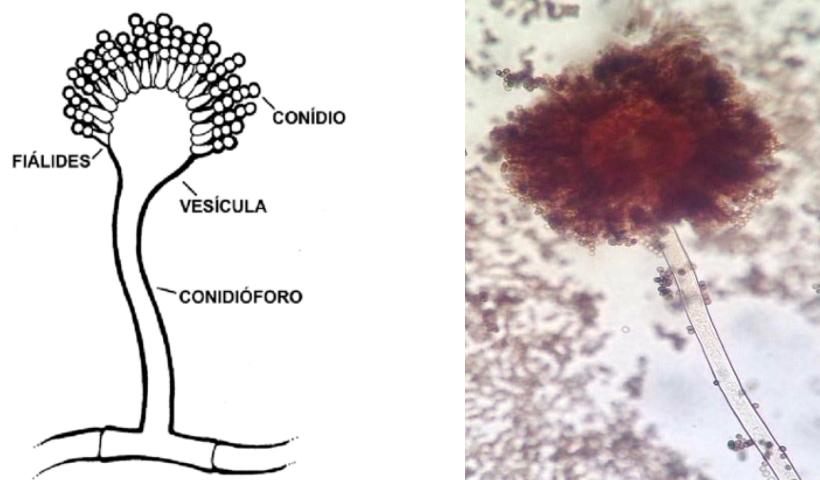


Figura 2. Morfología microscópica del aparato conidial característico del género *Aspergillus* (izquierda). Aparato conidial de *A. niger* (derecha).

Por otro lado, Houbraken et al. (2014) propusieron cuatro subgéneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* y *Nidulantes*) y 20 secciones. Posteriormente, el género *Aspergillus* fue subdividido en 8 subgéneros y 22 secciones (Samson y Varga, 2009) con 620 especies, de acuerdo con el Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>), o 577 especies en

Mycobank (<http://www.mycobank.org/>); donde los taxones anamórficos asexuales de este grupo de hongos comprenden 12 géneros sexuales o teleomórficos. Esto significa, que muchas especies de *Aspergillus* tienen dos nombres, uno para el anamorfo y otro para el teleomorfo (Figura 3).

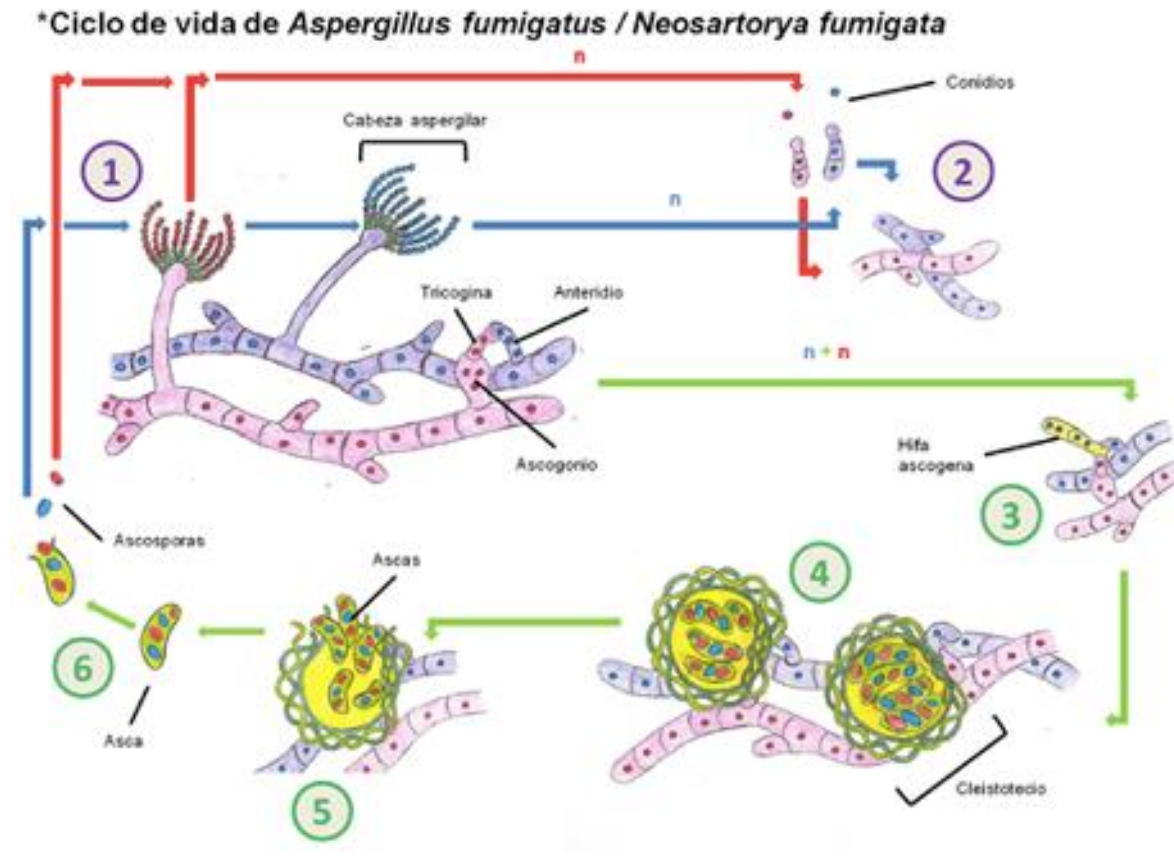


Figura 3. Ciclo de vida de *Aspergillus fumigatus* (anamorfo)/*Neosartorya fumigata* (teleomorfo). (1) Fase anamórfica del hongo. (2) Germinación de los microconidios. (3) Formación de una hifa ascógena de carácter dicariótico como consecuencia de la reproducción sexual. (4) La fase teleomórfica del hongo se caracteriza por la producción de esporas llamadas ascosporas. (5) Cuando se presentan las condiciones adecuadas los cleistotecios eclosionan. (6) Las ascas se rompen y liberan las ascosporas.

El descubrimiento de un estado sexual en las especies del género *Aspergillus* fue precedido por la identificación de genes de tipo apareamiento (*MAT*) dentro de la especie; además estos genes actúan como marcadores clave de la identidad sexual en hongos ascomicetes filamentosos (Debuchy et al., 2010). *Aspergillus fumigatus* fue la primera especie a la que

se le encontró una fase sexual (O’Gorman et al., 2009); los autores lograron reproducir en el laboratorio el ciclo sexual completo de esta especie, observando la producción de cleistotecios y ascosporas. Con base en sus relaciones filogenéticas y en la morfología de sus estructuras sexuales, el teleomorfo de *A. fumigatus* ha sido asignado al género *Neosartorya* (Phylum Ascomycota, Orden Eurotiales Familia Trichocomaceae [Index Fungorum]) y denominado *N. fumigata* (O’Gorman et al., 2009). Posteriormente, se describió la fase sexual en *A. lentulus* y *A. niger* (Swilaiman et al., 2013). Éstas son especies heterotálicas ya que una sola cepa, no es capaz de desarrollar en cultivo los cuerpos fructíferos correspondientes al teleomorfo, por lo que se necesitan dos cepas diferentes compatibles para que lo formen (Swilaiman et al., 2013).

Taxonomía del género *Aspergillus*

Aspergillus P. Micheli ex Haller, descripción modificada

Tipo genérico: *Aspergillus glaucus* (L.)

La morfología del género *Aspergillus* presenta micelio vegetativo hialino a muy pigmentado. Los conidióforos (*aspergillum*) consisten en células basales de paredes gruesas (células pie) que producen tallos, no ramificados, que terminan en el ápice inflado (vesícula) que puede ser globosa, elipsoidal o en forma de clava; los conidióforos en algunas especies pueden ser septados, carecen de una célula soporte, carecen de una vena o consisten en células conidiógenas individuales con uno o varios loci. Las células conidiógenas filídicas producen cadenas conidiales secas que se transforman directamente en la vesícula cubierta parcialmente o en su totalidad por una empalizada de filídes (uniseriada) o con una capa inferior basal de células de soporte llamadas métulas, las que soportan un pequeño número compacto de filídes (biseriada); en algunas especies, que parecen ser anélidicas o polifilídicas. Los conidios varían mucho en color, tamaño, forma y ornamentación. Algunas especies presentan cleistotecios con diversas estructuras, en su mayoría con una pared delgada de ascoma que consiste en una sola capa de redes de hifas, a veces cubiertas por capas de células de Hülle o de tipo esclerocio. Presencia de ascos globosos que generalmente contienen ocho ascosporas. Las ascosporas a menudo son lenticulares, hialinas o de color, que varían en tamaño, forma y ornamentación. Las estructuras de esclerocios que varían en color, tamaño y forma, consisten en células de paredes gruesas. Las células de Hülle a veces cubren el cleistotecio o se producen en masas compactas en el micelio, que varían en forma y tamaño, pero principalmente son de paredes gruesas y hialinas (Samson et al., 2014).

1.2 Aspergilosis humana

Dentro de los hongos descritos como patógenos para el humano, actualmente existen 45 especies de *Aspergillus* (divididos en 6 subgéneros y 12 secciones) (De Hoog et al., 2011). Sin embargo, el número de especies de hongos clínicamente relevantes ha ido en constante aumento en los últimos años y es probable que aumente aún más en el futuro.

Los hongos del género *Aspergillus* se encuentran entre los géneros mayormente reportados como principales alérgenos junto con hongos de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium*. Estos hongos se multiplican rápidamente sobre materia vegetal almacenada o en descomposición, de interés agroalimentario (cereales, frutas, semillas, etc.), y en un amplio rango de temperatura, humedad y aerobiosis, contaminando así muchos sustratos (Perrone et al., 2007). Algunas de sus especies son fitopatógenas, destacando *A. niger*, quien produce, entre otras enfermedades, la antracnosis del algodónero y el carbón (Oelofse et al., 2006). Una característica importante de ciertos hongos del género *Aspergillus* es su capacidad de producir toxinas. Si estas se producen sobre alimentos de consumo, su presencia representa un riesgo para la salud. Las principales micotoxinas producidas por *Aspergillus* son las aflatoxinas y las ocratoxinas (Perrone et al., 2007). Otras micotoxinas, como la patulina, esterigmatocistina, citrinina y el ácido penicílico, también pueden ser producidas por algunos hongos de este género. Por otro lado, es importante mencionar que existe una complejidad multifactorial entre el hospedero y el patógeno, lo que influirá en la virulencia ocasionando diversos tipos de daño en el hospedero (Figura 4), como es el caso de *A. fumigatus* que se caracteriza por poseer una capa exterior con morfología de rodlet que consiste en fibras amiloides compuestas por la proteína RodA, esta capa es altamente hidrofóbica y permite a los conidios permanecer en el aire y llegar a los alveolos del hospedero. Además, la capa de rodlet enmascara el reconocimiento de los conidios por el sistema inmune innato evadiendo la respuesta inmune (Aimanianda et al., 2009).

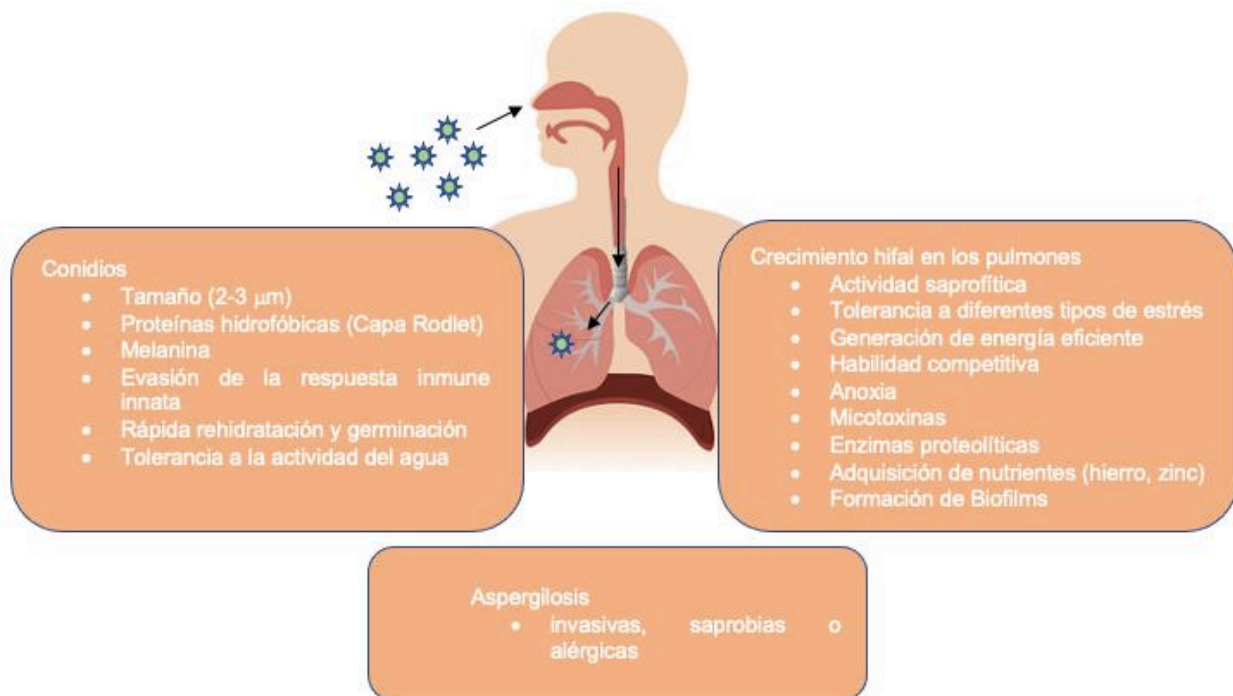


Figura 4. Factores relacionados con *Aspergillus* y el hospedero que contribuyen al éxito de las especies de *Aspergillus* como patógenos oportunistas (Modificado de: Paulussen et al., 2016).

Algunas especies del género *Aspergillus* son capaces de producir diversas enfermedades de distribución universal en el ser humano y animales, conocidas como aspergilosis, las cuales han aumentado de manera importante en los últimos años (Denning, 2006). De las más de 400 especies de *Aspergillus* descritas, solamente ocho son responsables de la mayoría de las infecciones en humanos. *A. fumigatus* es el patógeno oportunista más común, seguido de *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. nidulans*, *A. niveus* y *A. ustus* (Kradin y Mark, 2008). Dentro de la sección *Fumigati*, se encuentra *A. fumigatus*, la especie más importante del género. Ésta especie es de tipo heterotálica debido a que se requieren dos talos diferentes para poder originar una unión. Por el contrario, existen otras especies oportunistas del mismo género que usualmente desarrollan su estado sexual en cultivo a partir de un solo aislado (homotálico), tales como *N. hiratsukae*, *N. pseudofischerii* y *N. udagawae*. Esta última ha sido considerada como una especie emergente en los últimos años, produciendo infecciones invasivas con características diferenciales de las producidas por *A. fumigatus* (Sugui et al., 2010). *A. lentulus* es otra especie descrita dentro

de la misma sección, también morfológicamente parecida a *A. fumigatus*, que se puede distinguir básicamente por su lenta esporulación en cultivo y por presentar un patrón de resistencia a los antifúngicos diferente: siendo *A. lentulus* más resistente *in vitro* a la anfotericina B (Alcazar-Fuoli et al., 2008). *A. terreus* (sección *Terrei*) es una especie de creciente interés clínico y presenta también una sensibilidad disminuida a la anfotericina B. Por otro lado, estudios de secuenciación multilocus han demostrado que otra nueva especie, *A. alabamensis*, dentro de este complejo, puede colonizar sujetos inmunocompetentes y presenta una sensibilidad disminuida a la anfotericina B (Balajee, 2009).

Dentro de la sección *Usti*, la especie *A. ustus* ha sido tradicionalmente considerada como un patógeno oportunista humano, aunque poco frecuente. Sin embargo, recientemente se han investigado algunos aislados clínicos pertenecientes a dicha especie, demostrando, mediante análisis de secuencias de DNA, que en realidad pertenecían a una nueva especie, la cual presenta una sensibilidad reducida a los triazoles, a la que se denominó *A. calidoustus* (Varga et al., 2008). Además, de las anteriormente citadas, un amplio número de especies de *Aspergillus*, como *A. tamarii*, *A. pseudonomius*, *A. granulatus*, *A. deflectus* y *Emericella quadrilineata*, entre otras, han causado infecciones humanas en los últimos años (Boekhout et al., 2009; De Hoog et al., 2009).

La aspergilosis es un conjunto de enfermedades de propagación rápida y con posible riesgo de la vida del paciente. La Guía de Práctica Clínica de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (Infectious Diseases Society of America [IDSA]), establece que la aspergilosis causa afecciones del paciente que se definen clásicamente como invasivas, saprobias o alérgicas (Barnes y Marr, 2006) (Tabla 1). Las enfermedades invasivas causadas por especies de *Aspergillus* incluyen infecciones del tracto respiratorio inferior, senos paranasales y piel como portales de entrada. El sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y otros tejidos pueden infectarse como resultado de la diseminación hematológica o la extensión directa de focos contiguos de infección. Entre las formas clínicas causadas por *Aspergillus* se incluyen otomicosis por *Aspergillus*, aspergiloma pulmonar, sinusitis alérgica por *Aspergillus* (SAA) y aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) (Panackal et al., 2014).

Tabla 1. Formas clínicas de aspergilosis.

Tipo de Aspergilosis	Estado Clínico	Agente etiológico	Referencia
Aspergilosis invasiva (AI)	Leucemia aguda no linfoblástica, Leucemia mieloide aguda	<i>E. quadrilineata</i> (<i>A. quadrilineata</i>)	Verweij et al. 2008
Aspergilosis pulmonar invasiva	Enfermedad granulomatosa crónica (EGC), Síndrome mielodisplásico	<i>A. udagawae</i> (<i>Neosartorya udagawae</i>)	Vinh et al. 2009
	Leucemia linfoblástica aguda	<i>A. ustus</i> (<i>A. calidoustus</i>)	Pavie et al. 2005
	Fibrosis quística	<i>A. penicillioides</i>	Gupta et al. 2016
	Leucemia linfocítica aguda de linaje B de alto riesgo	<i>A. calidoustus</i> , <i>A. novofumigatus</i> , <i>A. viridinutans</i>	Peláez et al. 2013
Aspergilosis pulmonar necrotizante crónica (APNC; aspergilosis pulmonar invasiva subaguda)	Diabetes mellitus tipo II y Artritis reumatoide	<i>A. felis</i>	Barrs et al. 2013
	Enfermedad granulomatosa crónica (EGC), Síndrome de hiperinmunoglobulina E	<i>A. viridinutans</i>	Vinh et al. 2009
	Adenocarcinoma pulmonar	<i>A. tubingensis</i> , <i>A. flavus</i>	Gautier et al. 2016
	Fibrosis pulmonar idiopática	<i>A. tubingensis</i> , <i>A. flavus</i>	Gautier et al. 2016
	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	<i>A. tubingensis</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>	Gautier et al. 2016
Organos simples, formas extrapulmonares de aspergilosis invasiva			
Aspergilosis del SNC	Leucemia linfocítica aguda pre-células B	<i>A. granulosis</i>	Sutton et al. 2009
	Enfermedad granulomatosa crónica (EGC)	<i>A. calidoustus</i>	Hubka et al. 2012
	Glioblastoma multiforme del lóbulo temporal izquierdo, grado IV	<i>A. terreus</i>	Damek et al. 2008

Tabla 1. Continuación

	Sinusitis paranasal	ND	Muraoka et al. 2016
Pericarditis, miocarditis y endocarditis de <i>Aspergillus</i>	Síndrome de dificultad respiratoria de grado III a IV y Hemorragia periventricular-intra ventricular en estadio II a III	<i>E. rugulosa (A. rugulosus)</i>	Hubka et al. 2012
Endoftalmitis y queratitis de <i>Aspergillus</i>	ND	<i>A. flavus, A. fumigatus, A. terreus, A. pseudotamarii, A. tamaritii, A. nomius, A. tubingensis, A. brasiliensis</i>	Öz et al. 2016
	SP	<i>N. udagawae</i>	Posteraro et al. 2011
	Cirugía de cataratas	<i>A. terreus</i>	Al-Hatmi et al. 2019
	Diabetes, Cleritis necrotizante	<i>A. flavus</i>	Al-Hatmi et al. 2019
	Glaucoma, Trauma	<i>A. flavus, A. terreus, A. protuberus</i>	Al-Hatmi et al. 2019
	Hipertensión	<i>A. protuberus</i>	Al-Hatmi et al. 2019
Queratomycosis	Trauma quirúrgico y Diabetes mellitus	<i>A. fumigatus, A. nidulans, A. flavus, A. niger, A. glaucus</i>	Vanzzini et al. 2010
Aspergilosis cutánea	Leucemia linfoblástica aguda	<i>A. ustus (A. calidoustus)</i>	Pavie et al. 2005
Formas crónicas y saprobias de aspergilosis			
Onicomicosis (no dermatofita)	Diabetes tipo 2	<i>A. tritici</i>	Hubka et al. 2012
	SP	<i>A. westerdijkiae</i>	Hubka et al. 2012
	SP	<i>A. insulicola</i>	Hubka et al. 2012
	SP	<i>A. persii</i>	Zotti et al. 2010
	SP	<i>E. quadrilineata</i>	Verweij et al. 2008

Tabla 1. Continuación

Formas alérgicas de aspergilosis			
Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)	Fibrosis quística	<i>A. fumigatus</i>	Horré et al. 2010
	Fibrosis quística	<i>A. tubingensis, A. sydowii</i>	Gautier et al. 2016
	Bronquiectasia	<i>A. tubingensis, A. fumigatus, A. flavus</i>	Gautier et al. 2016

*SP (sin patología), ND (no disponible). Las especies reportadas como agentes etiológicos no son específicas de la micosis.

La gravedad de la aspergilosis depende de varios factores, aunque uno de los más determinantes es el estado del sistema inmune del paciente (Vonberg y Gastmeier, 2006), por lo que se comportan como patógenos oportunistas, en pacientes inmunocomprometidos (VIH, trasplantados, pacientes oncológicos, etc.).

Históricamente se consideraba que el agente etiológico del 90% de las aspergilosis era *A. fumigatus*, pero en la actualidad esto ha cambiado, ya que una gran variedad de especies incluidas dentro del género puede causar aspergilosis. Recientemente, se ha reportado que *A. fumigatus* sólo representa el 56% del total de las aspergilosis, seguido de otras especies como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. versicolor*; sin embargo, hay que tomar en cuenta que las técnicas moleculares han contribuido a una mejor identificación de las especies incluidas dentro de las diferentes secciones de *Aspergillus*, por lo que el número de especies patógenas oportunistas en humanos ha aumentado, entre éstas se encuentran: *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. chevalieri*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. clavatus*, *A. fisheri*, *A. glaucus*, *A. granulosis*, *A. oryzae*, *A. quadrilineatus*, *A. restrictus*, *A. sydowii*, *A. ustus*, *A. wentii*, *A. uvarum*, *A. awamori*, *A. acidus* y *A. tubingensis* (Maschmeyer et al., 2007; Galimberti et al., 2012; Arenas, 2014).

Una de las formas clínicas de aspergilosis, denominada aspergilosis invasiva (AI), está siendo reconocida como la infección fúngica más común adquirida por pacientes con neoplasias hematológicas o candidatos a trasplante de órganos que hayan recibido terapia

citotóxica e inmunosupresora o sometidos a quimioterapia con el consiguiente estado neutropénico (Fukuda et al., 2004) (Tabla 2).

Tabla 2. Características de la aspergilosis invasiva.

	Histología	Factores de predisposición	Tratamiento (6-12 semanas*)
Aspergilosis invasiva	Disrupción de planos tisulares e invasión vascular por adhesión de componentes de la superficie celular fúngica a los componentes de la pared vascular, incluida la membrana basal, la matriz extracelular y los constituyentes celulares	Enfermedades hematológicas, déficit de la inmunidad a consecuencia de quimioterapia, radioterapia, infección por citomegalovirus, enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), corticoides anti-TNF o alemtuzumab Trasplante hepático, pulmonar, estancia prolongada en la UCI pacientes pediátricos receptores de trasplante de órgano sólido (TOS), trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), con neoplasias hematológicas e inmunodeficiencias primarias o adquiridas	Voriconazol, Anfotericina B liposomal y caspofungina Posaconazol y micafungina (tratamiento de rescate)

*tiempo de tratamiento mínimo

Los signos y síntomas de la AI no son específicos, y por lo general implican la falta de respuesta a la terapia antibacteriana determinada empíricamente por fiebre. Se ha evidenciado que el diagnóstico oportuno y los tratamientos antimicóticos apropiados aumentaron la esperanza de vida de los pacientes con AI y disminuyeron el riesgo de morbilidad y mortalidad, pero todavía alrededor de un tercio de los casos no respondieron al tratamiento y finalmente fallecieron (Hachem et al., 2004). Teniendo en cuenta la gravedad y el carácter agresivo de la infección, es importante establecer un diagnóstico oportuno para el inicio de la terapia antifúngica, con el propósito de disminuir la tasa de mortalidad. Desafortunadamente, las herramientas tradicionales utilizadas para el

diagnóstico de AI no permiten la identificación de los agentes etiológicos a nivel especie, por lo que el tratamiento en la mayoría de las ocasiones no resulta exitoso.

Objetivos

Objetivo general

Obtener patrones polimórficos por RAPD-PCR, para identificar las especies de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. niger* y *A. tubingensis* a partir de aislados clínicos y ambientales.

Objetivos particulares

- 1) Caracterizar fenotípicamente 4 aislados de cada especie (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. niger* y *A. tubingensis*), por métodos fenotípicos (macro y micromorfología) y genotípicos (secuenciación del gen β -tubulina).
- 2) Llevar a cabo la técnica de RAPD-PCR con cuatro aislados de cada especie utilizando 34 oligonucleótidos.
- 3) Seleccionar por métodos cualitativos y cuantitativos los patrones polimórficos generados, por RAPD-PCR, para identificar patrones especie específicos de *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. niger* y *A. tubingensis*.
- 4) Probar la especificidad de los patrones específicos con aislados clínicos y ambientales.

2. Antecedentes

La importancia de la identificación especie específica de los patógenos oportunistas radica en que, en los últimos años, se han descrito numerosas especies crípticas dentro del género *Aspergillus*, que son especies morfológicamente indistinguibles, originadas por especiación dentro de las secciones *Fumigati*, *Nigri*, *Flavi* y *Terrei* (Nedel y Pasqualotto, 2014), las cuales pueden causar aspergilosis, tanto en seres humanos como en otros animales, y algunas de estas especies presentan diferente susceptibilidad a los antifúngicos disponibles para el tratamiento. Dentro de la sección *Fumigati*, se ha demostrado que la mayoría de aislados de *A. lentulus* y *A. fumigati* presentan escasa sensibilidad a anfotericina B, itraconazol, voriconazol y ravuconazol; *N. pseudofischeri* y *A. viridinutans* muestran resistencia a itraconazol, voriconazol y ravuconazol; mientras que *N. hiratsukae* y *A.*

fumisynnematus son susceptibles a los mismos antifúngicos. En la sección *Flavi*, las especies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. novoparasiticus*, *A. oryzae* y *A. tamarii* han mostrado sensibilidad a terbinafina, equinocandinas y posaconazol, pero menos sensibilidad a voriconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosina (Goncalves et al., 2013). En la sección *Nigri*, se ha reportado que *A. tubingensis*, *A. awamori*, *A. acidus* y *A. foetidus* muestran menor sensibilidad a itraconazol, voriconazol y ravuconazol que *A. niger* (Alcazar-Fuoli et al., 2009). Dentro de la sección *Terrei*, aislados de *A. terreus* y *A. hortai* han mostrado resistencia a anfotericina B; sin embargo, algunos aislados de *A. terreus* presentan sensibilidad a este antifúngico, tanto *in vivo* como *in vitro*. Asimismo, los hongos *A. terreus* y *A. hortai* exhiben sensibilidad frente a todos los antifúngicos azólicos (Kathuria et al., 2015).

Es importante considerar que algunas especies crípticas no tienen patrones de susceptibilidad predecibles, por lo que, las pruebas de susceptibilidad antifúngica siguen siendo una herramienta vital en la elección de una terapia antifúngica eficaz. También es fundamental tomar en cuenta, que la susceptibilidad a los antifúngicos varía entre las especies crípticas, pero en general parecen mostrar un aumento en la frecuencia de la resistencia *in vitro*, comparada a las especies no crípticas; no obstante, los valores de corte (que son especie-específicos) aún no se han definido para estas especies (Howard, 2014; Negri et al., 2014).

El diagnóstico tradicional en la mayoría de los laboratorios clínicos de la AI se basa en la detección temprana de los aislados de *Aspergillus* en medios de cultivo a partir de las muestras clínicas y su posterior identificación con base en caracteres morfológicos tales como macro y micromorfología, analizando las características de color y textura colonial en los medios de cultivo para estas especies como agar papa dextrosa (APD) y Czapek Dox agar, entre otros, por un tiempo de incubación de 4-7 días a una temperatura de 28 °C, además del tamaño y forma de vesículas y conidios, la presencia de métulas (si las presentan) y el conidióforo. Sin embargo, el cultivo de hongos es relativamente lento. Por otro lado, también se utiliza el análisis histopatológico para la detección de *Aspergillus* spp. sin embargo, ésta y las imágenes radiográficas no son organismo específico. Recientemente, la espectrometría de masas por medio de MALDI-TOF-MS (desorción/ionización láser asistida por matriz-analizador de tiempo de vuelo-espectrometría de masas) ha mejorado enormemente la identificación de las especies de *Aspergillus* recuperadas en medios de cultivo (Cassagne et al., 2016). Por otro lado, existen

métodos diagnósticos que no requieren el cultivo, y que se realizan directamente en las muestras clínicas, como lo son, los métodos serológicos, que incluyen la fijación del complemento, la inmunodifusión, diferentes ensayos de inmovilización ligados a enzimas (ELISA) y la transferencia Western (Ramanan et al., 2017).

No obstante que se han utilizado estos métodos, los esfuerzos se han dirigido hacia el desarrollo de diagnósticos no invasivos, con la finalidad de detectar y tratar de forma oportuna, así como de mejorar la supervivencia de los pacientes, por lo que se han buscado biomarcadores para la detección de *Aspergillus*, entre los que se encuentran los galactomananos, que son un componente importante de la pared celular de *Aspergillus* y es liberado por las hifas fúngicas en cantidades variables en el suero y fluidos adyacentes de órganos infectados. Este marcador se utilizó inicialmente por aglutinación en látex (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur, Francia), posteriormente, esta prueba se adaptó a una ELISA doble (Platelia™ *Aspergillus*, BioRad, Francia), este método es de uso común para el diagnóstico de AI y tiene un alto grado de especificidad. Otro biomarcador es el antígeno 1,3-β-D-glucano (Fungitec G, Seikagaku Corporation, Japón, Wako-WB 003, Wako Chemical, Alemania, y GlucateLL, Associates of Cape Code, Inc., USA) (BDG) que tiene un alto valor predictivo negativo, por lo que es bastante útil para descartar AI en lugar de confirmarlo (Bassetti et al., 2018). El uso de estos biomarcadores de la pared celular de *Aspergillus*, ha mejorado el diagnóstico temprano de AI en pacientes neutropénicos con enfermedades respiratorias subyacentes sin malignidad hematológica o trasplante de órgano sólido previo (Prattes et al., 2014), pero estos métodos también tienen limitaciones significativas, incluida la baja sensibilidad en ciertos grupos de pacientes (Pfeiffer et al., 2006) y problemas de no especificidad (Sulahian et al., 2014).

Actualmente hay gran interés en el uso del diagnóstico molecular, con el fin de obtener un diagnóstico rápido y preciso de la aspergilosis, ya que la prueba de amplificación de ácidos nucleicos es una técnica simple, rápida, sensible y fácil de aplicar que podría usarse todos los días en los laboratorios clínicos de rutina y capaz de identificar infecciones en una etapa temprana (Arvanitis et al., 2014). La mayoría de las técnicas con base en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizan cebadores que se dirigen a la región del espaciador interno transcrito (ITS) del rDNA (DNA ribosomal) de *Aspergillus* spp., que permiten la identificación a nivel del complejo de especies. Además, se han descrito muchas otras técnicas de detección molecular, como sondas marcadas con fluorescencia, sondas de hibridación *in situ* y matrices multiplexadas (Powers-Fletcher y Hanson, 2016). No obstante, hasta ahora, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos no

ha aprobado ensayos moleculares para el diagnóstico de aspergilosis. Sin embargo, cabe mencionar que la PCR *Aspergillus* de PathoNostics (AsperGenius®) cuenta con la aprobación de la comisión europea (CE) y la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) para el diagnóstico clínico en nuestro país.

Aunque la incidencia de las nuevas especies no es tan alta como la de *A. fumigatus*, es indispensable su correcta identificación para implementar estrategias terapéuticas específicas para cada paciente, ya que en nuestro país las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos no se realizan de manera rutinaria (Howard, 2014). Por lo que Samson et al. (2014), han sugerido emplear un enfoque polifásico como estándar de oro para su identificación, es decir, emplear un conjunto de criterios, entre los que se incluyen la caracterización morfológica, pruebas fisiológicas, datos ecológicos, análisis de extrólitos y secuencias de DNA. Sin embargo, la identificación polifásica no es práctica para el diagnóstico clínico de las especies de *Aspergillus*, ya que es costosa y demorada.

Particularmente, en lo que se refiere a las secuencias de DNA, se ha sugerido la utilización de secuencias multilocus, como β -tubulina (*BenA*), calmodulina (*CaM*), actina (*Act*) o ITS. El análisis comparativo de secuencias de las regiones ITS, específicamente las regiones no codificantes, ITS1 e ITS2, que flanquean el 5.8S del rDNA, permite identificar a *Aspergillus* a nivel de subgénero/sección. Mientras que la amplificación y secuenciación de algunos genes como la actina, la calmodulina, rodlet A, y/o β -tubulina, permite distinguir a *A. fumigatus* de especies relacionadas dentro de la misma sección (Fernández-Molina et al., 2014). Sin embargo, es muy importante considerar las bases de datos disponibles para cada gen, por ejemplo, en el caso de la amplificación del gen de calmodulina, existen secuencias depositadas de casi todas las especies de las secciones de *Aspergillus* (a excepción de las especies *A. elegans* y *A. steynii*), de manera que, desde un punto de vista práctico, se ha sugerido el uso de la calmodulina (Samson et al., 2014) y β -tubulina (Won-Bok et al., 2020) como marcadores útiles en la identificación secundaria de *Aspergillus*, además de permitir un análisis comparativo (Duarte-Escalante et al., 2020).

Por lo que, resulta necesario utilizar otros marcadores que permitan realizar un diagnóstico rápido y eficaz, como la técnica RAPD-PCR, que emplea oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria que se alinean a regiones múltiples del DNA, produciendo patrones de identificación molecular. Además, es rápida, simple de ejecutar y se requieren cantidades pequeñas de DNA, y no se necesita tener conocimiento previo de dicha secuencia de las especies estudiadas. Este método se ha utilizado ampliamente para identificar hongos de

importancia médica, como es el caso de *Aspergillus*. Hong et al. (2010) reevaluaron la identificación de especies de una colección de cepas de *A. fumigatus sensu lato* para identificar especies atípicas con base en el nuevo concepto de delimitación de especies; estos autores utilizaron la técnica de RAPD-PCR y el análisis de la secuencia del gen *BenA*. Así identificaron *A. fumigatus sensu stricto*, *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *Neosartorya udagawae* y *N. cf. nishimurae*. Además, Kermani et al. (2016) llevaron a cabo la identificación de especies de aislados ambientales de *Aspergillus* en Teherán; la identificación fue por métodos fenotípicos y por RAPD-PCR, se identificaron las especies *A. niger*, *A. flavus*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. ochraceus*, *A. nidulans*, *A. amstelodami*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. flavipes* y *A. fumigatus*. Asimismo, Pena et al. (2018), identificaron aislados de *A. fumigatus sensu lato*, obtenidos de muestras de leche de vaca. Los aislados fueron identificados por técnicas fenotípicas (morfológicas) y genotípicas (RAPD-PCR y por secuenciación del gen *BenA*); además, determinaron la variabilidad genética. Las especies identificadas fueron *A. fumigatus* siendo la más abundante, seguida de *A. novofumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. udagawae* y *A. lentulus*. Estos resultados indican que el RAPD-PCR puede ser usado para diferenciar especies de *Aspergillus*.

2.1 Planteamiento del problema

La aspergilosis incluye diferentes cuadros clínicos entre ellos la AI que ocurre principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Es una enfermedad causada por especies de *Aspergillus*, entre las que predominan *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, y *A. niger*; no obstante, recientemente se han reportado especies crípticas y se ha observado que estas especies presentan diferente susceptibilidad a los antifúngicos, por lo que un diagnóstico temprano y confiable es necesario para administrar un tratamiento apropiado. Para la identificación de especies de *Aspergillus* hay métodos fenotípicos y genotípicos; sin embargo, presentan limitaciones. Por lo que se propone el uso de la técnica RAPD-PCR como una alternativa rápida y eficaz para la identificación de *Aspergillus* spp. por medio de los patrones polimórficos. Por sus características, esta técnica representa una excelente alternativa para realizar diagnóstico clínico en casos de aspergilosis.

Hipótesis

Los patrones polimórficos seleccionados a partir del análisis cualitativo y cuantitativo de la amplificación por RAPD-PCR con 34 oligonucleótidos son específicos para *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. niger* y *A. tubingensis*.

3. Metodología

Aislados fúngicos

Se utilizaron aislados de *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. tubingensis* (Tabla 3). Estos aislados están depositados en la Colección del Laboratorio de Micología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Tabla 3. Aislados utilizados en el presente estudio.

Especie	Aislado	Tipo de aislado
<i>A. flavus</i>	9343D-2 (ATCC)	Cepa de referencia
	323C	Clínico
	87A	Clínico
	A40	Clínico
	370B	Clínico
	MM-234	Ambiental
	MM-224	Ambiental
	MM-243	Ambiental
	<i>A. fumigatus</i>	3626 (ATCC)
MM12		ND
MM16		ND
MM18		ND
MM21		ND
MM-263		Ambiental
MM-265		Ambiental
MM-308		Ambiental
<i>A. lentulus</i>	M3566 (ATCC)	Cepa de referencia
<i>A. niger</i>	WB326 (ATCC)	Cepa de referencia
	387A	Clínico

	A39	Clínico
	335B	Clínico
	88C	Clínico
	MM-274	Ambiental
	MM-291	Ambiental
<i>A. tubingensis</i>	1004 (ATCC)	Cepa de referencia
	281C	Clínico
	146A	Clínico
	A26	Clínico
	220A	Clínico
	MM-251	Ambiental
	MM-267	Ambiental
	MM-342	Ambiental

Obtención de cultivos monospóricos

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

Identificación por macromorfología

Los aislados fueron cultivados en agar Sabouraud (Bioxon®) a 28 °C durante 4-7 días, posteriormente se observaron las características morfológicas coloniales de cada cultivo (color y textura de la colonia) (Pitt y Hocking, 1997; Samson et al., 2014). Para el registro de la macromorfología de los aislados, se tomaron fotografías con una cámara digital (SONY Cyber-shot 8.1 mega pixeles).

Identificación por micromorfología

Las características micromorfológicas de todos los aislados se analizaron según el método de microcultivo de Riddell (1950), que consistió en cortar asépticamente bloques de 1 cm³ de medio de cultivo agar Sabouraud (Bioxon®). Cada bloque se colocó sobre un portaobjetos estéril y se inoculó con el aislado correspondiente, en las cuatro aristas superiores del medio de cultivo; sobre el bloque se colocó un cubreobjetos estéril y se incubó dentro de una caja de Petri a 28 °C durante 4 días. Para evitar la deshidratación del agar durante la incubación, se colocó un algodón humedecido con agua estéril dentro de las cajas de Petri. Posteriormente, se separó cuidadosamente el cubreobjetos del agar y se depositó sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se observó al microscopio (Olympus América Inc., NY, USA), para analizar las características morfológicas (tamaño y forma) de los conidios y las vesículas de cada uno de los aislados. El tamaño de los conidios de cada uno de los microcultivos obtenidos de los aislados de *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. niger* y *A. tubingensis* cultivados en agar Sabouraud (Bioxon®) e incubados a 37 °C durante 4 días, se obtuvo el promedio del diámetro de 30 conidios con un micrómetro ocular calibrado antes de cada medición (Olympus America Inc.). El tamaño de los conidios se registró a través de una cámara digital (SONY). El tamaño de las vesículas se obtuvo a partir de los aislados de *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. niger* y *A. tubingensis* cultivados en agar Sabouraud (Bioxon®) e incubados a 37 °C durante 4 días ; posteriormente se contaron 10 vesículas con un micrómetro ocular calibrado (Olympus). El tamaño de las vesículas se registró a través de una cámara digital (SONY).

Extracción de DNA

A partir de cada cultivo monospórico de las secciones de *Aspergillus* identificadas previamente por métodos fenotípicos y sembrados en APD, se obtuvo una suspensión de conidios de la siguiente manera: se agregó a cada tubo 1 mL de agua estéril adicionada de Tween 80 al 0.5% y se resuspendió por agitación en vórtex-Genie 2 (Daigger Scientific Industries. Inc, NY, USA). Posteriormente, se sembró en 50 mL de medio líquido extracto de levadura-peptona-dextrosa (LPD), se incubó a 37 °C en agitación durante 2 días o hasta observar crecimiento micelial. Se cosechó individualmente la biomasa micelial de cada aislado por filtración, utilizando papel filtro Whatman No. 1. Enseguida se lavó el micelio

con agua Milli Q estéril y se secó con papel filtro. Posteriormente, la extracción del DNA se llevó a cabo con el Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, TX, USA), de la siguiente manera: se tomaron 100 mg de masa micelial seca y se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL conteniendo 0.2 g de perlas de vidrio previamente estériles (400-455 μm de diámetro, lavadas con HCl) y se adicionó el amortiguador de extracción (AP1) del Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). Los tubos fueron colocados en un equipo FastPrep (Thermo Savant Instruments, NY, USA). En el método para obtener la mayor cantidad de micelio roto se ensayaron las condiciones de 4 periodos de 40 s a 4 m/s con 5 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo (Calderón et al., 2002). Se analizaron las suspensiones de micelio resultantes bajo el microscopio, para determinar el tiempo y la velocidad óptima con el fin de obtener la mayor cantidad de micelio roto y su contenido liberado dentro de la suspensión. Después de este procedimiento, se adicionaron 4 μL de RNAsa a 100 mg/mL, se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó la mezcla por 10 min a 65 °C, mezclando 2 ó 3 veces, por inversión. Enseguida, se adicionaron 130 μL del amortiguador (AP2) y se incubó por 5 min en hielo, se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm. Se transfirió el volumen total del sobrenadante a la columna lila QIAshredder mini spin, sostenida en un tubo colector de 2 mL para centrifugar a 14,000 rpm por 2 min. El sobrenadante obtenido en el tubo colector se transfirió a un nuevo tubo, se adicionaron 1.5 volúmenes del amortiguador (AP3/E) y se mezcló con una micropipeta. Se transfirieron 650 μL de la mezcla anterior a la columna DNeasy mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó 1 min a 9,000 rpm; se desechó el sobrenadante y se repitió este paso hasta terminar con el volumen. Posteriormente, se cambió el tubo colector y se realizaron dos lavados con 500 μL de amortiguador (AW); el primero se centrifugó por 1 min a 8,000 rpm y el segundo 2 min a 14,000 rpm. Por último, la columna se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL, y se adicionaron 50 μL de agua Milli Q, se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8,000 rpm para eluir el DNA. La concentración y pureza del DNA (cociente de absorción 260/280=1.8-2.0) se determinó en un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, DE, USA) y por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, teñido con GelRed (10,000X, Biotium Inc., CA, USA), en una cámara de electroforesis, comparando con diferentes concentraciones del fago Lambda (GIBCO BRL®, MA, USA) de 10, 20, 50 y 100 ng/ μL , con un tiempo de migración aproximado de 45 min a 100 V y se observó el gel en un fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA).

Amplificación de la secuencia parcial del gen β -tubulina (*BenA*)

Se llevó a cabo el procedimiento reportado por Glass y Donaldson (1995). Inicialmente, en un volumen final de 25 μ L de reacción, se emplearon 10 ng de DNA genómico, 2.0 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs (Applied Biosystems Inc., CA, USA), 1 U *Taq* polimerasa (Applied Biosystems Inc.) y 30 pmoles de cada oligonucleótido Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'). La amplificación se realizó en un termociclador (Bio-Rad, Laboratories, Inc.) con las condiciones: 95 °C por 8 min, 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 55 °C por 20 s y 72 °C por 1 min, y un ciclo de 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con 0.8 μ L/100 mL de GelRed (10,000X, Biotium Inc., CA, USA). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TBE 0.5 X (45 mM Base-Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA). Se utilizó el marcador de tamaño molecular de 100 pb de DNA Ladder (Invitrogen, CA, USA). Las imágenes de los geles se capturaron en un Fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Para obtener las condiciones óptimas para la PCR, en este estudio se realizaron curvas de concentración de DNA, dNTPs, $MgCl_2$, oligonucleótidos y se probaron diferentes temperaturas de alineamiento (datos no mostrados) (Glass y Donaldson, 1995).

Análisis de las secuencias

Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit ver. 7.1.9. (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) y analizadas con el programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997) (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) para verificar su identidad. Posteriormente, se realizó el alineamiento de las secuencias con el programa MAFFT ([//mafft.cbrc.jp/alignment/server/](http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/)) (Kato y Standley, 2013) y se eligió el mejor modelo evolutivo aplicado a dicho alineamiento con el programa JModelTest 2 (www.github.com/ddarriba/jmodeltest2) (Darriba et al., 2012).

Análisis filogenético

Para el análisis filogenético, se utilizaron 14 secuencias correspondientes a las secuencias del gen *BenA* obtenidas del GenBank (Tabla 4), secuencias parciales del gen *BenA*

obtenidas de las cepas de referencia ATCC correspondientes a: *A. flavus* (9643D-2), *A. fumigatus* (MYA3526), *A. lentulus* (MYA3556), *A. niger* (WB326) y *A. tubingensis* (1004), además, las secuencias de los aislados utilizados en este trabajo. Se utilizó el método estadístico de máxima verosimilitud y se empleó una prueba de filogenia que incluye el método de bootstrap con 1,000 réplicas y el modelo evolutivo GTR (General Time Reversible) G+I; se aplicó el método heurístico NNI (Nearest-Neighbor-Interchange) y el análisis se llevó a cabo con el programa MEGA 7 (www.megasoftware.net/) (Kumar et al., 2016).

Tabla 4. Secuencias de referencia correspondientes al gen *BenA*.

Número de acceso	Especie en GenBank
MT347712.1	<i>A. flavus</i>
MT347711.1	<i>A. flavus</i>
MT347713.1	<i>A. flavus</i>
MT347703.1	<i>A. fumigatus</i>
MT347702.1	<i>A. fumigatus</i>
NT347701.1	<i>A. fumigatus</i>
MN275501.1	<i>A. lentulus</i>
MN275504.1	<i>A. lentulus</i>
MN257703.1	<i>A. lentulus</i>
MT410061.1	<i>A. niger</i>
MT410063.1	<i>A. niger</i>
MT410083.1	<i>A. tubingensis</i>
MT410082.1	<i>A. tubingensis</i>
MT410084.1	<i>A. tubingensis</i>

Obtención de patrones polimórficos por RAPD-PCR

Amplificación al azar del DNA polimórfico (RAPD-PCR)

Se utilizó el método de RAPD-PCR empleando dos variantes de este, con un oligonucleótido según Kersulyte et al. (1992) y Woods et al. (1993), o con doble oligonucleótido según Hu et al. (1995). Se trabajó con 34 oligonucleótidos (Sigma-Aldrich, MO, USA) (Tabla 5). Inicialmente, se utilizaron en la reacción 10 ng de DNA genómico, 100

pmoles de cada oligonucleótido, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (Applied Biosystems Inc.) y 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Applied Biosystems Inc.) en amortiguador 1X, en un volumen final de reacción de 25 µL. Los reactivos se ajustaron hasta obtener las condiciones óptimas de reacción.

Se utilizó el siguiente programa, en un termociclador (Bio-Rad, Laboratories, Inc.): un ciclo de 7 min a 94 °C; seguido por 45 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min a 35 °C y 1 min a 72 °C, se llevó a cabo una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 0.5 X. Para visualizar las bandas, los geles se tiñeron con Gel Red (10,000X, Biotium Inc.). El gel se corrió usando el mismo amortiguador a 70 V. El estándar de tamaño molecular fue el de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Las imágenes de los geles se capturaron en un Fotodocumentador Synoptics (Syngene). El tamaño de los fragmentos se calculó con ayuda del programa BiImage IQ versión 3.3 (BioPoint, CBG, UK) por comparación con los marcadores moleculares.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para RAPD-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia de 5'-3'
1281	AACGCGCAAC
1283	CGGATCCCCA
R108	GTATTGCCCT
1253	GTTTCCGCCC
OPA-19	CAAACGTCGG
OPA-16	AGCCAGCGAA
OPB-12	CCTTGACGCA
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-15	TTCCGAACCC
OPF-05	CCGAATTCCC
OPA-08	GTGACGTAGG
OPC-07	GTCCCGATGA
OPG-01	CTACGGAGGA
OPG-03	GAGCCCTCCA
OPG-13	CTCTCCGCCA
OPG-15	ACTGGGACTC
OPC-06	GAACGGACTC
OPG-05	CTGAGACGGA
OPM-12	GGGACGTTGG
OPH-03	AGACGTCCAC
OPG-07	GAACCTGCGG
OPH-18	GAATCGGCCA
OPF-01	ACGGATTCTG
OPF-07	CCGATATCCC
OPF-09	CCAAGCTTCC
OPE-02	GGTGCGGGAA

P54	GCGATTTTTGCCG
P160	CATGGCCACC
PELF	ATATCATCGAAGCCGC
B-04	TGCCATCAGT
OPH-17	CACTCTCCTC
T3B	AGGTCGCGGGTTCGAATCC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC

La realización de los RAPD-PCR con las cinco especies, se llevó a cabo bajo condiciones estrictas para evitar en lo posible problemas con la reproducibilidad. El manejo de reactivos, equipos y áreas fue el mismo, así aseguramos obtener resultados consistentes.

En lo que respecta a *A. lentulus*, solo se obtuvo un patrón polimórfico para esta especie, por lo que no fue posible incluirlo en los análisis posteriores.

Selección de patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR, a través de un análisis cualitativo y cuantitativo

Selección cualitativa

Considerando los siguientes criterios de inclusión: número de bandas (más de tres bandas), tamaño molecular (>500 pb), así como la definición del patrón presentado por cada uno de los aislados de las especies estudiadas, se realizó una selección de los patrones polimórficos especie específicos para cada una de las cuatro especies (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. tubingensis*) por RAPD-PCR con los 34 oligonucleótidos.

Selección cuantitativa

A partir del análisis cualitativo de los patrones polimórficos se construyó una base de datos, considerando: número de bandas por aislado, tamaño molecular (pb por banda), intensidad de cada banda en los siguientes rangos: 0.5 (muy tenue), 1.0 (tenue), 2.0 (intenso) y 3.0 (muy intenso). La base de datos obtenida fue utilizada para la construcción de modelos de regresión logístico, considerando como variables dependientes (número de bandas, tamaño molecular, intensidad y su interacción) y como variable independiente, la especie para cada uno de los 34 oligonucleótidos, utilizando el programa JMP®Pro 13 (SAS Institute Inc., for Windows). Posteriormente se evaluó la significancia de los modelos y de las variables de estudio, con el propósito de seleccionar el modelo que presentó el mayor valor de sensibilidad vs especificidad, representado por los gráficos de las denominadas curvas ROC (características operativas del receptor) (Fiuza y Rodríguez 2000 y Fawcett 2004).

Utilizando los resultados de las curvas se seleccionaron los oligonucleótidos que generaron los patrones de bandas, que tuvieran áreas bajo la curva, mayores al 0.9 de selectividad vs especificidad para cada una de las especies evaluadas (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. tubingensis*).

El modelo obtenido de los oligonucleótidos seleccionados generó una ecuación matemática que permitió la estimación de la especie más probable.

Aplicación de los modelos matemáticos para identificar las especies de *Aspergillus*

Para corroborar la identificación de las especies de *Aspergillus*, se obtuvieron patrones polimórficos por RAPD-PCR con otros aislados de *Aspergillus*, utilizando los oligonucleótidos seleccionados por medio de la selección cuantitativa (OPC-06, OPF-01, OPF-07 y OPG-13). De éstos se obtuvieron los siguientes datos: número de bandas, tamaño molecular e intensidad, con el fin de comparar estos datos con los obtenidos previamente para la construcción del modelo de regresión logístico, y obtener los datos de correlación para asociar la especie más probable.


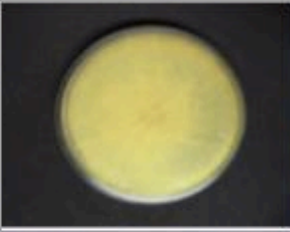
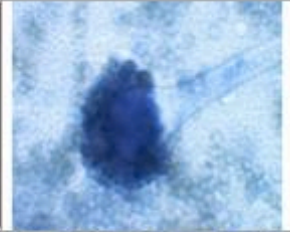


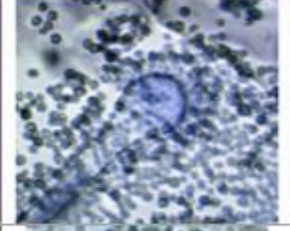


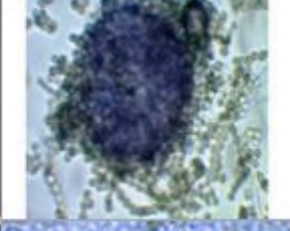
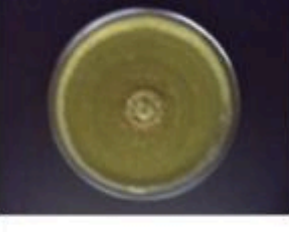

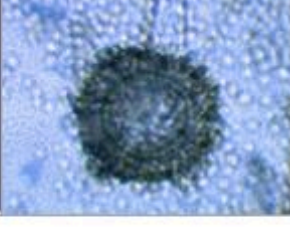
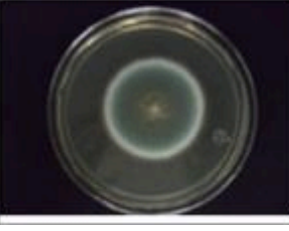
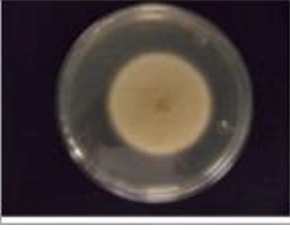
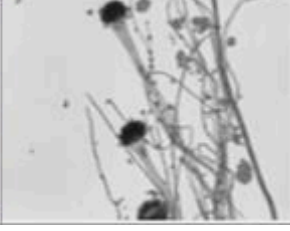
4. Resultados


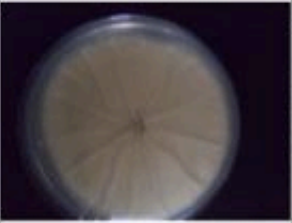
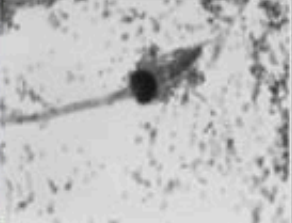
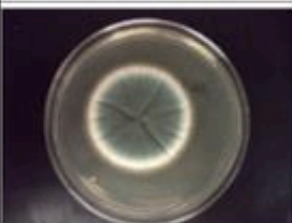
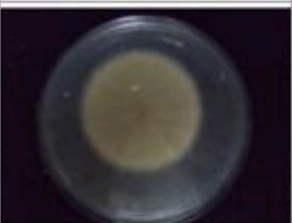
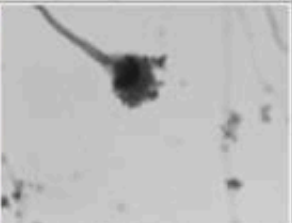
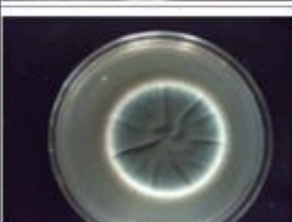

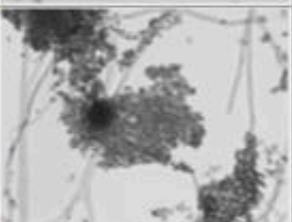
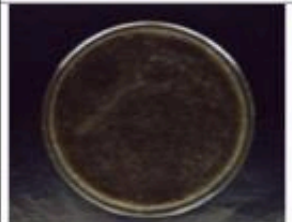
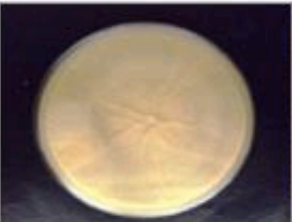
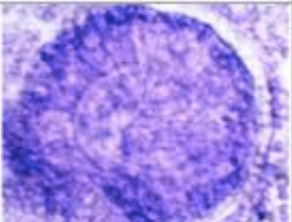
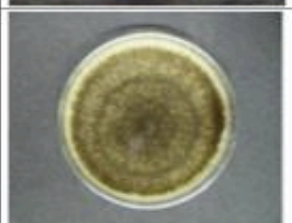
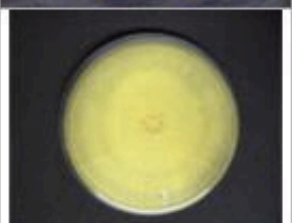
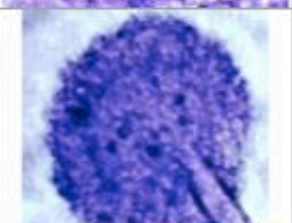


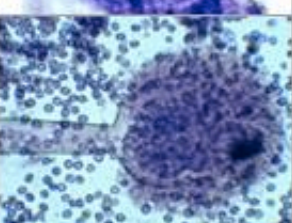
Caracterización fenotípica de los aislados de las secciones de *Aspergillus* spp.

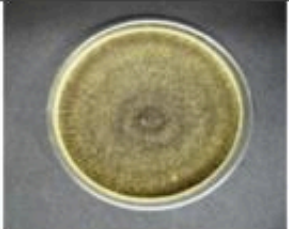
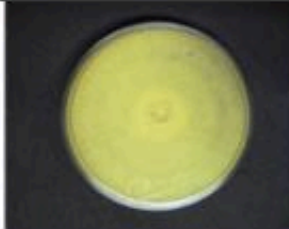
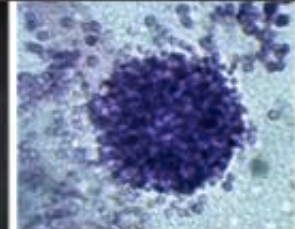


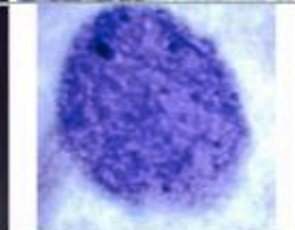
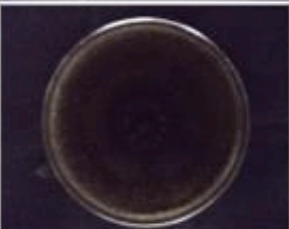

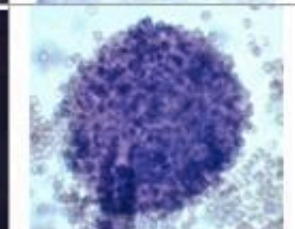


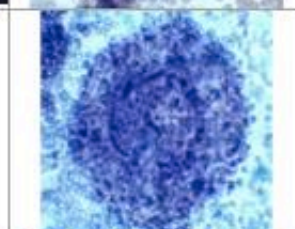



De acuerdo con sus características fenotípicas, los aislados fueron identificados como *Aspergillus* sección *Flavi*, *Fumigati* y *Nigri*, mostrando las características de morfología macroscópica y microscópica reportadas para estas secciones.

Macromorfología: se identificaron colonias aterciopeladas con coloración verde-azul (anverso) y color crema (reverso) (sección *Fumigati*); colonias de coloración marrón-oscuro a negro, pulverulenta (anverso) y color crema-amarillo (reverso) (sección *Nigri*) y colonias verdosas a amarillentas (anverso) y color crema-amarillo (reverso) (sección *Flavi*).
Micromorfología: coloración de conidios verde azulado, sin métula, vesícula espatulada y conidióforo liso (sección *Fumigati*). Conidios marrón-oscuro a negro, en ocasiones presentó métula, vesícula globosa y conidióforo liso (sección *Nigri*). Conidios verde-pardo con vesícula globosa y conidióforo rugoso (sección *Flavi*) (Tabla 6).

Tabla 6. Morfología macroscópica y microscópica de los aislados de *Aspergillus* spp.

SECCIÓN	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA		MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
	ANVERSO	REVERSO	
<i>Flavi</i>			
323C			
87A			
A40			
370B			
<i>Fumigati</i>			
MM12			

	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA		MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
MM16			
MM18			
MM21			
<i>Nigri</i>			
387A			
A39			
335B			

	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA		MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
88C			
281C			
146A			
A26			
220A			

Los conidios fueron medidos con el objetivo micrométrico a 100X y las vesículas a 40X. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Promedios del diámetro de conidios y vesículas de los aislados de *Aspergillus* spp.

Sección	Promedio del diámetro de conidios (µm)	Promedio de vesículas (µm)	
		Largo	Ancho
<i>Flavi</i>			
323C	4.16	25.64	27.95
87A	2.78	27.95	31.28
A40	4.30	31.79	31.28
370B	4.88	31.79	31.79
<i>Fumigati</i>			
MM12	1.8	15.1	12.8
MM16	1.7	18.7	14.8
MM18	2.1	17.4	12.8
MM21	2.0	24.1	18.4
<i>Nigri</i>			
387A	2.20	30.77	32.31
A39	4.05	41.54	37.43
335B	4.23	44.61	44.87
88C	3.97	34.36	31.54
281C	2.23	51.79	50.77
146A	3.54	45.38	45.89
A26	3.68	42.82	44.10
220A	3.16	51.79	51.28

Caracterización genotípica de los aislados de las secciones de *Aspergillus* spp.

De acuerdo con el análisis espectrofotométrico y electroforético, la cantidad e integridad de los DNA obtenidos de los aislados de las secciones de *Aspergillus* fue adecuada para los ensayos de PCR. Las lecturas realizadas en espectrofotómetro mostraron concentraciones entre 9.8 y 365 ng/µL, con una pureza adecuada, según los valores de la relación 260/280 nm (1.7-1.9); además, en la electroforesis se observó una sola banda (Figura 5), lo que corroboró una buena calidad de los DNA. Asimismo, las concentraciones de DNA determinadas por comparación con diferentes concentraciones del fago λ concordaron con las determinadas por espectrofotometría. Los DNA obtenidos de cada uno de los aislados de *Aspergillus* spp. se ajustaron a una concentración final de 20 ng/µL.

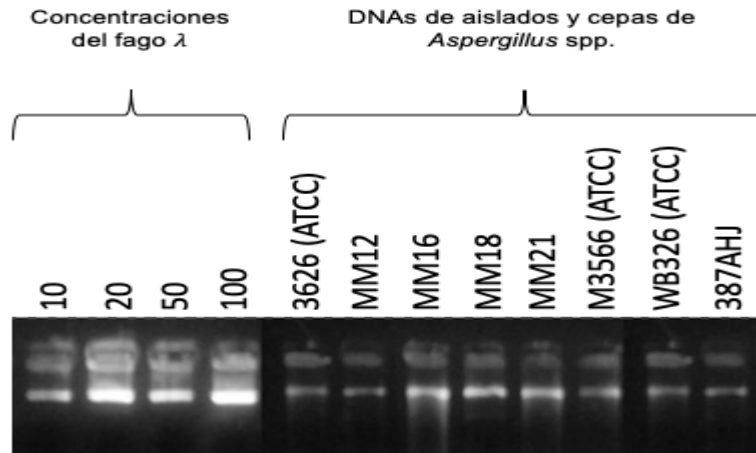


Figura 5. Cuantificación de DNA de los aislados de *Aspergillus*. Las concentraciones de DNA fueron ajustadas a 20 ng/μL. La cuantificación se llevó a cabo por comparación con diferentes concentraciones de DNA del fago λ (10, 20, 50, y 100 ng/μL) y por espectrofotometría. La electroforesis se realizó a 90 V en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed.

Amplificación de la secuencia parcial del gen β-tubulina (*BenA*)

Para la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA*, las condiciones óptimas fueron: DNA 10 ng/μL, amortiguador 1X, dNTPs 200 μM, MgCl₂ 1.5 mM, oligonucleótidos 30 pmol, *Taq* polimerasa 1 U/μL, el volumen final de cada reacción fue de 25 μL y una temperatura de alineamiento de 58 °C. Con estas condiciones se amplificó la secuencia parcial del gen en todos los DNA de los aislados de *Aspergillus* spp. (Figura 6).

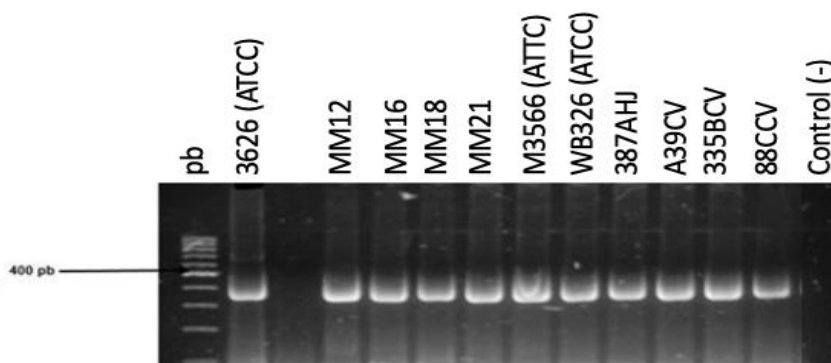


Figura 6. Amplificación del gen *BenA* de los aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus*. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA Ladder.

El análisis filogenético a través del método de máxima verosimilitud, formó un árbol en el cual los aislados se organizaron en tres grupos. El grupo I con dos subgrupos, el subgrupo Ia incluyó los aislados 146A, 220A, 281C y A26 y la cepa de referencia de la ATCC correspondiente a *A. tubingensis* y se asociaron con las cepas de referencia de *A. tubingensis* (MT410083.1, MT410082.1, MT410084.1) con un bootstrap de 91%. El subgrupo Ib, incluyó la cepa de referencia WB326 de *A. niger* (ATCC) y los aislados 335B, 88C, 387A y A39 que se agruparon con las cepas de referencia de *A. niger* (MT410061.1, MT410063.1), con un bootstrap de 95%. El grupo II muestra que los aislados 87A, 370B, A40, 323C y la cepa 9643D-2 de *A. flavus* (ATCC), se asociaron con las cepas de referencia (MT347712.1, MT347711.1 y MT347713.1) con un bootstrap de 100%. Finalmente, el grupo III formó dos subgrupos. El subgrupo IIIa se formó con la cepa MYA3566 de *A. lentulus* (ATCC) y las cepas de referencia de *A. lentulus* (MN275501.1, MN275504.1 y MN257703.1) con un bootstrap de 84%. El subgrupo IIIb incluyó a los aislados MM12, MM16, MM18 y MM21, y a las cepas de referencia de *A. fumigatus* (MT347703.1, MT347702.1 y NT347701.1) con un bootstrap de 100% (Figura 7).

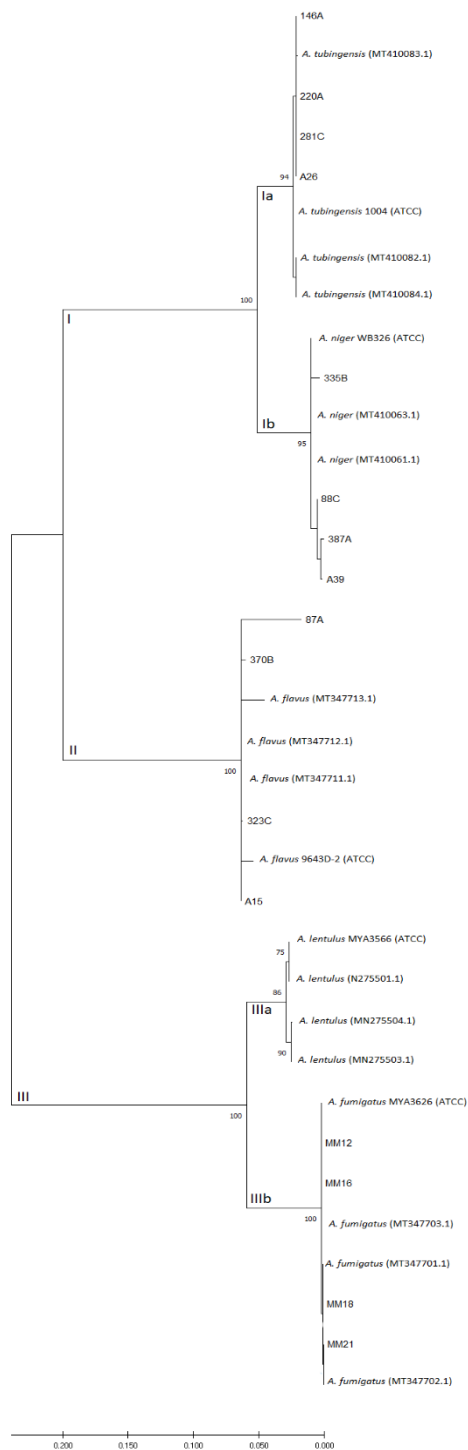


Figura 7. Análisis filogenético de secuencias amplificadas con el gen *BenA*. La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima verosimilitud con base en el modelo GTR implementado en el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). La significancia de los nodos de los grupos formados se determinó con 1000 repeticiones (bootstrap).

Selección de patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR, a través de un análisis cualitativo y cuantitativo

Selección cualitativa

Se obtuvieron patrones polimórficos con los 34 oligonucleótidos utilizados (anexo 1), presentando buenos polimorfismos que se encontraron en un intervalo de tamaño molecular de <100 a 2400 pb. Con base en la reproducibilidad de los patrones, y considerando los criterios de inclusión, se identificaron patrones polimórficos especie específicos para las especies utilizadas en este trabajo (Tabla 8).

Tabla 8. Oligonucleótidos seleccionados cualitativamente para las cuatro especies de *Aspergillus*.

Especie	Oligonucleótido seleccionado
<i>A. flavus</i>	P54
<i>A. fumigatus</i>	OPA-19
<i>A. niger</i>	1253
<i>A. tubingensis</i>	OPA-02

Selección cuantitativa

La base de datos incluyó 15000 datos (número de bandas, tamaño molecular, e intensidad de cada banda), a partir de los modelos generados por los 34 oligonucleótidos, se construyeron las curvas ROC y se seleccionaron los oligonucleótidos: OPC-06, OPF-01, OPF-07 y OPG-13 para *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. tubingensis*, respectivamente. La Figura 8 muestra los resultados de las curvas ROC obtenidas para los oligonucleótidos seleccionados, donde se observa una correlación especie específica con áreas bajo la curva mayores al 0.95, para los siguientes oligonucleótidos: a) OPC-06 con un área de 0.9632 para *A. flavus*, b) OPF-01 con un área de 1.0000 para *A. fumigatus*, c) OPF-07 con un área de 0.9971 para *A. niger* y d) OPG-13 con un área de 0.9810 para *A. tubingensis*.

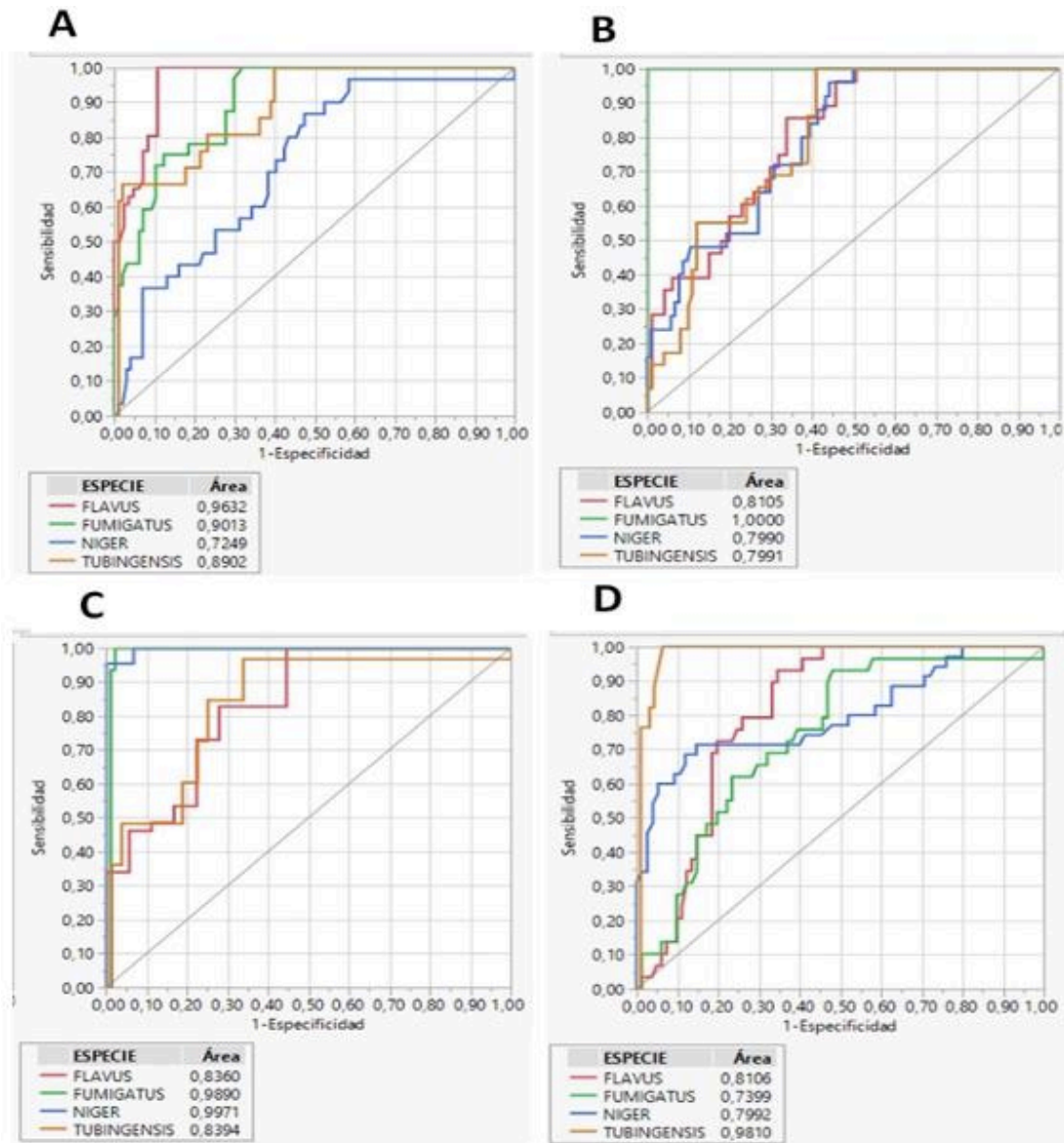


Figura 8. Curvas ROC de los oligonucleótidos seleccionados cuantitativamente. A): OPC-06, B): OPF-01, C): OPF-07 y D): OPG-13.

Comparación cualitativa y cuantitativa de los oligonucleótidos seleccionados

Con base en los datos obtenidos de las curvas ROC entre los oligonucleótidos seleccionados cualitativa y cuantitativamente se construyó una gráfica de sensibilidad vs especificidad. Los porcentajes de sensibilidad contra especificidad varían respecto de los oligonucleótidos seleccionados cualitativamente comparados con los seleccionados cuantitativamente, obteniendo los siguientes valores para cada una de las especies evaluadas: para *A. flavus* el oligonucleótido P54 tiene 91.58%, mientras que para OPC-06

se tiene un 96.32%; para *A. fumigatus* el oligonucleótido OPA-19 presentó 75.42% contra el oligonucleótido OPF-01 que tiene un 100%; para *A. niger* el oligonucleótido 1253 tiene 45.45%, mientras que para el oligonucleótido OPF-07 se obtuvo un 99.71%; y finalmente para *A. tubingensis* el oligonucleótido OPA-02 presentó un 66.07%, mientras que para el oligonucleótido OPG-13 se obtuvo un 98.10%. En la Figura 9, se muestran los porcentajes de sensibilidad y especificidad de los oligonucleótidos seleccionados cualitativamente y cuantitativamente respecto de las especies de *Aspergillus* evaluadas.

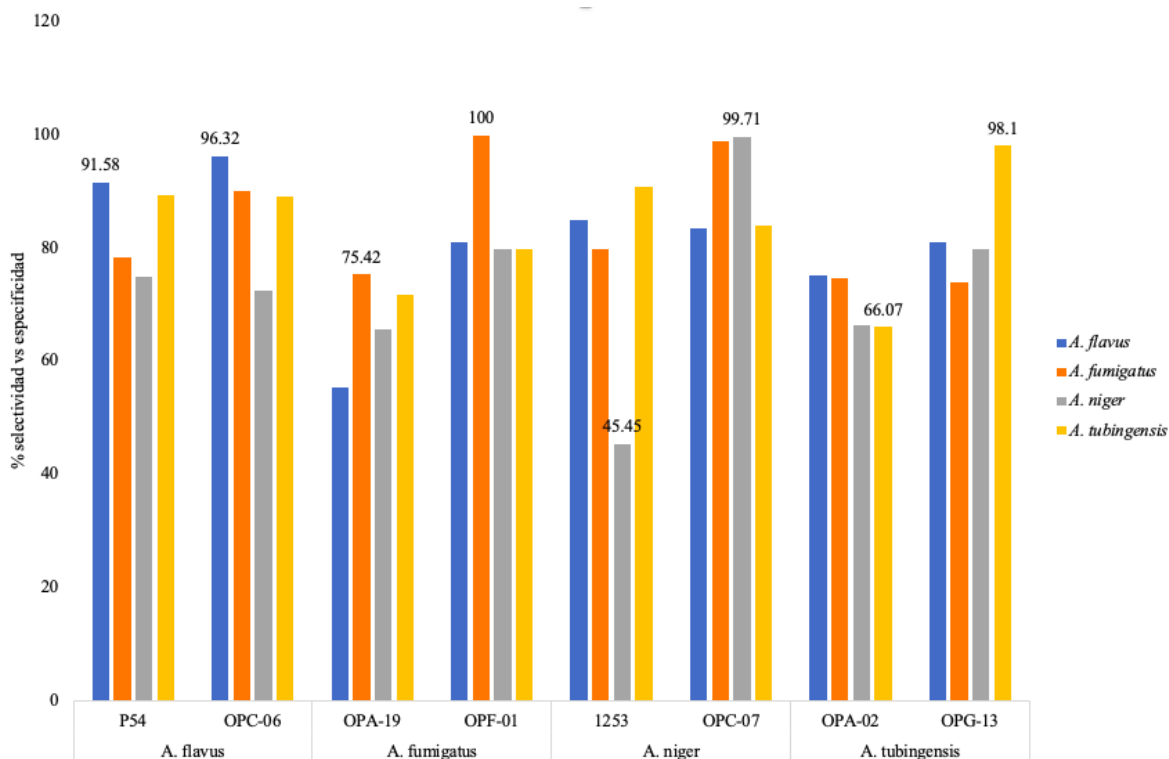


Figura 9. Porcentaje de sensibilidad y especificidad de los cuatro oligonucleótidos seleccionados cualitativamente (P54, OPA-19, 1253 y OPA-02) y cuantitativamente (OPC-06, OPF-01, OPF-07 y OPG-13), para cada especie de *Aspergillus* analizada.

En la Figura 9 se observa que los oligonucleótidos seleccionados cualitativamente mostraron un porcentaje (área ROC) menor de sensibilidad contra especificidad comparado con los seleccionados mediante el análisis de regresión logístico. Este mismo análisis, reveló que las variables de bandeo, pb, intensidad y bandas totales tienen diferente efecto en los modelos matemáticos y sobre los 34 diferentes oligonucleótidos analizados. Es decir, es capaz de marcar una diferencia estadística con base al análisis, con lo que se logra realizar una selección más precisa de los oligonucleótidos útiles para identificar las

diferentes especies estudiadas. El valor de probabilidad obtenido en cada uno de los patrones de bandas evaluados, fue estadísticamente significativo con $p < 0.0001$. Además, fueron obtenidas las fórmulas de probabilidad correspondientes para cada oligonucleótido seleccionado, con el objetivo de identificar otros aislados de *Aspergillus* y asignar la especie más probable.

Aplicación de los modelos matemáticos para identificar las especies de *Aspergillus*

En la Tabla 9 se observan los datos obtenidos de la aplicación del modelo de regresión logístico a los datos de los aislados de diferente origen geográfico, donde se muestran los resultados del porcentaje de correspondencia entre los oligonucleótidos OPC-06, OPF-01 y OPG-13, y la especie previamente identificada (*A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. tubingensis*). Las asociaciones más altas se obtuvieron con los oligonucleótidos: OPC-06 para *A. flavus* con una correlación de asociación a la especie >0.82 , OPF-01 para *A. fumigatus* >0.99 y OPG-13 para *A. tubingensis* >0.96 . Para OPF-07 y *A. niger* los resultados de correlación para identificar esta especie no corresponde, debido a que para las áreas bajo las curvas, obtenidas en este modelo se obtuvo un porcentaje de sensibilidad contra especificidad de 98.9% para los aislados de *A. fumigatus* y 99.71% para los aislados de *A. niger*, generando conflicto en la asignación de la especie; además *A. niger* mostró un alto polimorfismo con casi todos los oligonucleótidos y una baja especificidad.

Tabla 9. Resultados de correspondencia para cada especie.

	Oligonucleótido	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>
<i>A. flavus</i>	P54	91.58	78.44	74.99	89.47
	OPC-06	96.32	90.13	72.49	89.02
<i>A. fumigatus</i>	OPA-19	55.32	75.42	65.62	71.74
	OPF-01	81.05	100	79.9	79.91
<i>A. niger</i>	1253	84.86	79.72	45.45	90.9
	OPC-07	83.6	98.9	99.71	83.94
<i>A. tubingensis</i>	OPA-02	75.22	74.6	66.33	66.07
	OPG-13	81.06	73.99	79.92	98.1

El oligonucleótido OPC-06 permitió la obtención de patrones definidos únicamente para *A. flavus* y *A. fumigatus* (Figura 10).

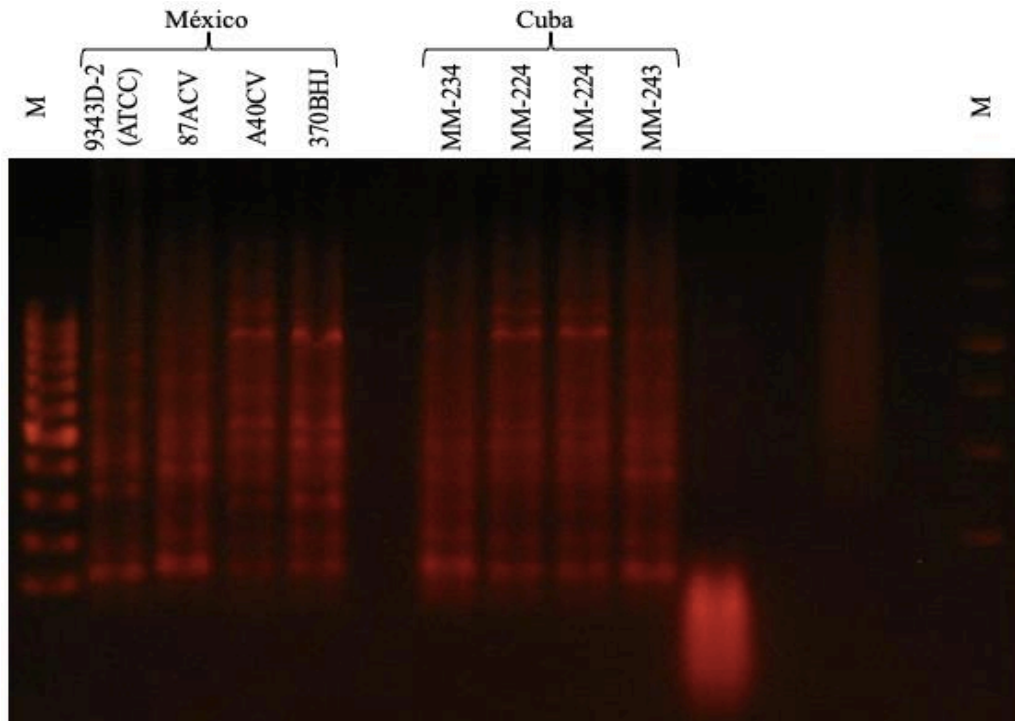


Figura 10. Patrones polimórficos de *A. flavus* con el oligonucleótido OPC-06.

El oligonucleótido OPF-01 demostró capacidad discriminante para *A. fumigatus* presentando un patrón definido y específico para este hongo (Figura 11).

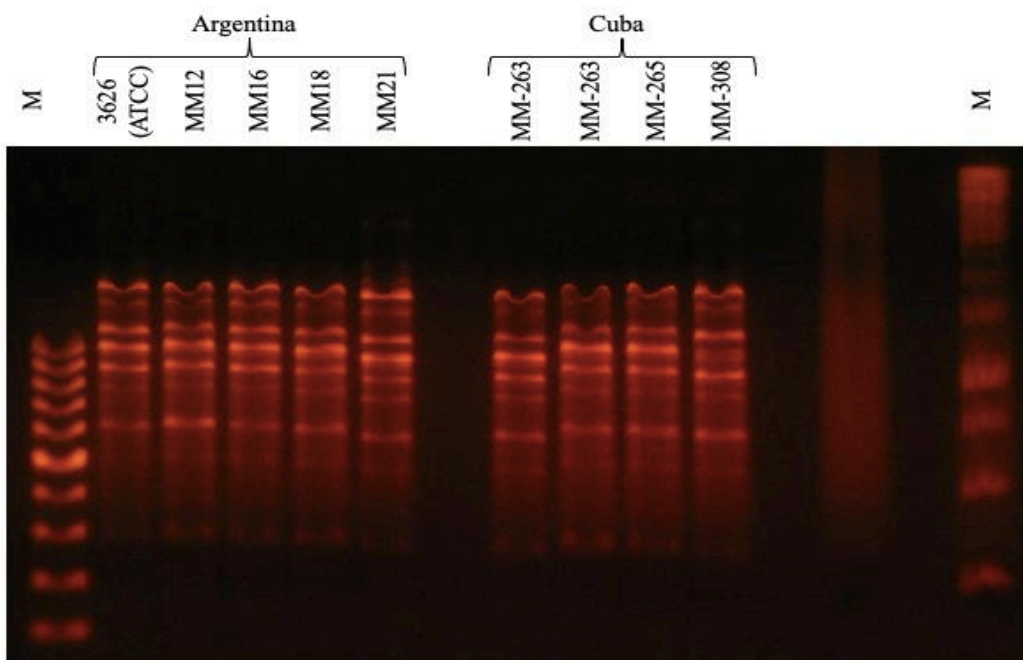


Figura 11. Patrones polimórficos de *A. fumigatus* con el oligonucleótido OPF-01.

En el caso del oligonucleótido OPF-07, la ausencia de bandas fue notoria en los aislados de *A. niger* (Figura 12).

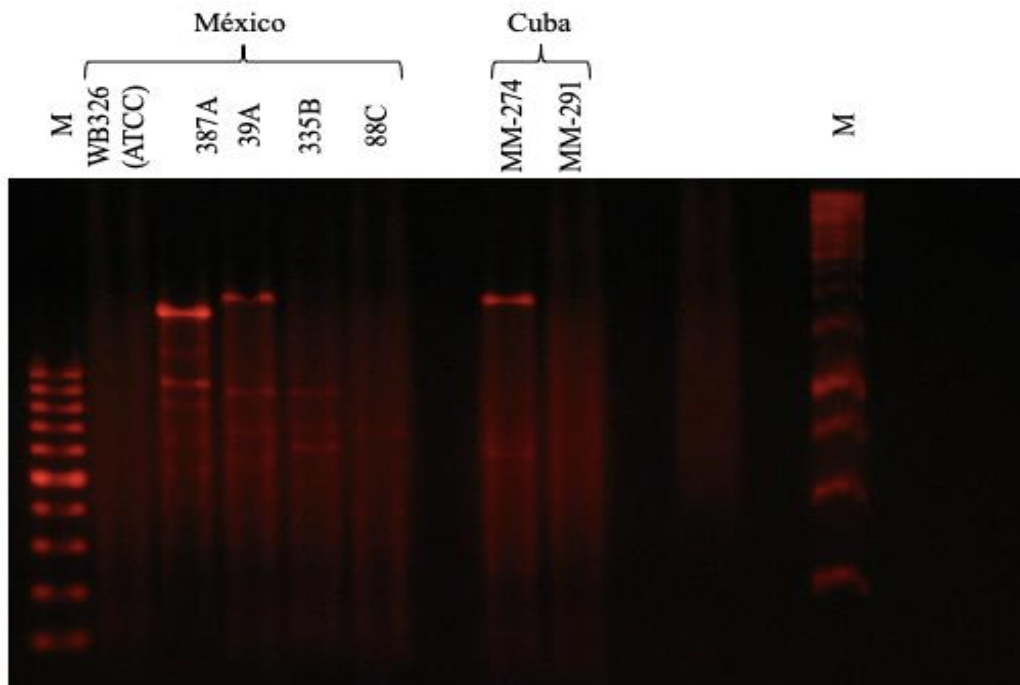


Figura 12. Patrones polimórficos de *A. niger* con el oligonucleótido OPF-07.

OPG-13 al igual que OPF-07, presentó un patrón polimórfico pobre para la mayoría de los aislados de *A. tubingensis* (Figura 13).

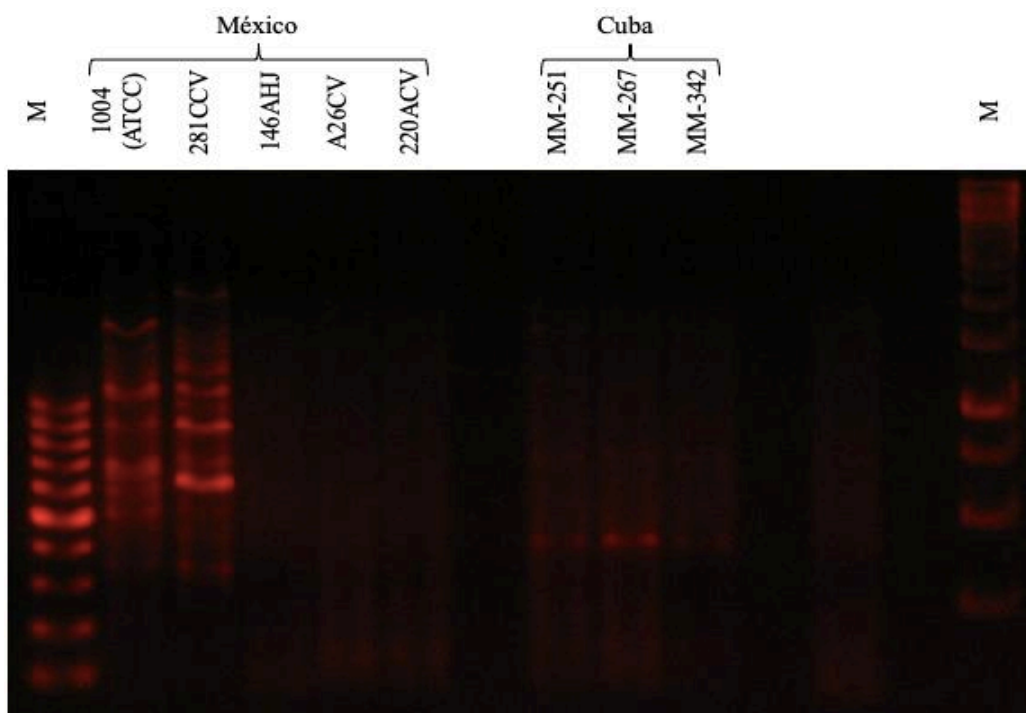


Figura 13. Patrones polimórficos de *A. tubingensis* con el oligonucleótido OPG-13.

Posteriormente, se compararon los patrones polimórficos de especies pertenecientes a la misma sección como *A. fumigatus* y *A. lentulus* (Figura 14). El oligonucleótido OPF-01 discriminó ambas especies.

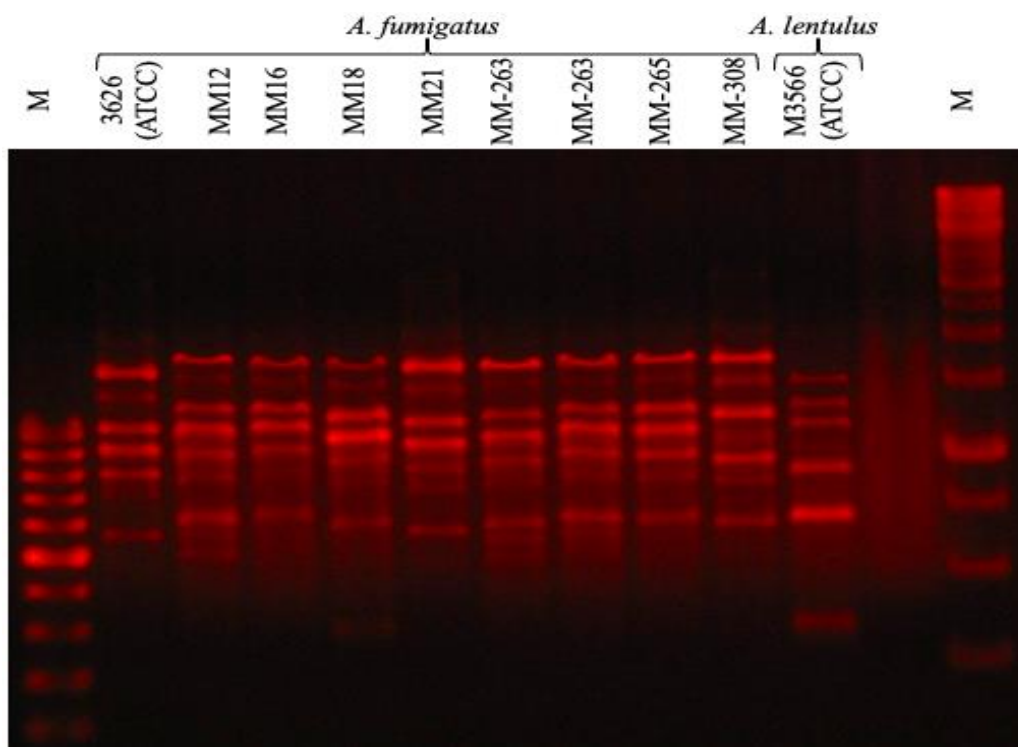


Figura 14. Patrones polimórficos de *A. fumigatus* y *A. lentulus* con el oligonucleótido OPF-01.

Asimismo, para *A. niger* y *A. tubingensis* se llevó acabo la técnica RAPD-PCR para analizar los patrones polimórficos y evaluar la capacidad discriminatoria del oligonucleótido OPF-07. Sin embargo, el patrón polimórfico de cada aislado fue pobre (Figura 15).

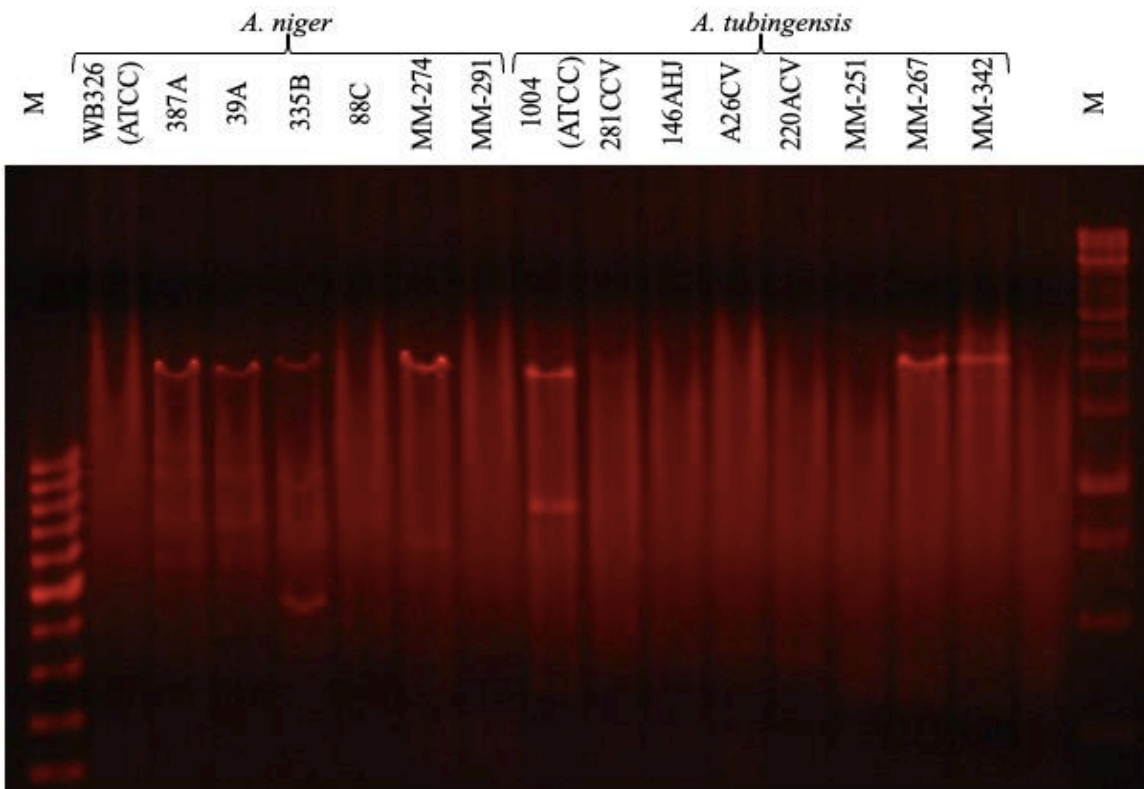


Figura 15. Patrones polimórficos de *A. niger* y *A. tubingensis* con el oligonucleótido OPF-07.

5. Discusión

En este trabajo se identificaron patrones polimórficos RAPD-PCR para la identificación de especies con importancia médica (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. tubingensis*) correspondientes a las secciones del género *Aspergillus*. En la actualidad es indispensable realizar una identificación a nivel especie, ya que éstas pueden diferir en algunas características clínicamente relevantes, como virulencia y resistencia a los antifúngicos disponibles para el tratamiento de la aspergilosis (Alcazar-Fuoli et al., 2008; Alhambra et al., 2008; Montenegro et al., 2009; Sugui et al., 2010; Van Der Linden et al., 2011). No obstante, que existen métodos fenotípicos de identificación para *Aspergillus* spp. como la macro y micromorfología e histopatología, en ocasiones esta tarea se torna difícil, y aunque existen marcadores moleculares, estos son poco sensibles y no específicos. Otra limitante en los métodos de diagnóstico molecular es el método de extracción de DNA, debido a los problemas de estandarización en el procesamiento de muestras (sangre, suero, plasma etc.), lo que conlleva a una demanda de diferentes técnicas (White et al., 2012). Debido a estos inconvenientes, "La estrategia de la iniciativa europea *Aspergillus* PCR" (EAPCRI)

recomienda tomar en cuenta algunas consideraciones para ejecutar una adecuada extracción del material genético lo que permite tener un diagnóstico confiable (White et al., 2012).

Además, las especies crípticas reportadas dentro del género *Aspergillus*, presentan diferente susceptibilidad a los antifúngicos, tal es el caso de *A. lentulus*, que presenta una disminución en la susceptibilidad a tres tipos de antifúngicos (azoles, polienos y equinocandinas) (Alcazar-Fuoli et al., 2008; Alastruey-Izquierdo et al., 2013, 2014; Escribano et al., 2013), por lo que, resulta importante la identificación a nivel especie. Actualmente, se cuenta con ensayos comerciales con base en la PCR para la identificación de especies del género *Aspergillus* como: MycAssay *Aspergillus*[®] (Myconostica Ltd., Cambridge, Reino Unido), AsperGenius[®] (PathoNostics, Maastricht, Países Bajos), MycoReal *Aspergillus*[®] (ingenetix GmbH, Austria), RenDX Fungiplex[®] (Renishaw United Diagnostics Ltd., Glasgow, Glasgow, Reino Unido), MycoGenie[®] (Ademtech, Pessac, Francia), GeneProof *Aspergillus* PCR[®] (Brno, Chequia), Fungiplex *Aspergillus*[®] (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania), *Aspergillus* spp. Alert Kit[®] (Nanogen, ahora ELITechGroup, Turín, Italia), LightCycler SeptiFast[®] (Roche Molecular Diagnostics, Penzberg, Alemania), *Aspergillus* Real-time PCR Panel[®] (Viracor Eurofins, Framingham, MA, Estados Unidos) y *A. fumigatus*[®] Bio-Evolution (Bio-Evolution, Bry-sur-Marne, Francia) (Rath y Steinmann 2018). Sin embargo, algunos de estos carecen de validación puesto que solo se dispone de datos sobre la sensibilidad y especificidad, lo que representa una limitante. Los que han sido validados como es el caso de AsperGenius[®], que es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la identificación de especies pertenecientes al complejo *A. fumigatus* (*A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. udagawae*, y *A. viridinutans*) y *Aspergillus* spp. (complejo *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, y *A. niger*), también permite identificar la resistencia a los azoles a través de las mutaciones en el gen *Cyp51A*, en *A. fumigatus*; éste ensayo tiene una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 84.2%, 91.4%, 76.2% y 96.6%, respectivamente (Chong et al., 2015). Otro ensayo validado es MycAssay *Aspergillus*[®]; éste mostró buena especificidad en la identificación de *Aspergillus* spp. incluyendo *A. fumigatus* en muestras de lavado bronco alveolar, especialmente para pacientes con neoplasias hematológicas; además, tiene una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 94.1%, 98.6%, 88.9% y 99.3%, respectivamente. Por lo anterior, AsperGenius[®] y MycAssay *Aspergillus*[®] son ensayos recomendados para la detección rutinaria de *Aspergillus* spp., por

la técnica de PCR en muestras respiratorias (Rath y Steinmann 2018). Sin embargo, estas pruebas útiles para la identificación de *Aspergillus* spp., identifican solo algunas especies y son diseñadas a partir de aislados no autóctonos, por lo que es necesario obtener marcadores moleculares de aislados autóctonos dada la variabilidad genética presentada por las especies de *Aspergillus*.

Con el propósito de obtener marcadores moleculares para especies de *Aspergillus*, se eligieron las especies *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. niger* y *A. tubingensis*, debido a que se encuentran entre los patógenos oportunistas humanos más importantes (Alhambra et al., 2008; Montenegro et al., 2009; Vinh et al., 2009; Fortún et al., 2012; Gautier et al., 2016) y están presentes en el ambiente hospitalario lo que indica que existe alto riesgo de contraer la aspergilosis, además, estos hongos son considerados la principal causa de aspergilosis invasiva en pacientes inmunocomprometidos (Martínez-Herrera et al., 2016). Inicialmente, estos aislados se identificaron a nivel de sección por macro y micromorfología, las características mencionadas de los aislados (resultados) concuerdan con la morfología descrita para esas secciones. Sin embargo, para la identificación a nivel especie se realizó por métodos moleculares. Samson et al. (2014) recomiendan realizar la identificación de *Aspergillus* utilizando los genes ITS, β -tubulina o calmodulina. En este trabajo se decidió utilizar el gen *BenA*, debido a que varios autores (Verweij et al., 2008; Sutton et al., 2009; Vinh et al., 2009; Hubka et al., 2012; Won-Bok et al., 2020) consideran que la identificación de especies del género *Aspergillus* con este gen es útil. Mientras que la región ITS ha demostrado ser útil para la identificación únicamente a nivel de género/sección, ya que esta región no discrimina la identificación de especies en determinadas secciones (Varga et al., 2007; Samson et al., 2007). Por otro lado, aunque el gen *CaM* es útil para la identificación de especies de *Aspergillus*, presenta limitaciones debido a que no existen secuencias de referencia correspondientes a todas las especies de la sección *Fumigati* depositadas en GenBank para poder realizar la comparación de secuencias e identificar el agente fúngico a nivel especie (Duarte-Escalante et al., 2020). Por lo antes mencionado el gen *BenA* demostró ser el idóneo para identificar los aislados fúngicos a nivel especie.

Una vez identificados los aislados a nivel especie se procedió a llevar a cabo la técnica de RAPD-PCR, para ello se utilizaron un total de 34 oligonucleótidos. Se obtuvieron patrones polimórficos adecuados con todos los oligonucleótidos para cada especie, algunos de estos fueron seleccionados al azar y otros con base en lo reportado en la literatura por su capacidad para la identificación a nivel especie, como lo reportó Pena et al. (2018) quienes

utilizaron dos oligonucleótidos para realizar la técnica de RAPD-PCR (PELF y URP1F) y reportan una exitosa identificación y diferenciación entre las especies estrechamente relacionadas con *A. fumigatus sensu stricto* como *A. novofumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. udagawae* y *A. lentulus*. Además, Hong et al. (2010) consideran que la técnica RAPD-PCR con los oligonucleótidos PELF y URP1F puede ser considerado un método rápido y confiable para identificar *A. fumigatus* y *A. lentulus*. Sin embargo, en este trabajo, el oligonucleótido PELF no presentó un patrón de bandas especie específico para la diferenciación de *A. fumigatus* y *A. lentulus*. Por otro lado, el oligonucleótido R108 utilizado en este estudio presentó un patrón especie específico para *A. lentulus*. Sustentando lo reportado por Swilaiman et al. (2013) quienes al emplear la técnica de RAPD-PCR utilizando cuatro oligonucleótidos (OMT1, R108, R151 y OPWO8), demostraron que producían polimorfismos adecuados para la genotipificación de *A. lentulus*.

Todos los oligonucleótidos generaron patrones polimórficos entre 3 y 12 bandas claras y reproducibles. Con el fin de seleccionar los oligonucleótidos que produjeran patrones polimórficos especie específicos para las especies estudiadas, se llevó a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo.

Con respecto al análisis cualitativo, los oligonucleótidos seleccionados más representativos fueron: OPA-19 sólo fue específico para *A. fumigatus* y P54 discriminó todas las especies estudiadas. Lo antes mencionado concuerda con lo reportado por Kermani et al. (2016) quienes utilizaron el oligonucleótido P54 y obtuvieron patrones polimórficos para tipificar 38 aislados de *Aspergillus*, este oligonucleótido identificó las diferentes especies *Aspergillus* aisladas de muestras de aire en Tehran, Iran.

En el caso del oligonucleótido 1253 se obtuvo un patrón polimórfico semejante para *A. tubingensis* y *A. niger*, posiblemente se deba a que son especies que pertenecen a la misma sección (*Nigri*), no obstante, el patrón de *A. tubingensis* se caracteriza por la presencia de una banda de 1700 pb. Por lo anterior, puede considerarse como un oligonucleótido que discrimine ambas especies, sin embargo, los patrones de bandas presentados por los diferentes aislados de *A. niger* son variables.

Con base en los resultados poco contundentes y fiables de la selección cualitativa se llevó a cabo una selección cuantitativa.

Dentro del grupo de los oligonucleótidos seleccionados cuantitativamente, el oligonucleótido OPC-06 presentó un patrón de bandas únicamente para dos especies (*A. flavus* y *A. fumigatus*). No obstante, es específico para *A. flavus*. OPF-07 y OPG13, se caracterizaron porque el patrón presentado fue pobre para la mayoría de los aislados. Sin embargo, este último es específico para *A. tubingensis*. Mientras que el oligonucleótido OPF-01 demostró ser útil para discriminar todas las especies incluídas en este estudio. Por lo que se llevó acabo la técnica RAPD-PCR con especies estrechamente relacionadas como es el caso de *A. fumigatus* y *A. lentulus*. Este diferenció una especie con respecto a la otra. La diferencia mostrada es con base en el número de bandas obtenidas, *A. fumigatus* presentó 9 bandas (500-1800 pb), mientras que *A. lentulus* tuvo un menor número de bandas (6) con pesos moleculares de 300-1600 pb. Cabe mencionar que este oligonucleótido, no se había empleado en RAPD-PCR para la tipificación de especies del género *Aspergillus*. No obstante, se ha utilizado en otras especies como *Paracoccidioides brasiliensis* (de Moraes Borba et al., 2008), sin embargo, en la tipificación de este hongo no diferenció entre especies.

Los oligonucleótidos seleccionados cualitativa y cuantitativamente son diferentes. De acuerdo con los resultados, los patrones polimórficos obtenidos con los oligonucleótidos seleccionados cuantitativamente proporcionaron patrones reproducibles y especie específicos. Esta selección se debió a que se construyó una base de datos a partir de las características de los perfiles polimórficos, lo que permitió la obtención de modelos matemáticos para ser evaluados a través de las curvas ROC (sensibilidad vs especificidad) y estas nos permitieron seleccionar los oligonucleótidos especie específicos.

Por lo anterior se considera que estos patrones polimórficos son una herramienta importante para la identificación de las especies como lo considera Diba et al. (2014), quienes verifican que el análisis RAPD-PCR es una huella genética útil para identificar *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. Cabe mencionar que el análisis por medio de la técnica de RAPD-PCR también se ha empleado para la identificación de otros géneros fúngicos como *Penicillium* (Bakri et al., 2007), *Fusarium* (Baysal et al., 2010), *Trichoderma cf. harzianum* (Pérez et al., 2014) y *Candida* (Trtkova et al., 2009; Mesini et al., 2020).

6. Conclusiones

La selección de oligonucleótidos que producen patrones polimórficos por RAPD-PCR para la identificación clínica de especies de *Aspergillus*, se llevó a cabo por análisis cualitativo y cuantitativo. Por el análisis cualitativo se seleccionaron los oligonucleótidos P54 y OPA-19 que generaron patrones polimórficos específicos para *A. flavus* y *A. fumigatus*, respectivamente. Sin embargo, el análisis cuantitativo, dadas sus características operativas, fue específico y selectivo de cada especie, seleccionando los oligonucleótidos OPC-06, OPF-01 y OPG-13 que generaron patrones polimórficos específicos para *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. tubingensis*, respectivamente. Se recomienda el uso del oligonucleótido OPF-01 para diferenciar *A. fumigatus* de *A. lentulus*.

La técnica de RAPD-PCR permite la identificación de especies de *Aspergillus* de forma rápida, sencilla, y no requiere de secuenciación, logrando con ello mejorar los métodos de diagnóstico de la aspergilosis. Los métodos cuantitativos más que los cualitativos permitieron seleccionar oligonucleótidos especie específicos para discriminar entre especies.

7. Referencias Bibliográficas

1. Micheli PA. Nova plantarvm genera ivxta Tovrnefortii methodvm disposita. Florence 1729.
2. Haller A von. Historia stirpium indigenarum Helvetiae inchoata. Bernae 1968.
3. Fries EM. Systema Mycologicum. E. Mauritius, Gryphiswald 1832.
4. Sklenar F, Jurjevic Z, Peterson SW, Kolarík M, Novákova A, Flieger M, Stodulková E, Kubátová A, Hubka V. Increasing the species diversity in the *Aspergillus* section *Nidulantes*: Six novel species mainly from the indoor environment. *Mycologia* 2020; 112(2): 342-370. DOI: [10.1080/00275514.2019.1698923](https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1698923)
5. Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clinical Microbiology and Infection* 2016; 22(8): 662-669. DOI: [10.1016/j.cmi.2016.05.013](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.013)
6. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 2014; 78: 141-173. DOI: [10.1016/j.simyco.2014.07.004](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004)
7. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore 1965.
8. Gams W, Christensen M, Onions AH, et al. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* (Samson RA, Pitt JI, eds). Plenum Press, New York 1985: 55-62.
9. Peterson SW. Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 2008; 100(2): 205-226. DOI: [10.3852/mycologia.100.2.205](https://doi.org/10.3852/mycologia.100.2.205)
10. Houbraken J, Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology* 2014; 86: 199-249. DOI: [10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4)
11. Samson RA, Varga J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: *Aspergillus: molecular biology and genomics* (Machida M, Gomi K, eds). Horizon Press, 2009: 19-40.
12. Debuchy R, Berteaux-Lecellier V, Silar P. Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. In: *Cellular and molecular biology of filamentous fungi* (Borkovich KA, Ebbole DJ, eds). ASM Press, Washington 2010: 501-535.
13. O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009; 457(7228): 471-474. DOI: [10.1038/nature07528](https://doi.org/10.1038/nature07528)
14. Swilaiman SS, O’Gorman CM, Balajee SA, Dyer PS. Discovery of a Sexual Cycle in *Aspergillus lentulus*, a Close Relative of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 2013; 12(7): 962-969. DOI: [10.1128/EC.00040-13](https://doi.org/10.1128/EC.00040-13)
15. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*, 3rd ed. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center 2011.

16. Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, Meijer M, Noonim P, Mahakarnchanakul W, Samson RA. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 2007; 59: 53-66. DOI: [10.3114/sim.2007.59.07](https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07)
17. Oelofse D, Dubery IA, Meyer R, Arendse MS, Gazendam I, Berger DK. Apple polygalacturonase inhibiting protein1 expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. *Phytochemistry* 2006; 67(3): 255-263. DOI: [10.1016/j.phytochem.2005.10.029](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.10.029)
18. Aïmanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latgé JP. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 2009; 460(7259): 1117-1121. DOI: [10.1038/nature08264](https://doi.org/10.1038/nature08264)
19. Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, Rediers H, Lievens B. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology* 2016; 10(2): 296-322. DOI: [10.1111/1751-7915.12367](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367)
20. Denning DW. *Aspergillosis*. Schering-Plough Corporation, 2006. Disponible en la pagina web de *Aspergillus*: <http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?library.php~main>.
21. Kradin RL, Mark EJ. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2008; 132(4): 606-614. DOI: [10.1043/1543-2165\(2008\)132\[606:TPOPDD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/1543-2165(2008)132[606:TPOPDD]2.0.CO;2)
22. Sugui JA, Vinh DC, Nardone G, Shea YR, Chang YC, Zelazny AM, Marr KA, Holland SM, Kwon-Chung KJ. *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an emerging agent of aspergillosis: how different is it from *Aspergillus fumigatus*? *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(1): 220-228. DOI: [10.1128/JCM.01556-09](https://doi.org/10.1128/JCM.01556-09)
23. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52(4): 1244–1251. DOI: [10.1128/AAC.00942-07](https://doi.org/10.1128/AAC.00942-07)
24. Balajee SA. *Aspergillus terreus* complex. *Medical Mycology* 2009; 47(Suppl 1): S42-S46. DOI: [10.1080/13693780802562092](https://doi.org/10.1080/13693780802562092)
25. Varga J, Houbraeken J, Van Der Lee HA, Verweij PE, Samson RA. *Aspergillus calidoustus* sp. nov. causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus*. *Eukaryotic Cell* 2008; 7(4): 630-638. DOI: [10.1128/EC.00425-07](https://doi.org/10.1128/EC.00425-07)
26. Boekhout T, Gueidan C, De Hoog S, Samson R, Varga J, Walther G. Fungal taxonomy: New developments in medically important fungi. *Current Fungal Infection Reports* 2009; 3(3): 170–178. DOI: [10.1007/s12281-009-0022-x](https://doi.org/10.1007/s12281-009-0022-x)
27. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. 3a ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2009. CD-ROM version; 2009.
28. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infectious Disease Clinics of North America* 2006; 20(3): 545–561. DOI: [10.1016/j.idc.2006.06.001](https://doi.org/10.1016/j.idc.2006.06.001)
29. Panackal AA, Bennett JE, Williamson PR. Treatment options in Invasive Aspergillosis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases* 2014; 6(3): 309–325. DOI: [10.1007/s40506-014-0016-2](https://doi.org/10.1007/s40506-014-0016-2)
30. Verweij PE, Varga J, Houbraeken J, Rijs AJMM, Verduynlunel FM, Blijlevens NMA, Shea YR, Holland SM, Warris A, Melchers WJG, Samson RA. *Emericella quadrilineata* as cause of invasive aspergillosis. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 14(4): 566-572. DOI: [10.3201/eid1404.071157](https://doi.org/10.3201/eid1404.071157)

31. Vinh DC, Shea YR, Sugui JA, Parrilla-Castellar ER, Freeman AF, Campbell JW, Pittaluga S, Jones PA, Zelazny A, Kleiner D, Kwon-Chung KJ, Holland SM. Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 49(1): 102-111. DOI: [10.1086/599345](https://doi.org/10.1086/599345)
32. Pavie J, Lacroix C, Hermoso DG, Robin M, Ferry C, Bergeron A, Feuilhade M, Dromer F, Gluckman E, Molina JM, Ribaud P. Breakthrough disseminated *Aspergillus ustus* infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole or caspofungin prophylaxis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(9): 4902-4904. DOI: [10.1128/JCM.43.9.4902-4904.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4902-4904.2005)
33. Gupta K, Gupta P, Mathew JL, Bansal A, Singh G, Singh M, Chakrabarti A. Fatal disseminated *Aspergillus penicillioides* infection in a three-month-old infant with suspected cystic fibrosis: autopsy case report with review of literature. *Pediatric and Developmental Pathology* 2016; 19(6): 506-511. DOI: [10.2350/15-10-1729-CR.1](https://doi.org/10.2350/15-10-1729-CR.1)
34. Peláez T, Álvarez-Pérez S, Mellado E, Serrano D, Valerio M, Blanco JL, García ME, Muñoz P, Cuenca-Estrella M, Bouza E. Invasive aspergillosis caused by cryptic *Aspergillus* species: a report of two consecutive episodes in a patient with leukaemia. *Journal of Medical Microbiology* 2013; 62(Pt 3): 474–478. DOI: [10.1099/jmm.0.044867-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.044867-0)
35. Barrs VR, van Doorn TM, Houbraken J, Kidd SE, Martin P, Pinheiro MD, Richardson M, Varga J, Samson RA. *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs. *PLoS ONE* 2013; 8(6): e64871. DOI: [10.1371/journal.pone.0064871](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064871)
36. Vinh DC, Shea YR, Jones PA, Freeman AF, Zelazny A, Holland SM. Chronic Invasive Aspergillosis caused by *Aspergillus viridinutans*. *Emerging Infectious Diseases* 2009; 15(8): 1292-1294. DOI: [10.3201/eid1508.090251](https://doi.org/10.3201/eid1508.090251)
37. Gautier M, Normand AC, L'Ollivier C, Cassagne C, Reynaud-Gaubert M, Dubus JC, Brégeon F, Hendrickx M, Gomez C, Ranque S, Piarrou R. *Aspergillus tubingensis*: a major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. *Medical Mycology* 2016; 54(5): 459–470. DOI: [10.1093/mmy/myv118](https://doi.org/10.1093/mmy/myv118)
38. Sutton DA, Wickes BL, Romanelli AM, Rinaldi MG, Thompson EH, Fothergill AW, Dishop MK, Elidemir O, Mallory GB, Moonnamakal SP, Adesina AM, Schechter MG. Cerebral aspergillosis caused by *Aspergillus granulosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(10): 3386-3390. DOI: [10.1128/JCM.00588-09](https://doi.org/10.1128/JCM.00588-09)
39. Hubka V, Kubatova A, Mallatova N, Sedlacek P, Melichar J, Skorepova M, Mencl K, Lyskova P, Sramkova B, Chudickova M, Hamal P, Kolarik M. Rare and new etiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterized by molecular sequencing. *Medical Mycology* 2012; 50(6): 601-610. DOI: [10.3109/13693786.2012.667578](https://doi.org/10.3109/13693786.2012.667578)
40. Damek DM, Lillehei KO, Kleinschmidt-DeMasters BK. *Aspergillus terreus* brain abscess mimicking tumor progression in a patient with treated glioblastoma multiforme. *Clinical Neuropathology* 2008; 27(6): 400-407. DOI: [10.5414/NPP27400](https://doi.org/10.5414/NPP27400)

41. Muraoka S, Araki Y, Izumi T, Takeuchi K, Okamoto S, Wakabayashi T. Cerebral infarction and subarachnoid hemorrhage caused by central nervous system *Aspergillus* infection. *World Neurosurgery* 2016; 90: 705.e9-705.e13. DOI: [10.1016/j.wneu.2016.03.021](https://doi.org/10.1016/j.wneu.2016.03.021)
42. Öz Y, Ozdemir HG, Gokbolat E, Kiraz N, Ilkit M, Seyedmousavi S. Time-Kill Kinetics and In Vitro Antifungal Susceptibility of Non-fumigatus *Aspergillus* Species Isolated from Patients with Ocular Mycoses. *Mycopathologia* 2016; 181(3-4): 225–233. DOI: [10.1007/s11046-015-9969-z](https://doi.org/10.1007/s11046-015-9969-z)
43. Posteraro B, Mattei R, Trivella F, Maffei A, Torre A, De Carolis E, Posteraro P, Fadda G, Sanguinetti M. Uncommon *Neosartorya udagawae* Fungus as a Causative Agent of Severe Corneal Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49(6): 2357–2360. DOI: [10.1128/JCM.00134-11](https://doi.org/10.1128/JCM.00134-11)
44. Al-Hatmi AMS, Alcantara Castro M, Sybren de Hoog G, Badali H, Flores Alvarado V, Verweij PE, Meis JF, Vanzzini Zago V. Epidemiology of *Aspergillus* species causing keratitis in Mexico. *Mycoses* 2019; 62: 144–151. DOI: [10.1111/myc.12855](https://doi.org/10.1111/myc.12855)
45. Vanzzini Zago V, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Gómez-Leal A, López Martínez R. Queratomicosis en un centro de atención oftalmológica en la Ciudad de México. *Revista Iberoamericana de Micología* 2010; 27(2): 57–61. DOI: [10.1016/j.riam.2009.09.003](https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.09.003)
46. Zotti M, Machetti M, Perotti M, Barabino G, Persi A. A new species, *Aspergillus persii*, as an agent of onychomycosis. *Medical Mycology* 2010; 48(4): 656–660. DOI: [10.3109/13693780903420641](https://doi.org/10.3109/13693780903420641)
47. Horré R, Symoens F, Delhaes L, Bouchara JP. Fungal respiratory infections in cystic fibrosis: a growing problem. *Medical Mycology* 2010; 48(Suppl. 1): S1–S3. DOI: [10.3109/13693786.2010.529304](https://doi.org/10.3109/13693786.2010.529304)
48. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *Journal of Hospital Infection* 2006; 63(3): 246-254. DOI: [10.1016/j.jhin.2006.02.014](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.02.014)
49. Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: Epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs* 2007; 67(11): 1567-1601. DOI: [10.2165/00003495-200767110-00004](https://doi.org/10.2165/00003495-200767110-00004)
50. Galimberti R, Torre AC, Baztán MC, Rodríguez-Chiappetta F. Emerging systemic fungal infections. *Clinics in Dermatology* 2012; 30(6): 633-650. DOI: [10.1016/j.clindermatol.2012.01.011](https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.01.011)
51. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada* 5a ed. McGraw-Hill, México 2014. Pág. 293.
52. Fukuda T, Boeckh M, Guthrie KA, Mattson DK, Owens S, Wald A, Sandmaier B, Corey L, Storb R, Marr KA. Invasive aspergillosis before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 10-year experience at a single transplant center. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2004; 10(7): 494–503. DOI: [10.1016/j.bbmt.2004.02.006](https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2004.02.006)
53. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2012; 30(4): 201–208. DOI: [10.1016/j.eimc.2011.12.005](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.12.005)
54. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Boktour MR, Afif C, Cooksley C, Bodey GP, Chatzinikolaou I, Perego C, Kantarjian H, Raad I. *Aspergillus terreus*: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 2004; 101(7): 1594–1600. DOI: [10.1002/cncr.20554](https://doi.org/10.1002/cncr.20554)
55. Nedel WL, Pasqualotto AC. Treatment of Infections by Cryptic *Aspergillus* Species. *Mycopathologia* 2014; 178: 441-445. DOI: [10.1007/s11046-014-9811-z](https://doi.org/10.1007/s11046-014-9811-z)
56. Gonçalves SS, Stchigel A, Cano J, Guarro J, Colombo AL. *In vitro* antifungal susceptibility of clinically relevant species belonging to *Aspergillus* section *Flavi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; 57(4): 1944-1947. DOI: [10.1128/AAC.01902-12](https://doi.org/10.1128/AAC.01902-12)

57. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53(10): 4514–4517. DOI: [10.1128/AAC.00585-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00585-09)
58. Kathuria S, Sharma C, Singh PK, Agarwal P, Agarwal K, Hagen F, Meis JF, Chowdhary A. Molecular epidemiology and *in vitro* antifungal susceptibility of *Aspergillus terreus* species complex isolates in Delhi, India: evidence of genetic diversity by amplified fragment length polymorphism and microsatellite typing. *PLoS ONE* 2015; 10(3): e0118997. DOI: [10.1371/journal.pone.0118997](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118997)
59. Howard SJ. Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. *Mycopathologia* 2014; 178(5-6): 435-439. DOI: [10.1007/s11046-014-9774-0](https://doi.org/10.1007/s11046-014-9774-0)
60. Negri CE, Gonçalves SS, Xafranski H, Bergamasco MD, Aquino VR, Castro PTO, Colombo AL. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: Prevalence in clinical samples and *in vitro* susceptibility to triazoles. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(10): 3633-3640. DOI: [10.1128/JCM.01582-14](https://doi.org/10.1128/JCM.01582-14)
61. Ramanan P, Wengenack NL, Theel ES. Laboratory diagnostics for fungal infections: a review of current and future diagnostic assays. *Clinics in Chest Medicine* 2017; 38(3): 535–554. DOI: [10.1016/j.ccm.2017.04.013](https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.013)
62. Bassetti M, Peghin M, Vena A. Challenges and Solution of Invasive Aspergillosis in Non-neutropenic Patients: A Review. *Infectious Diseases and Therapy* 2018; 7(1): 17-27. DOI: [10.1007/s40121-017-0183-9](https://doi.org/10.1007/s40121-017-0183-9)
63. Prattes J, Flick H, Pruller F, Koidl C, Raggam RB, Palfner M, Eigl S, Buzina W, Zollner-Schwetz I, Thornton C, Krause R, Hoenigl M. Novel tests for diagnosis of invasive aspergillosis in patients with underlying respiratory diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2014; 190(8): 922-929. DOI: [10.1164/rccm.201407-1275OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201407-1275OC)
64. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 42(10): 1417–1727. DOI: [10.1086/503427](https://doi.org/10.1086/503427)
65. Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, Touratier S, Raffoux E, Menotti J, Derouin F, Ribaud P. Use and limits of (1-3)-beta-d-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (Platelia *Aspergillus*), for diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(7): 2328–2333. DOI: [10.1128/JCM.03567-13](https://doi.org/10.1128/JCM.03567-13)
66. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews* 2014; 27(3): 490–526. DOI: [10.1128/CMR.00091-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00091-13)
67. Powers-Fletcher MV, Hanson KE. Molecular diagnostic testing for *Aspergillus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2016; 54(11): 2655–2660. DOI: [10.1128/JCM.00818-16](https://doi.org/10.1128/JCM.00818-16)
68. Fernandez-Molina JV, Abad-Diaz-de-Cerio A, Sueiro-Olivares M, Pellon A, Ramirez-Garcia A, Garaizar J, Pemán J, Hernando FL, Rementeria A. Rapid and specific detection of section *Fumigati* and *Aspergillus fumigatus* in human samples using a new multiplex real-time PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2014; 80(2): 111-118. DOI: [10.1016/j.diagmicrobio.2014.06.003](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.06.003)
69. Won-Bok K, Chulmin P, Sung-Yeon C, Hye-Sun C, Dong-Gun L. Development of multiplex real-time PCR for rapid identification and quantitative analysis of *Aspergillus* species. *PLoS ONE* 2020; 15(3): e0229561. DOI: [10.1371/journal.pone.0229561](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229561)
70. Duarte-Escalante E, Frías-De-León MG, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Rosas de Paz E, Reséndiz-Sánchez J, Refojo N, Reyes-Montes MR. Identification of CSP types and genotypic variability of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* from different geographic origins. *Microorganisms* 2020; 8: 688. DOI: [10.3390/microorganisms8050688](https://doi.org/10.3390/microorganisms8050688)

71. Hong SB, Kim DH, Park IC, Choi YJ, Shin HD, Samson R. Re-identification of *Aspergillus fumigatus* sensu lato based on a new concept of species delimitation. *Journal of Microbiology* 2010; 48(5): 607–615. DOI: [10.1007/s12275-010-0084-z](https://doi.org/10.1007/s12275-010-0084-z)
72. Kermani F, Shams-Ghahfarokhi M, Gholami-Shabani M, Razzaghi-Abyaneh M. Diversity, molecular phylogeny and fingerprint profiles of airborne *Aspergillus* species using random amplified polymorphic DNA. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2016; 32(6): 96. DOI: [10.1007/s11274-016-2052-1](https://doi.org/10.1007/s11274-016-2052-1)
73. Pena GA, Alonso V, Velasco Manini M, Pellegrino M, Cavaglieri LR. Molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* isolated from raw cow milk in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 2018; 275. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.018](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.018)
74. Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd ed.; Springer: New York, 1997: 377-385.
75. Riddell RW. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* 1950; 42(2): 265-270. DOI: [10.1080/00275514.1950.12017830](https://doi.org/10.1080/00275514.1950.12017830)
76. Calderón C, Ward E, Freeman J, McCartney A. Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *Journal of Aerosol Science* 2002; 33(2): 283-296. DOI: [10.1016/S0021-8502\(01\)00179-3](https://doi.org/10.1016/S0021-8502(01)00179-3)
77. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; 61(4): 1323-1330. DOI: [10.1128/AEM.61.4.1323-1330.1995](https://doi.org/10.1128/AEM.61.4.1323-1330.1995)
78. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 1997; 25(17): 3389-3402. DOI: [10.1093/nar/25.17.3389](https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389)
79. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30(4): 772-780. DOI: [10.1093/molbev/mst010](https://doi.org/10.1093/molbev/mst010)
80. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 2012; 9(8): 772. DOI: [10.1038/nmeth.2109](https://doi.org/10.1038/nmeth.2109)
81. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 2016; 33(7): 1870-1874. DOI: [10.1093/molbev/msw054](https://doi.org/10.1093/molbev/msw054)
82. Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *Journal of Bacteriology* 1992; 174(22): 7075-7079. DOI: [10.1128/jb.174.22.7075-7079.1992](https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7075-7079.1992)
83. Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31(2): 463-464. DOI: [10.1128/jcm.31.2.463-464.1993](https://doi.org/10.1128/jcm.31.2.463-464.1993)
84. Hu J, van Eysden J, Quiros CF. Generation of DNA-based markers in specific genome regions by two-primer RAPD reactions. *PCR Methods and Applications* 1995; 4(6): 346-351.
85. Fiuza PM, Rodríguez PJC. La regresión logística: una herramienta versátil. *Nefrología* 2000; 20(6): 495-500.

86. Fawcett T. ROC graphs: Notes and practical considerations for researchers. *Machine learning* 2004; 31: 1-38.
87. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30(12): 2725-2729. DOI: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197)
88. Alhambra A, Catalán M, Moragues MD, Brena S, Pontón J, Montejo JC, del Palacio A. Isolation of *Aspergillus lentulus* in Spain from a critically ill patient with chronic obstructive pulmonary disease. *Revista Iberoamericana de Micología* 2008; 25(4): 246–249. DOI: [10.1016/s1130-1406\(08\)70058-5](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70058-5)
89. Montenegro G, Sánchez Puch S, Jewtuchowicz VM, Pinoni MV, Relloso S, Temporitti E, Iovannitti CA, Mujica MT. Phenotypic and genotypic characterization of *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis. *Journal of Medical Microbiology* 2009; 58(Pt 3): 391–395. DOI: [10.1099/jmm.0.005942-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.005942-0)
90. Van Der Linden JWM, Warris A, Verweij PE. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Medical Mycology* 2011; 49(Suppl 1): S82–S89. DOI: [10.3109/13693786.2010.499916](https://doi.org/10.3109/13693786.2010.499916)
91. White PL, Loeffler J, Barnes RA, Donnelly P. Towards a standard for *Aspergillus* PCR-requirements, process and results. *Infectio* 2012; 16(Supl 3): 64-72. DOI: [10.1016/S0123-9392\(12\)70029-2](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70029-2)
92. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; 57(7): 3380–3387. DOI: [10.1128/AAC.00383-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00383-13)
93. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia* 2014; 178(5-6): 427–433. DOI: [10.1007/s11046-014-9775-z](https://doi.org/10.1007/s11046-014-9775-z)
94. Escribano P, Peláez T, Muñoz P, Bouza E, Guinea J. Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; 57(6): 2815–2820. DOI: [10.1128/AAC.02487-12](https://doi.org/10.1128/AAC.02487-12)
95. Rath PM, Steinmann J. Overview of commercially available PCR assays for the detection of *Aspergillus* spp. DNA in patient samples. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9(740). DOI: [10.3389/fmicb.2018.00740](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00740)
96. Chong GL, van de Sande WW, Dingemans GJ, Gaajetaan GR, Vonk AG, Hayette MP, van Tegelen DW, Simons GF, Rijnders BJ. Validation of a new *Aspergillus* real-time PCR assay for direct detection of *Aspergillus* and azole resistance of *Aspergillus fumigatus* on bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 2015; 53(3): 868-874. DOI: [10.1128/jcm.03216-14](https://doi.org/10.1128/jcm.03216-14)
97. Martínez-Herrera EO, Frías-De-León MG, Duarte-Escalante E, Calderón-Ezquerro MC, Jiménez-Martínez MC, Acosta-Altamirano G, Rivera-Becerril F, Toriello C, Reyes-Montes MR. Fungal diversity and *Aspergillus* species in hospital environments. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2016; 23(2): 264–269. DOI: [10.5604/12321966.1203888](https://doi.org/10.5604/12321966.1203888)
98. Varga J, Due M, Frisvad JC, Samson RA. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology* 2007; 59: 89–106. DOI: [10.3114/sim.2007.59.11](https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.11)
99. Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology* 2007; 59: 129–145. DOI: [10.3114/sim.2007.59.13](https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.13)

100. de Moraes Borba C, Correia J, Vinhas E, Martins A, Costa Aguiar Alves B, Unkles S, Robertson Kinghorn J, Lucena-Silva N. Genetic characterization of morphologically variant strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Mayo 2008; 103(3): 306-309. DOI: [S0074-02762008005000013](https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000013)
101. Diba K, Makhdoomi K, Mirhendi H. Molecular characterization of *Aspergillus* infections in an Iranian educational hospital using RAPD-PCR method. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2014; 17(9): 646-650.
102. Bakri Y, Arabi MI, Jawhar M. RAPD technique is a useful tool to distinguish *Penicillium* species. Polish Journal of Microbiology 2007; 56(4): 273-276. PMID: [18254498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18254498/)
103. Baysal O, Siragusa M, Gumrukcu E, Zengin S, Carimi F, Sajeve M, Teixeira da Silva JA. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* by ISSR and RAPD markers on eggplant. Biochemical Genetics 2010; 48: 524-537. DOI: [10.1007/s10528-010-9336-1](https://doi.org/10.1007/s10528-010-9336-1)
104. Pérez G, Verdejo V, Gondim-Porto C, Orlando J, Carú M. Designing a SCAR molecular marker for monitoring *Trichoderma* cf. *harzianum* in experimental communities. Journal of Zhejiang University Science B 2014; 15(11): 966-978. DOI: [10.1631/jzus.B1400063](https://doi.org/10.1631/jzus.B1400063)
105. Trtkova J, Pavlicek P, Ruskova L, Hamal P, Koukalova D, Raclavsky V. Performance of optimized McRAPD in identification of 9 yeast species frequently isolated from patient samples: potential for automation. BMC Microbiology 2009; 9: 234. DOI: [10.1186/1471-2180-9-234](https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-234)
106. Mesini A, Mikulska M, Giacobbe DR, Del Puente F, Gandolfo N, Codda G, Orsi A, Tassinari F, Beltramini S, Marchese A, Icardi G, Del Bono V, Viscoli C. Changing epidemiology of candidaemia: Increase in fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*. Mycoses 2020; 63(4): 361-368. DOI: [10.1111/myc.13050](https://doi.org/10.1111/myc.13050)

8. Anexos

Anexo 1

RAPD-PCR de los 34 oligonucleótidos utilizados.

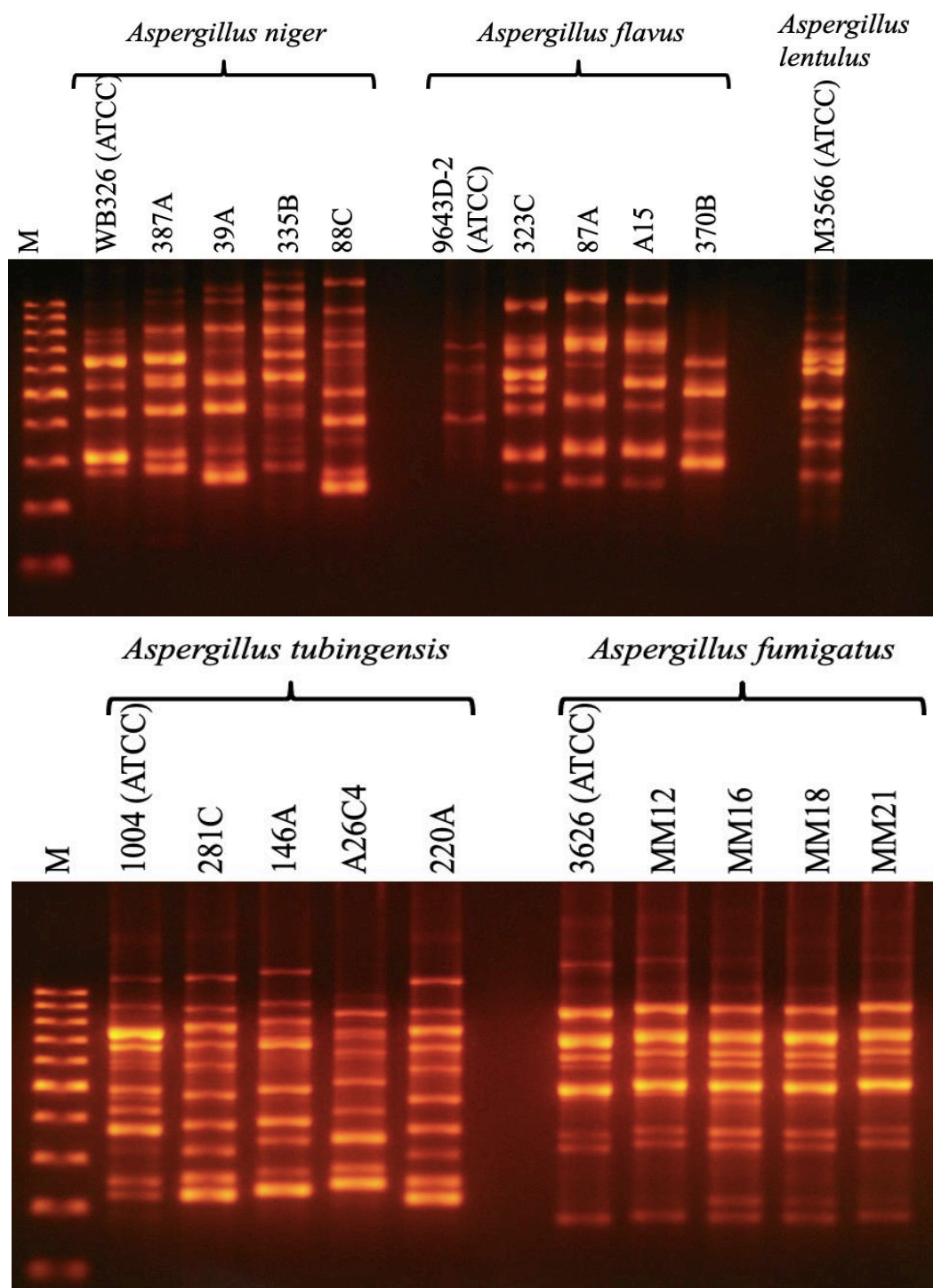


Figura 16. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido 1281.

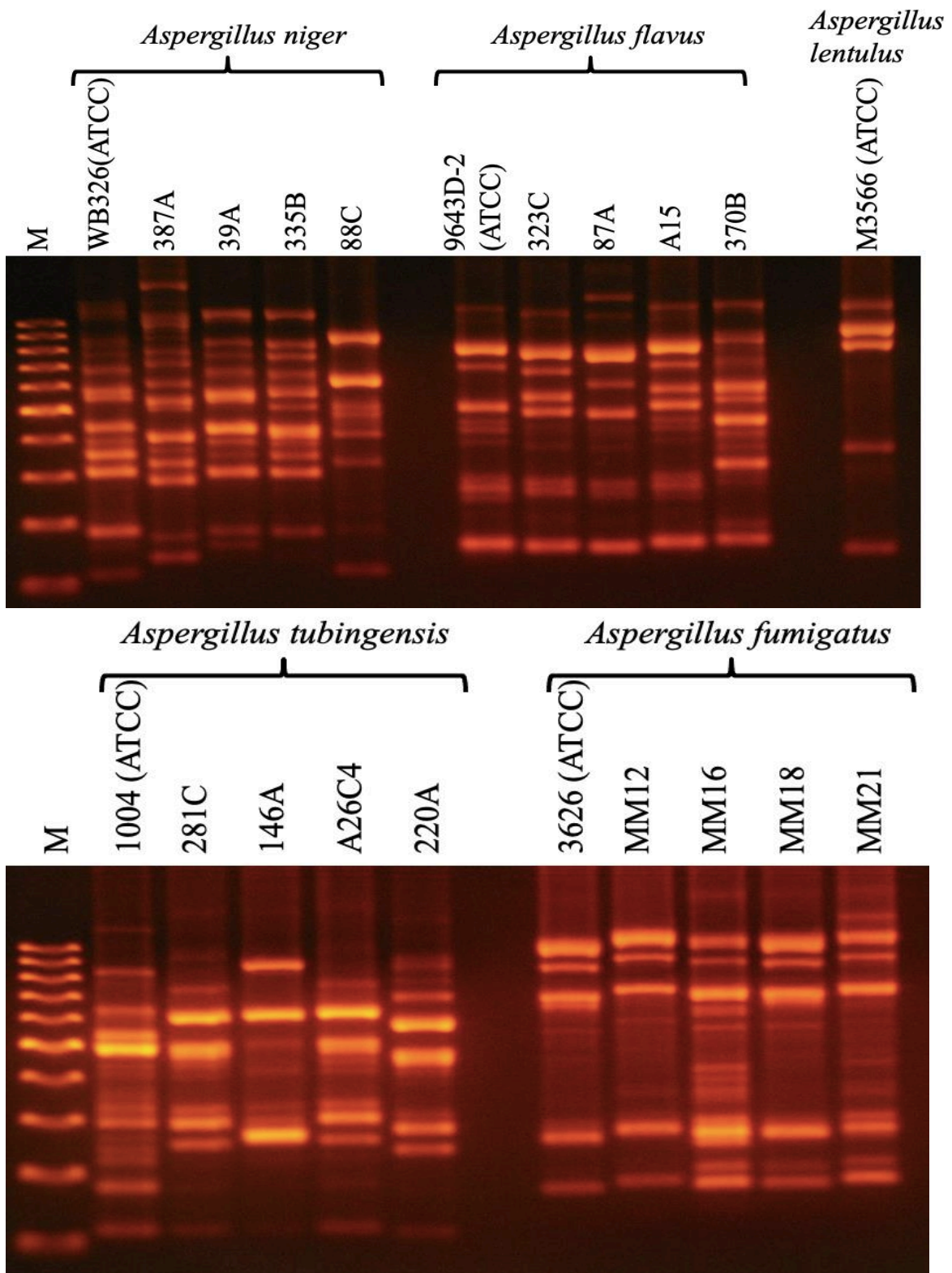


Figura 17. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido 1283.

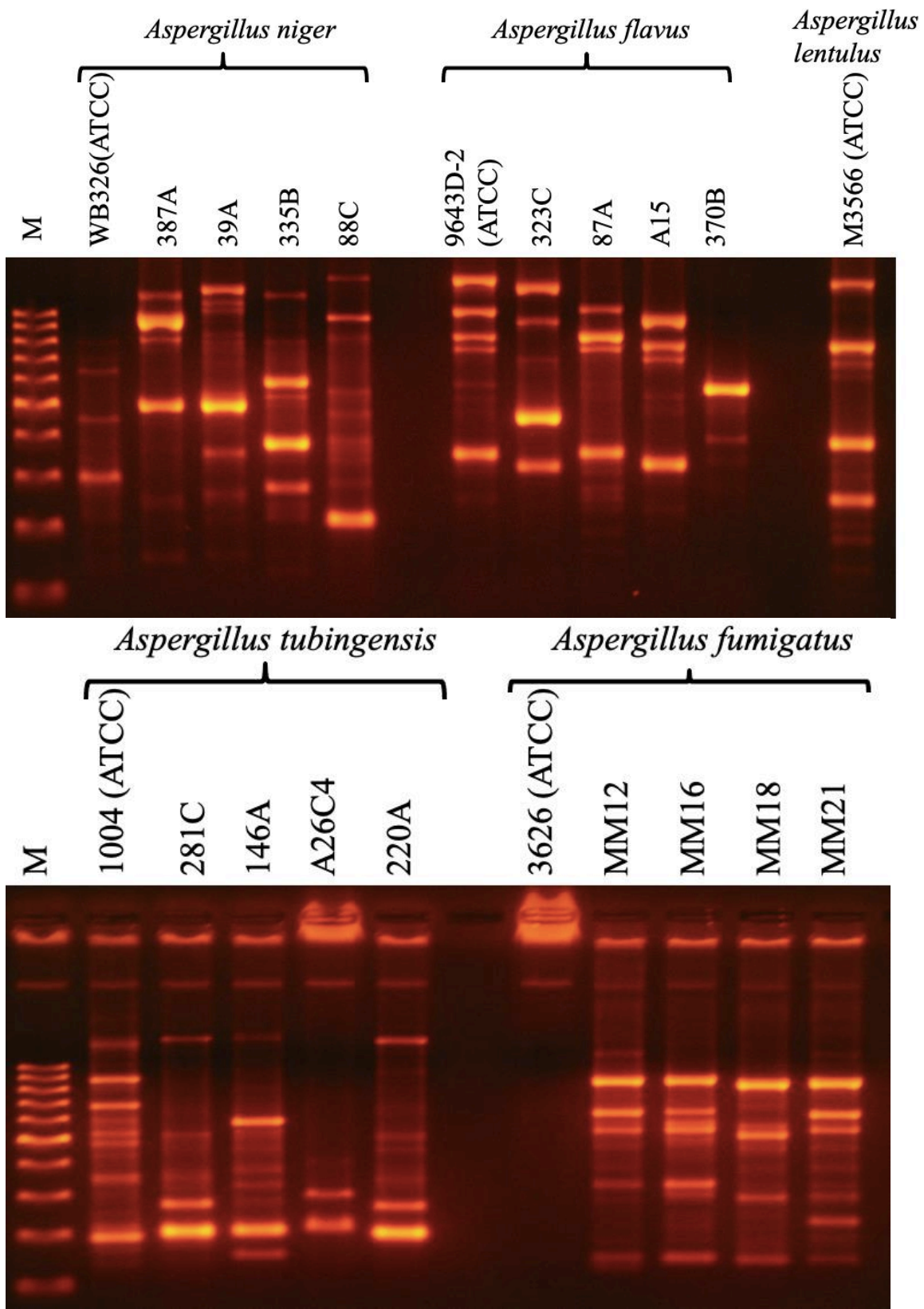


Figura 18. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido R108.

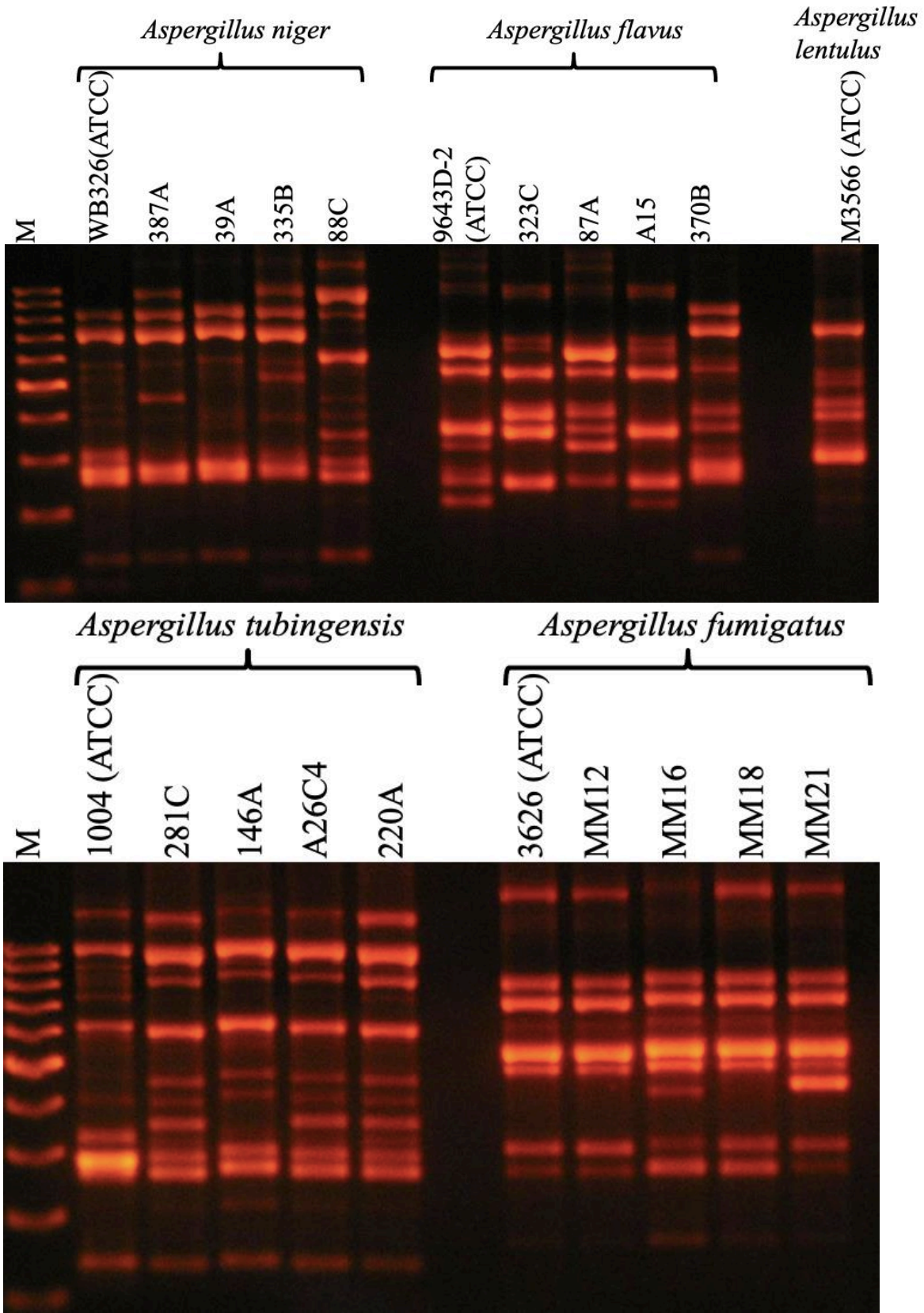


Figura 19. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido 1253.

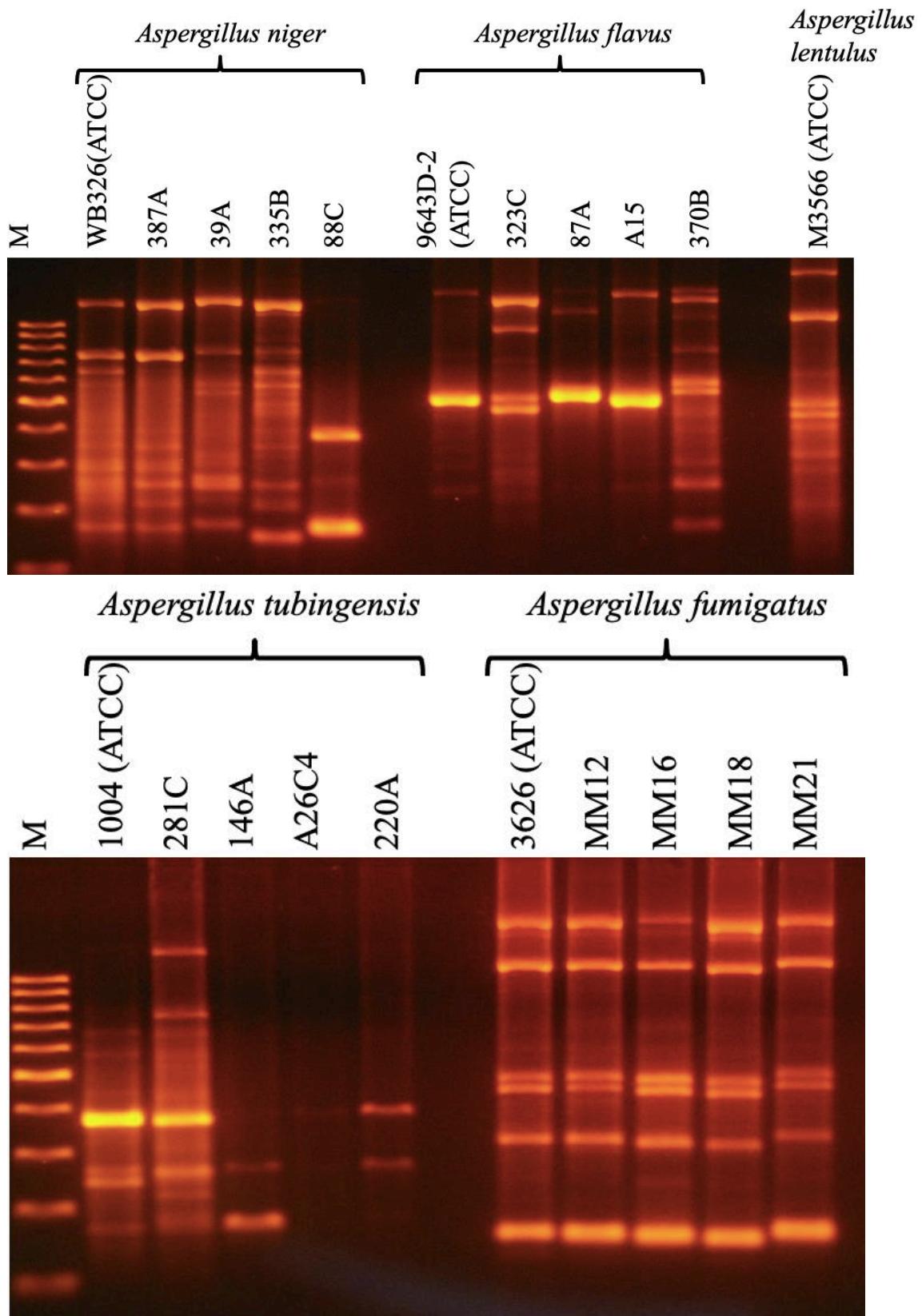


Figura 20. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPA-19.

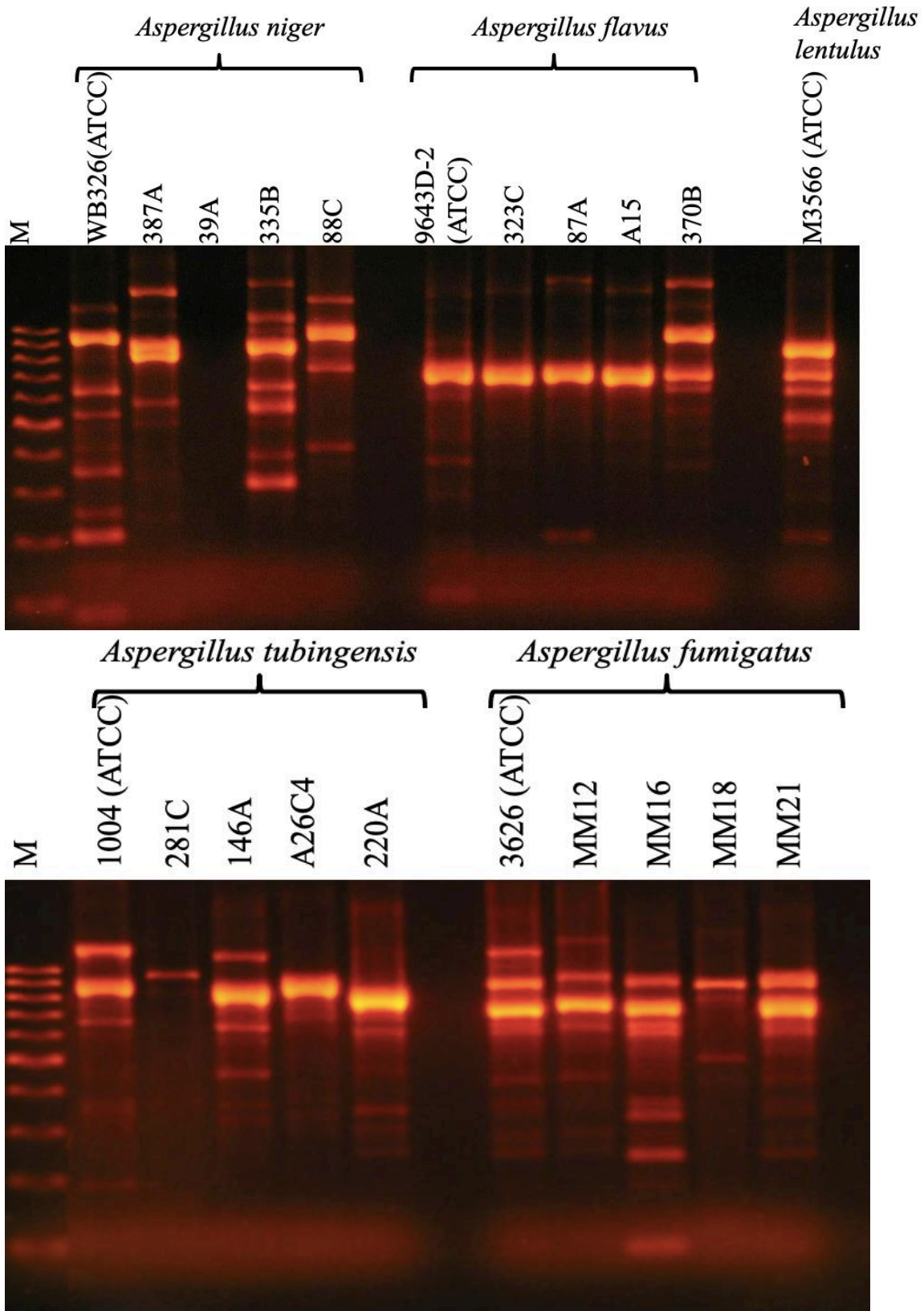


Figura 21. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPA-16.

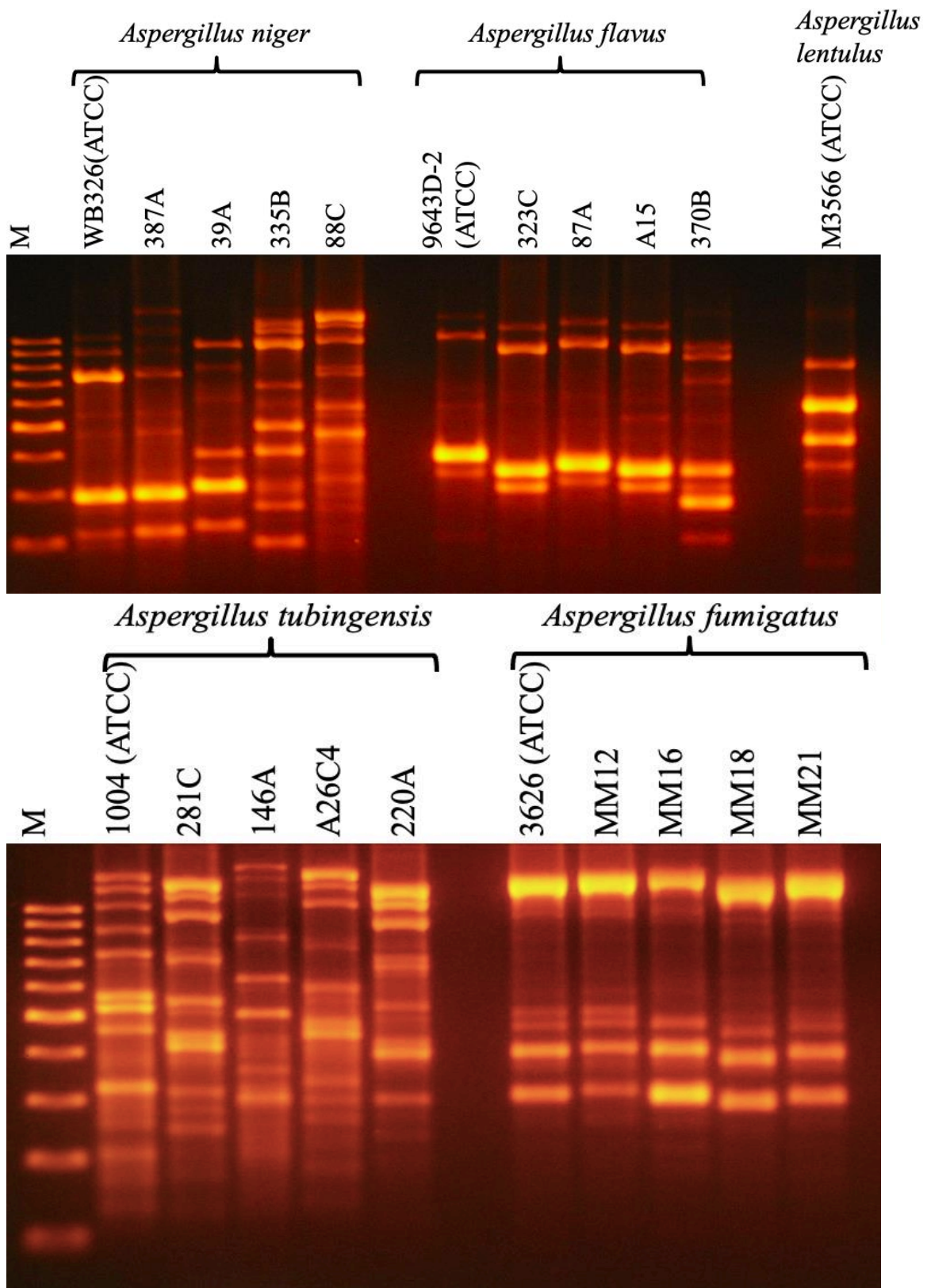


Figura 22. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPB-12.

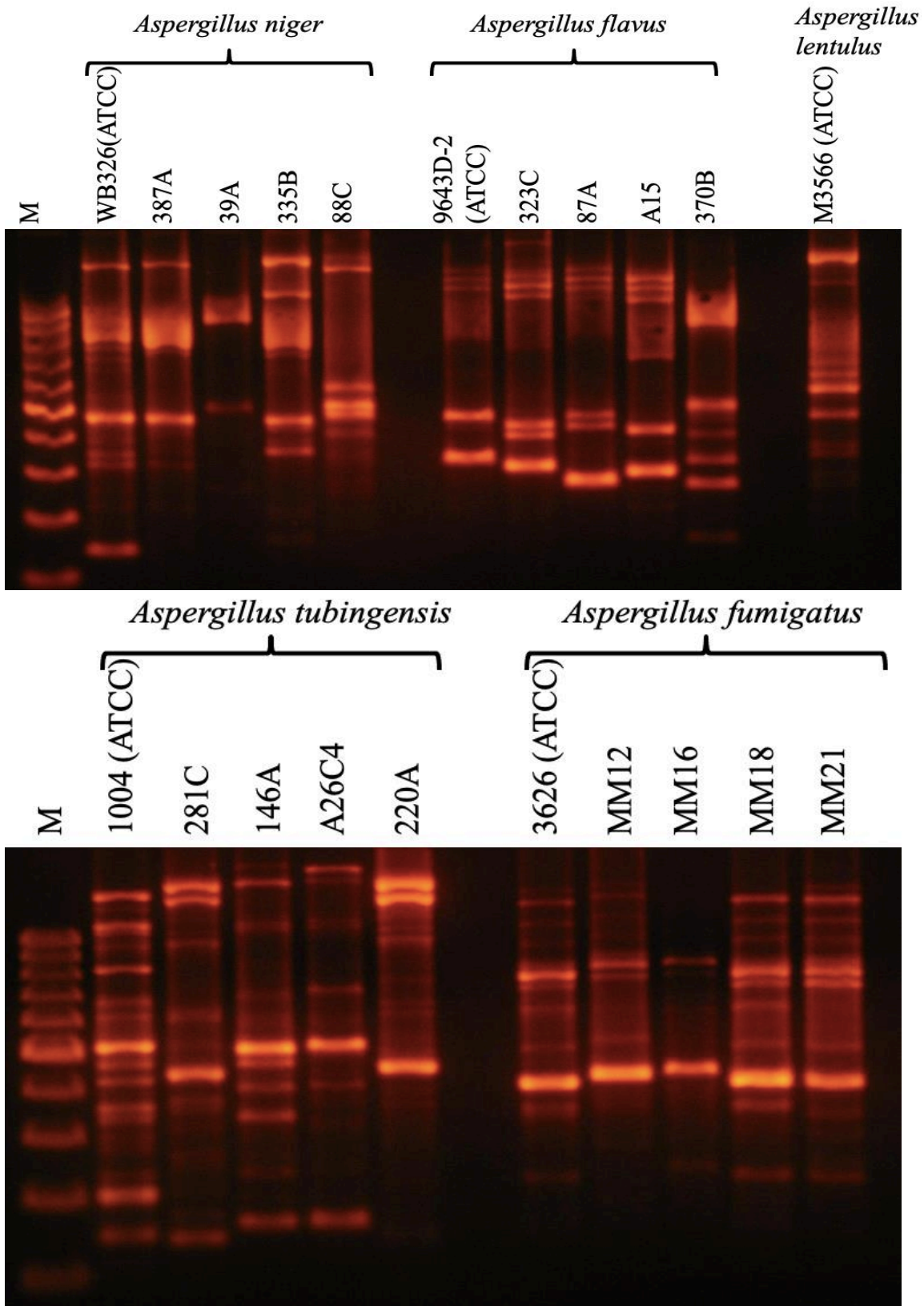


Figura 23. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPA-17.

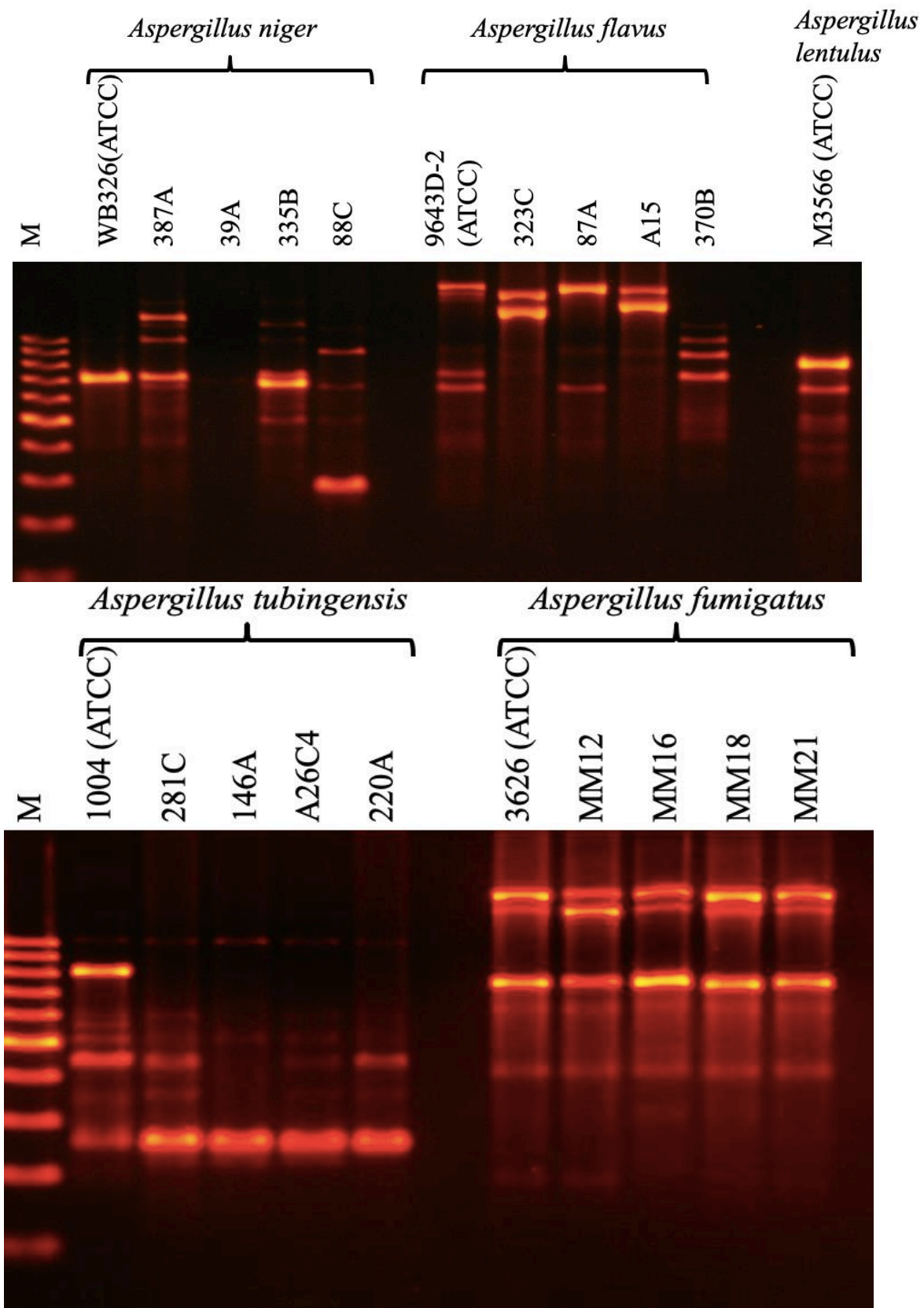


Figura 24. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPA-15.

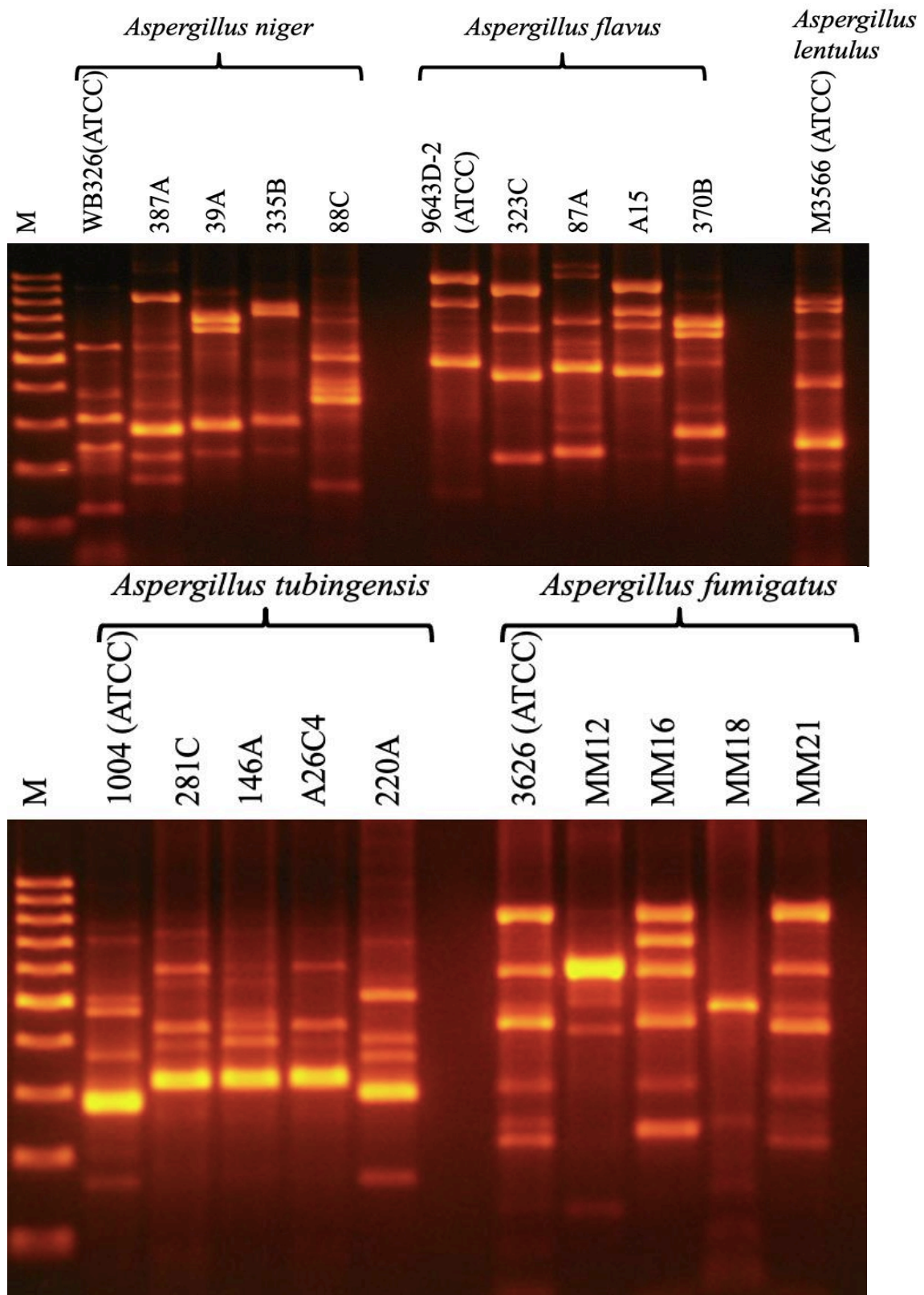


Figura 25. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPF-05.

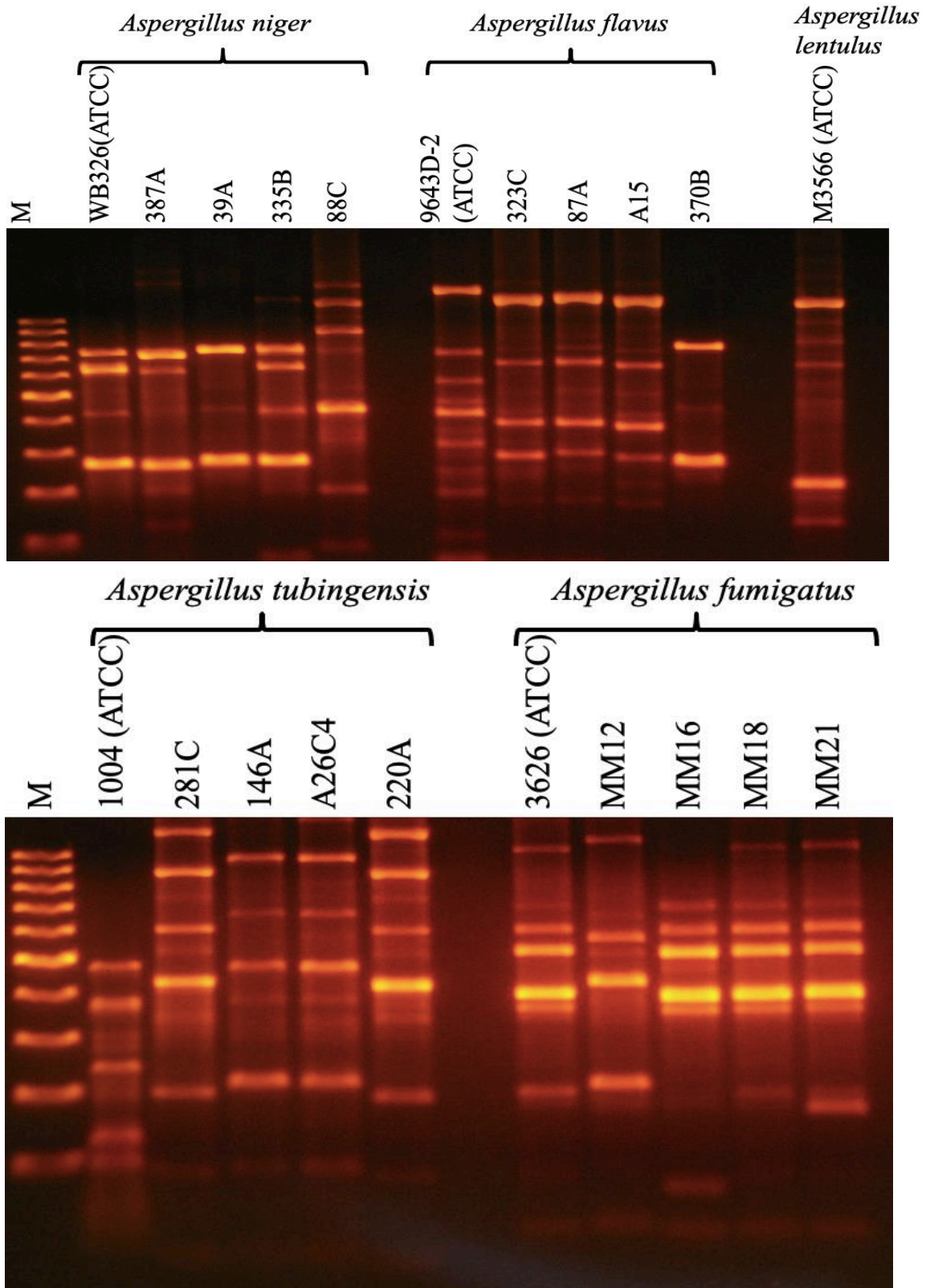


Figura 26. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPA-08.

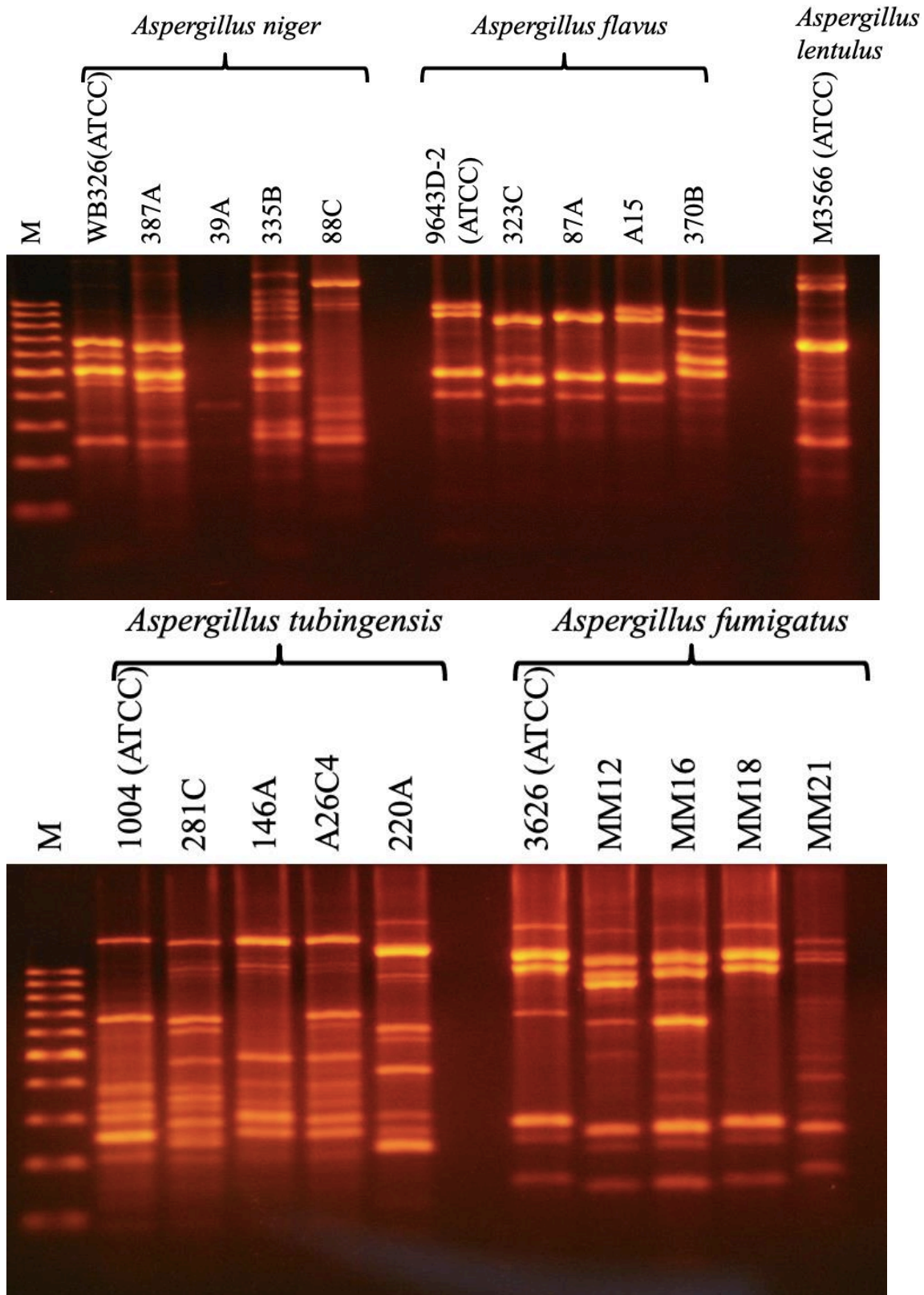


Figura 27. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPC-07.

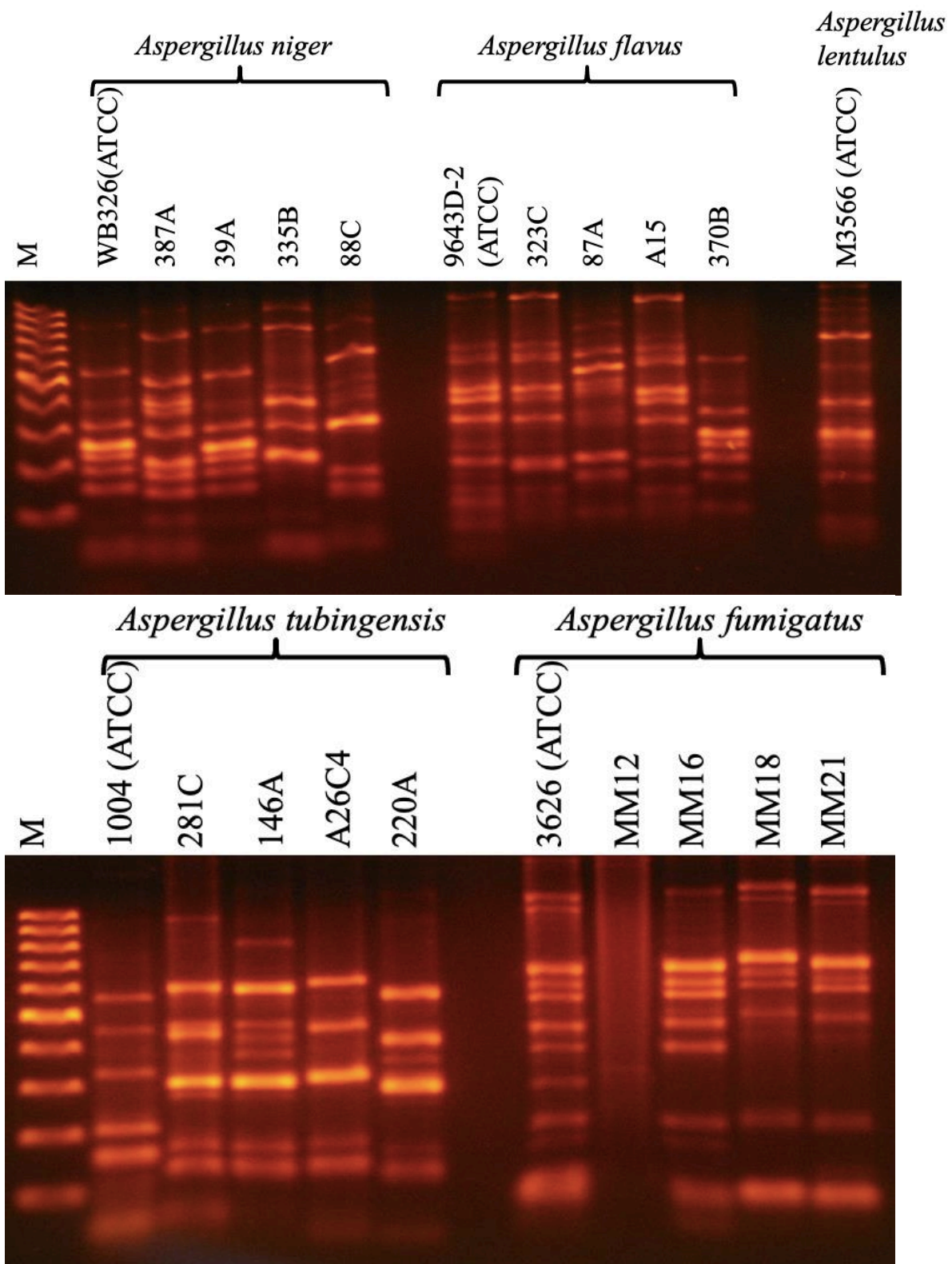


Figura 28. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPG-01.

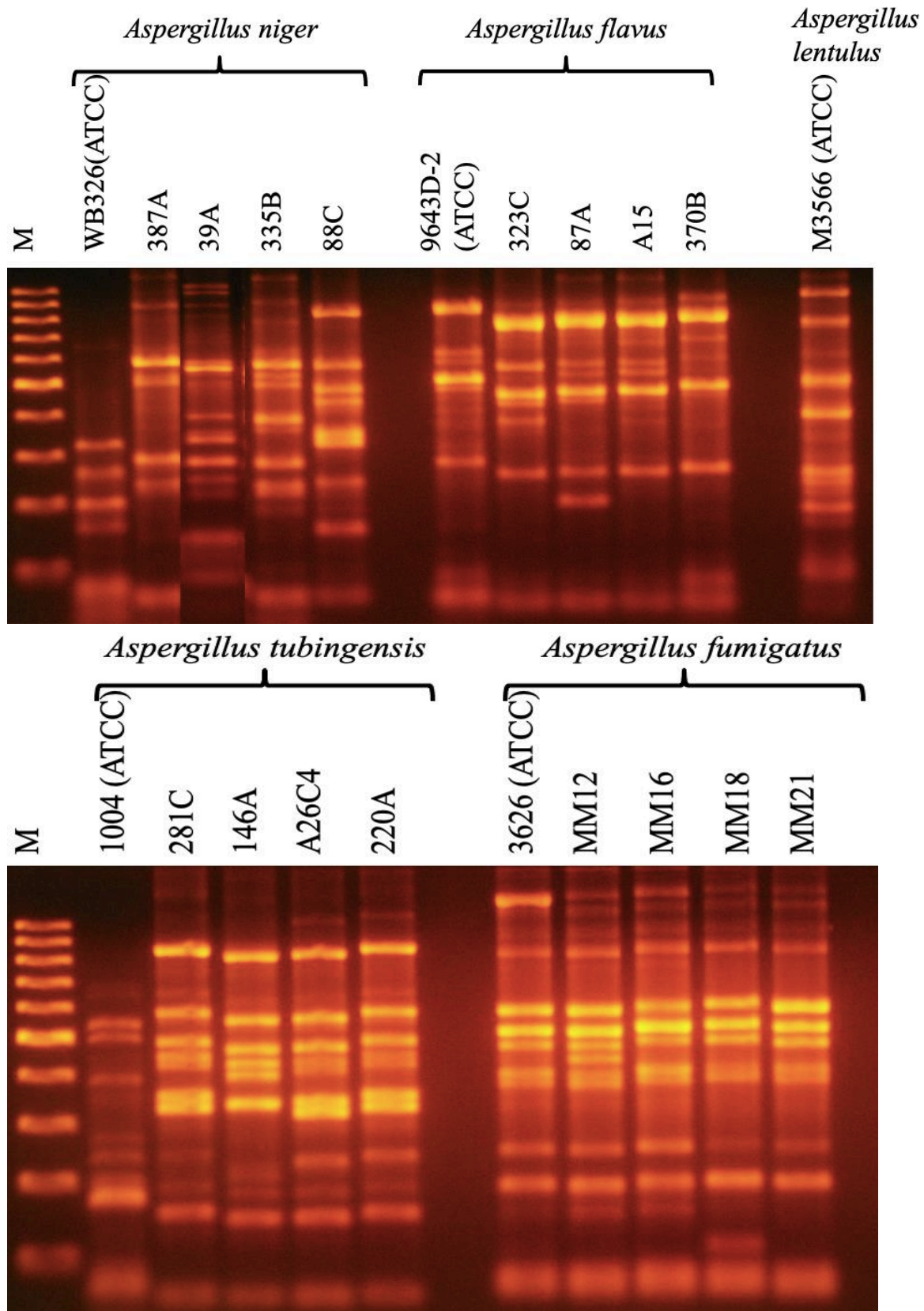


Figura 29. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPG-03.

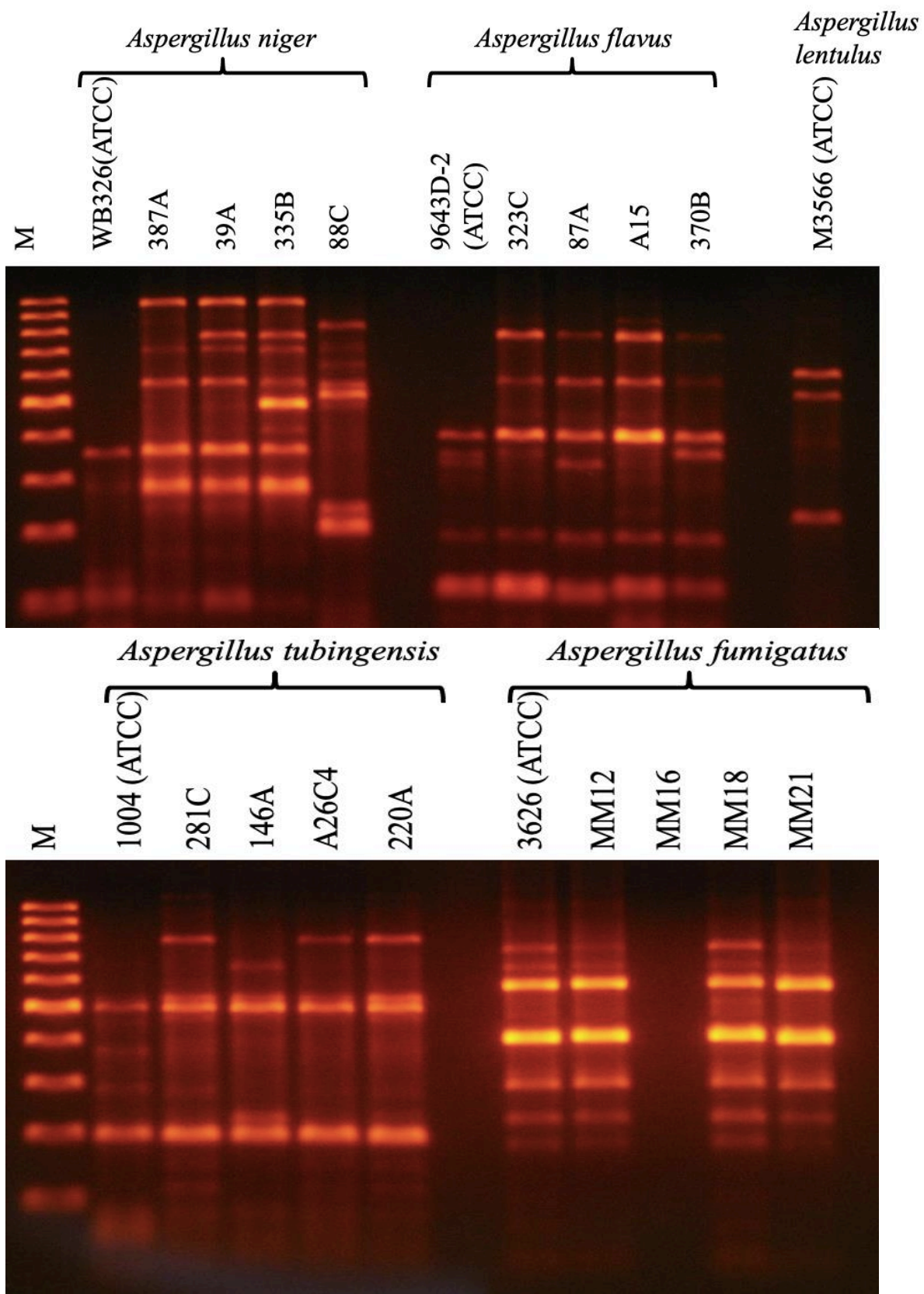


Figura 30. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPG-13.

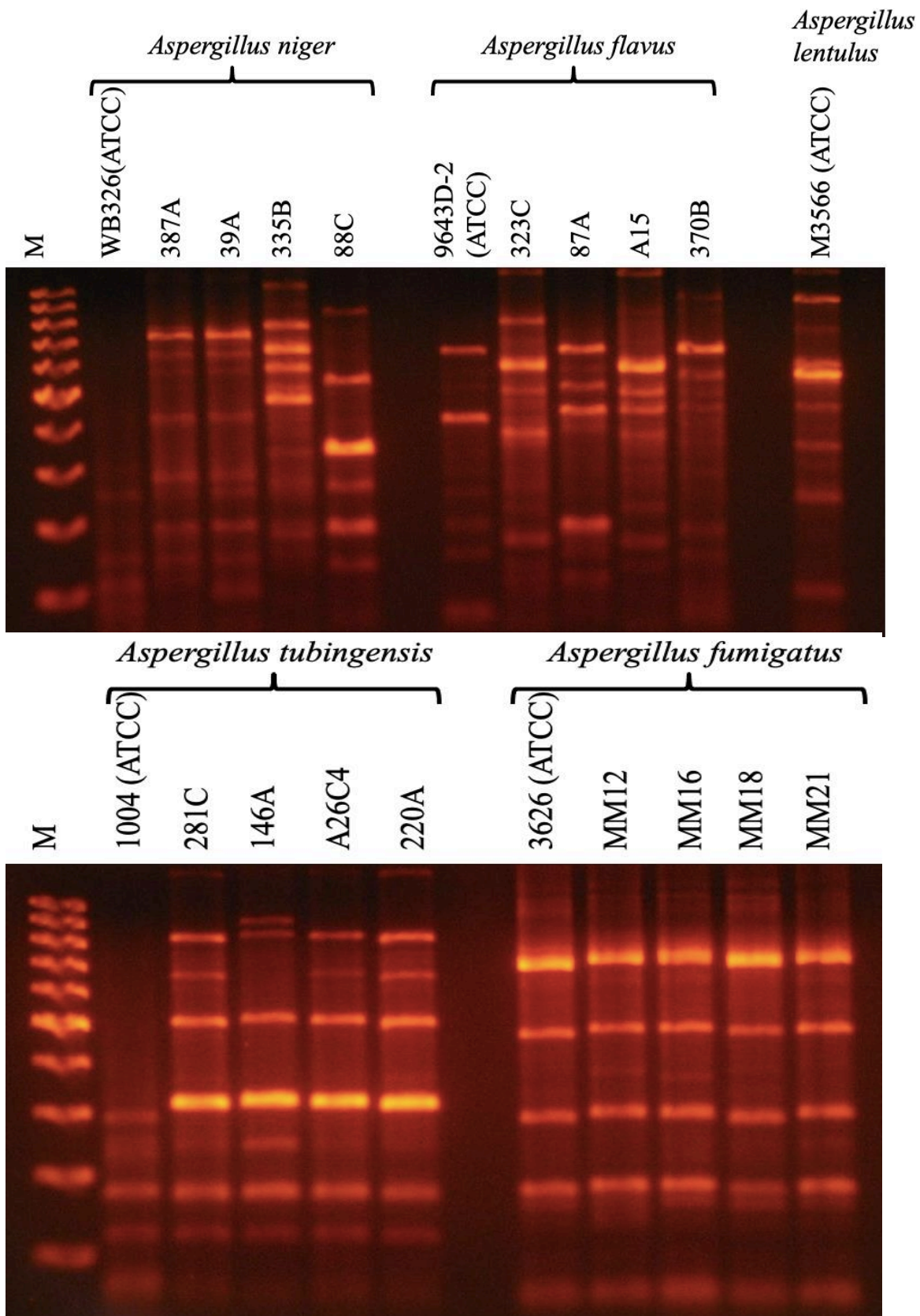


Figura 31. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPG-15.

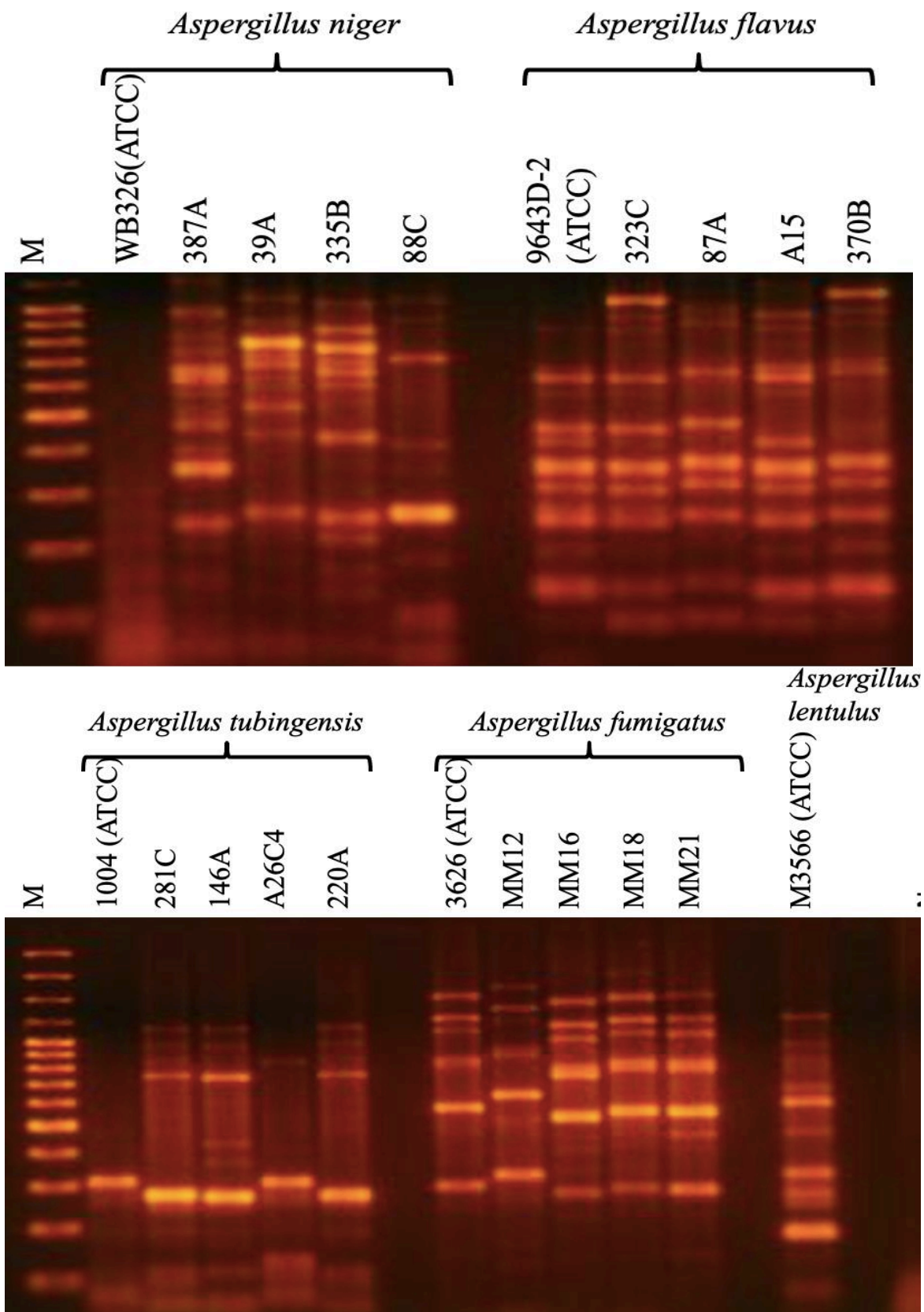


Figura 32. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPC-06.

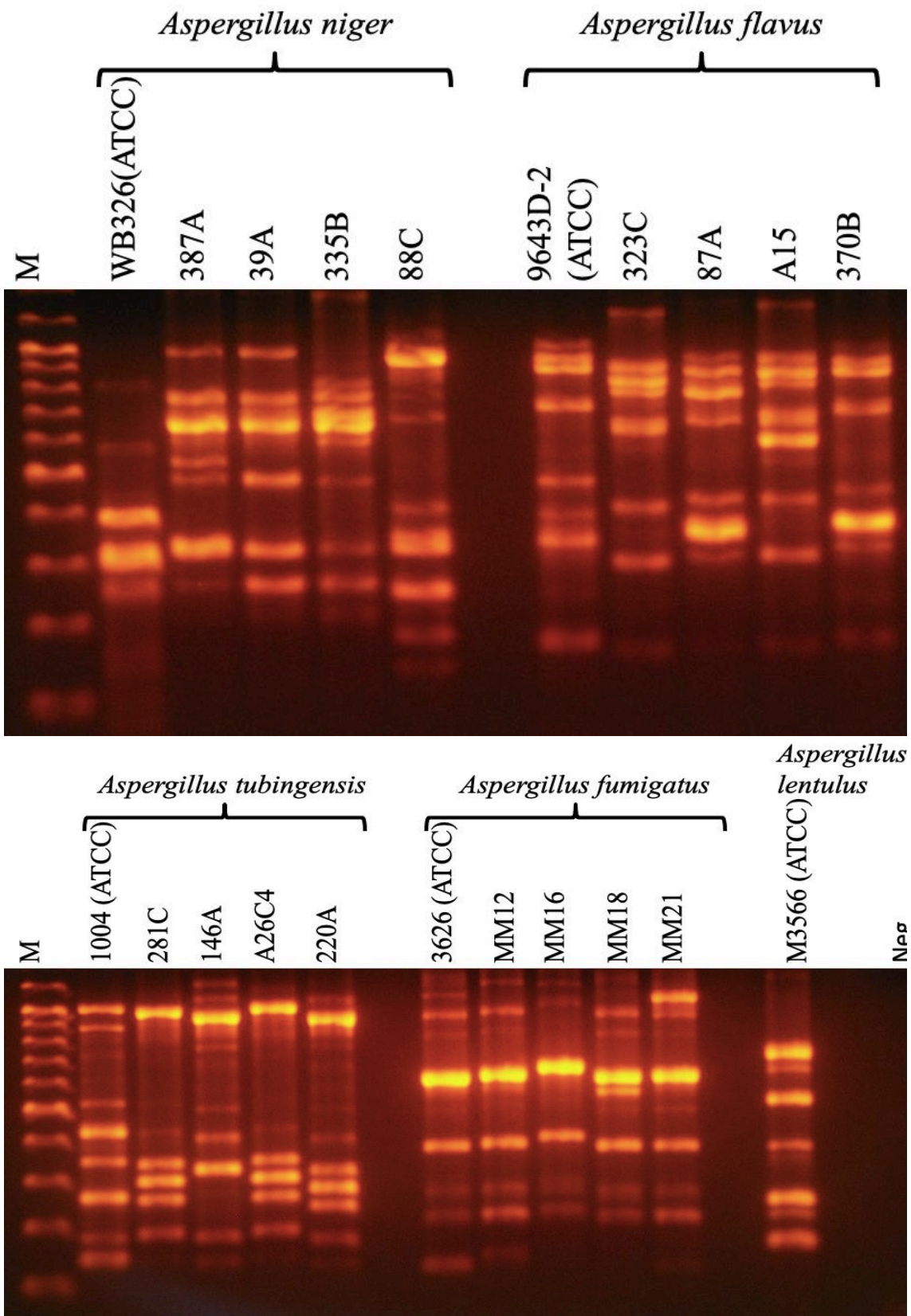


Figura 33. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPG-05.

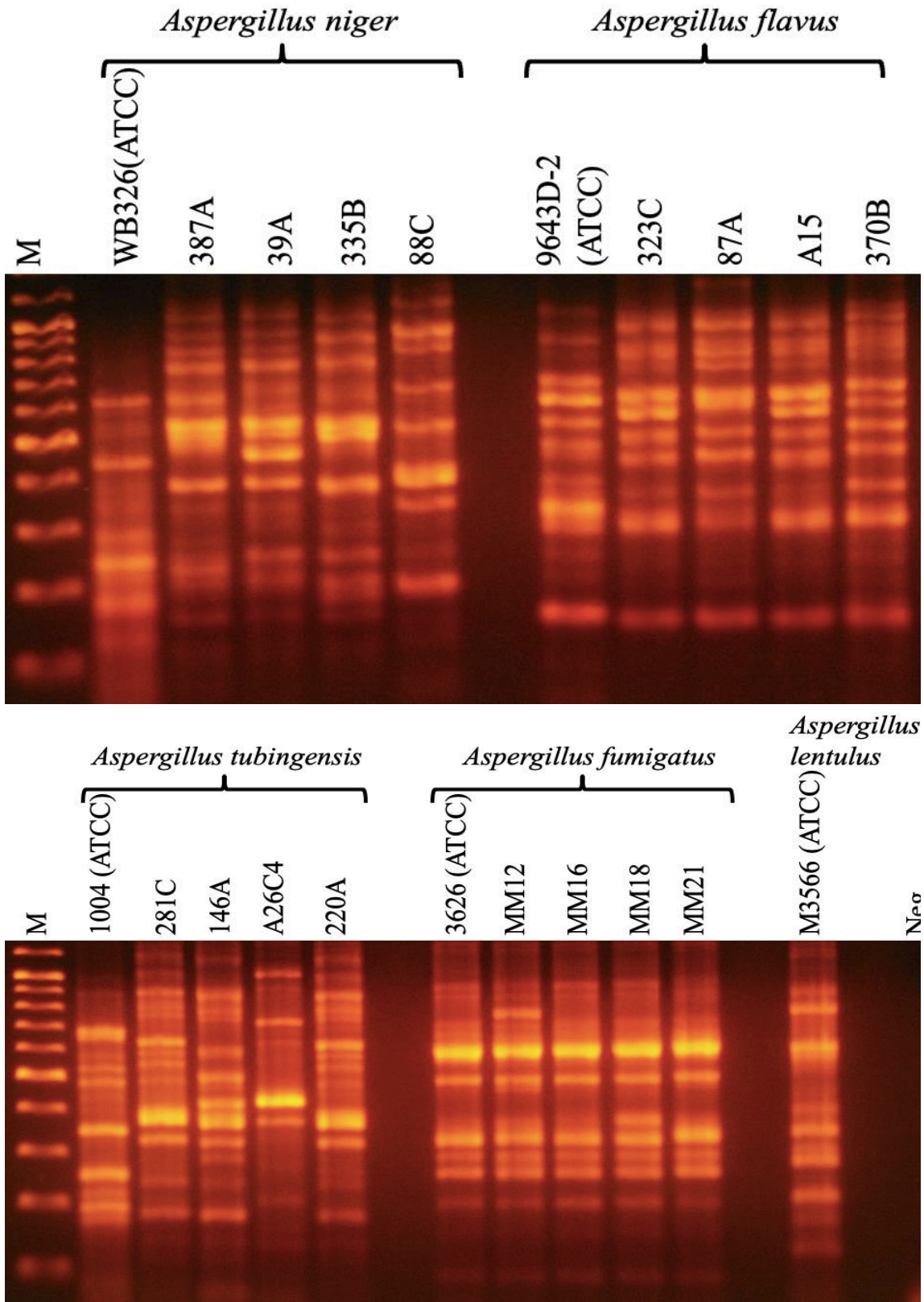


Figura 34. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPM-12.

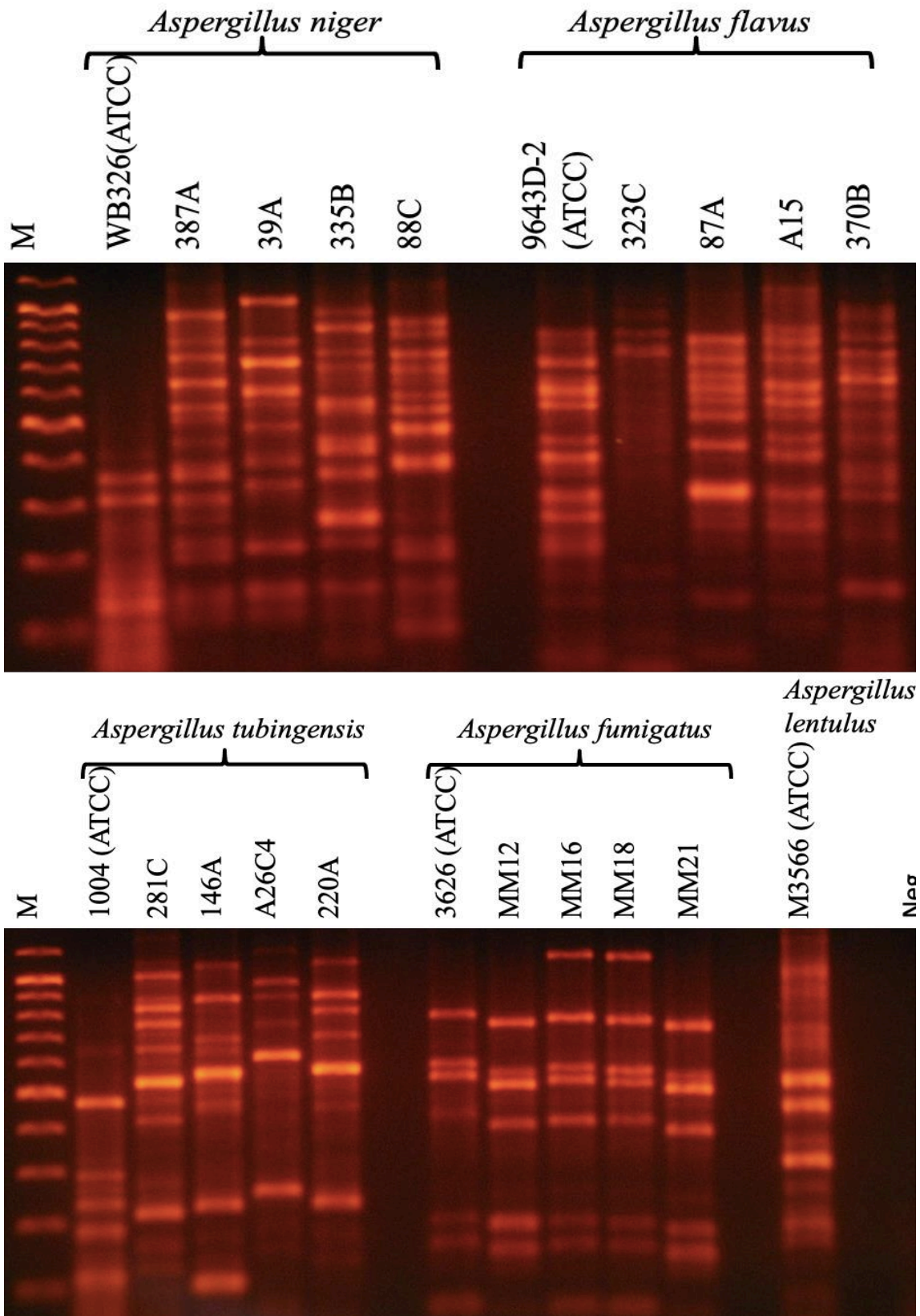


Figura 35. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPH-03.

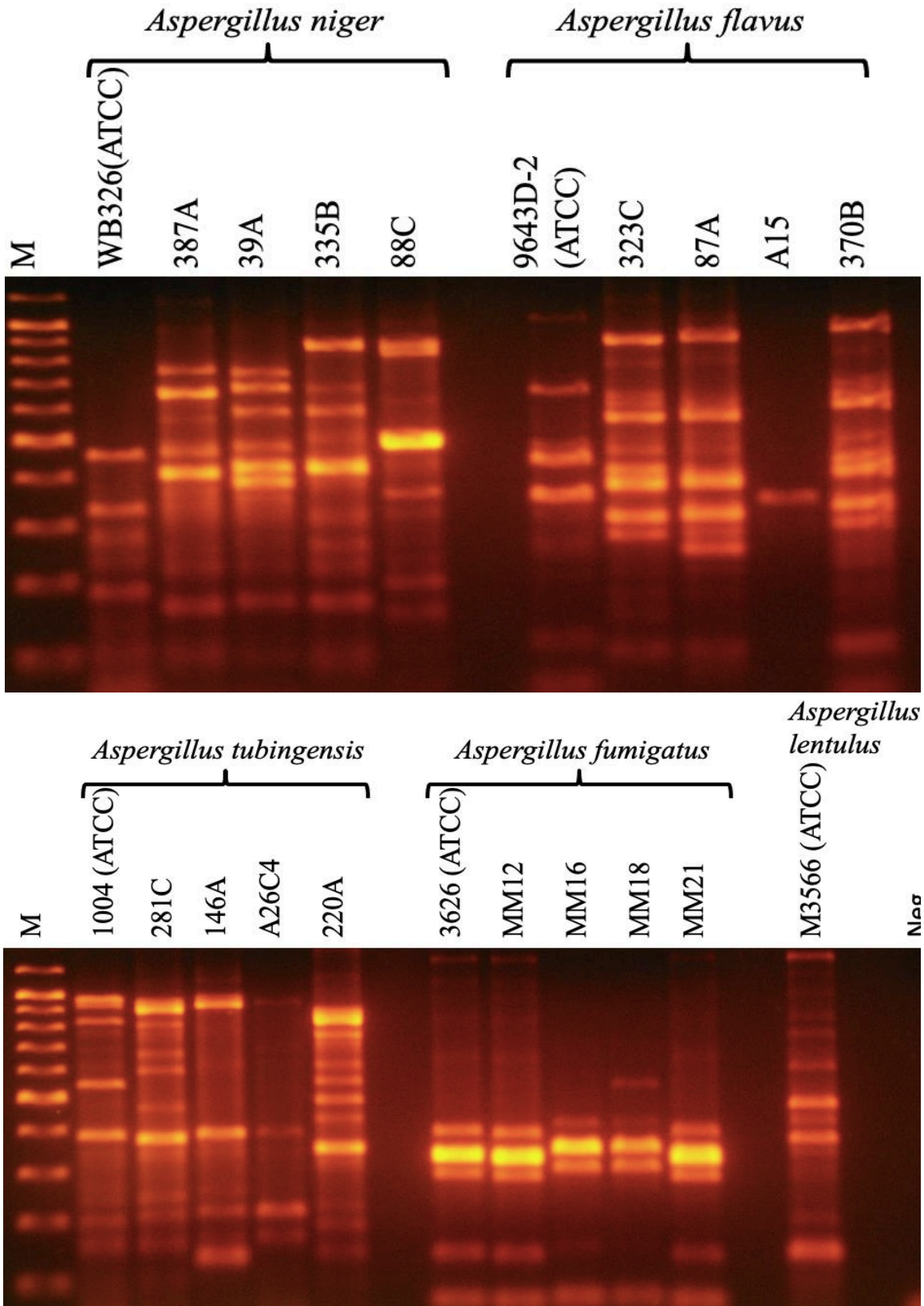


Figura 36. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPG-07.

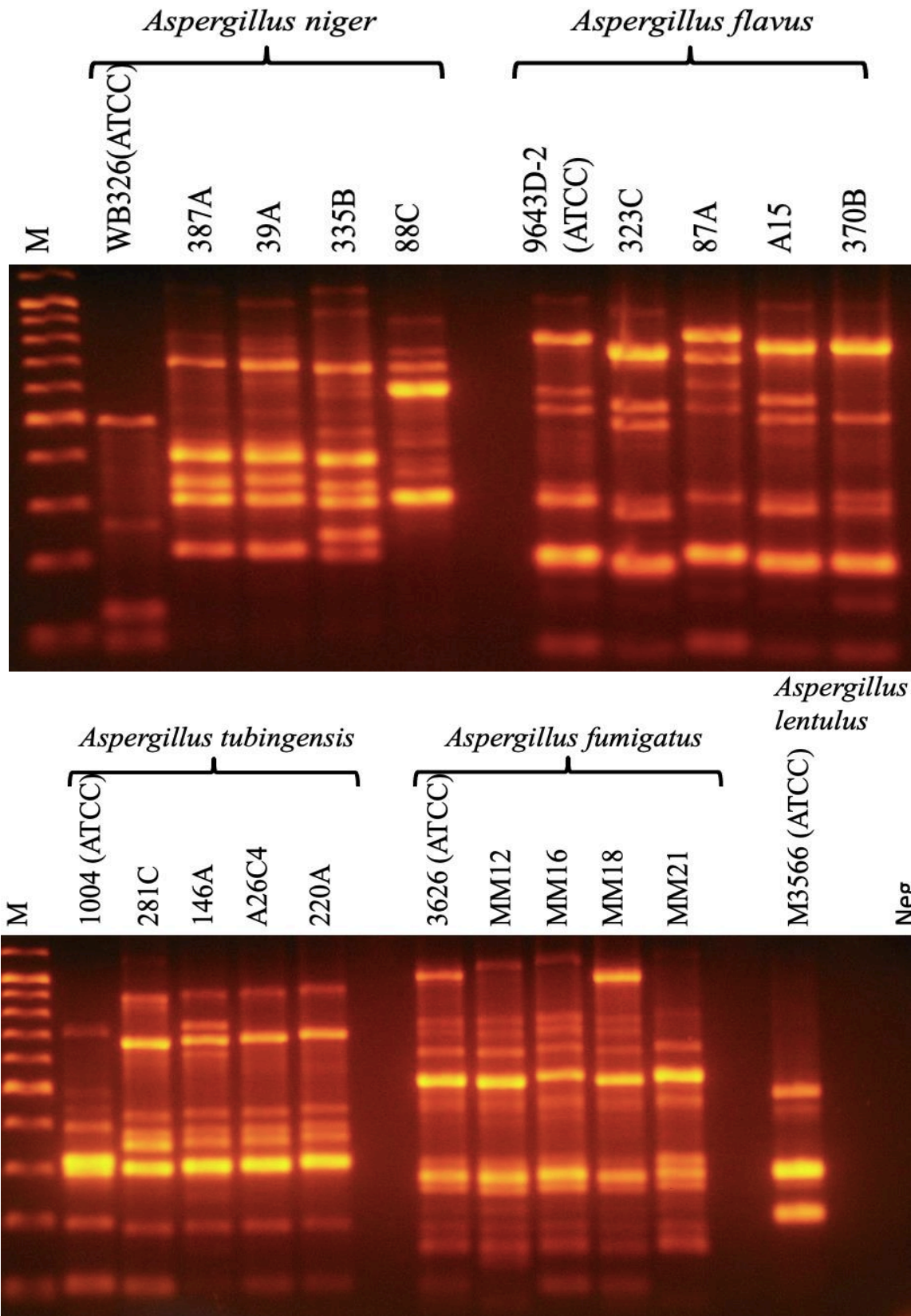


Figura 37. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPH-18.

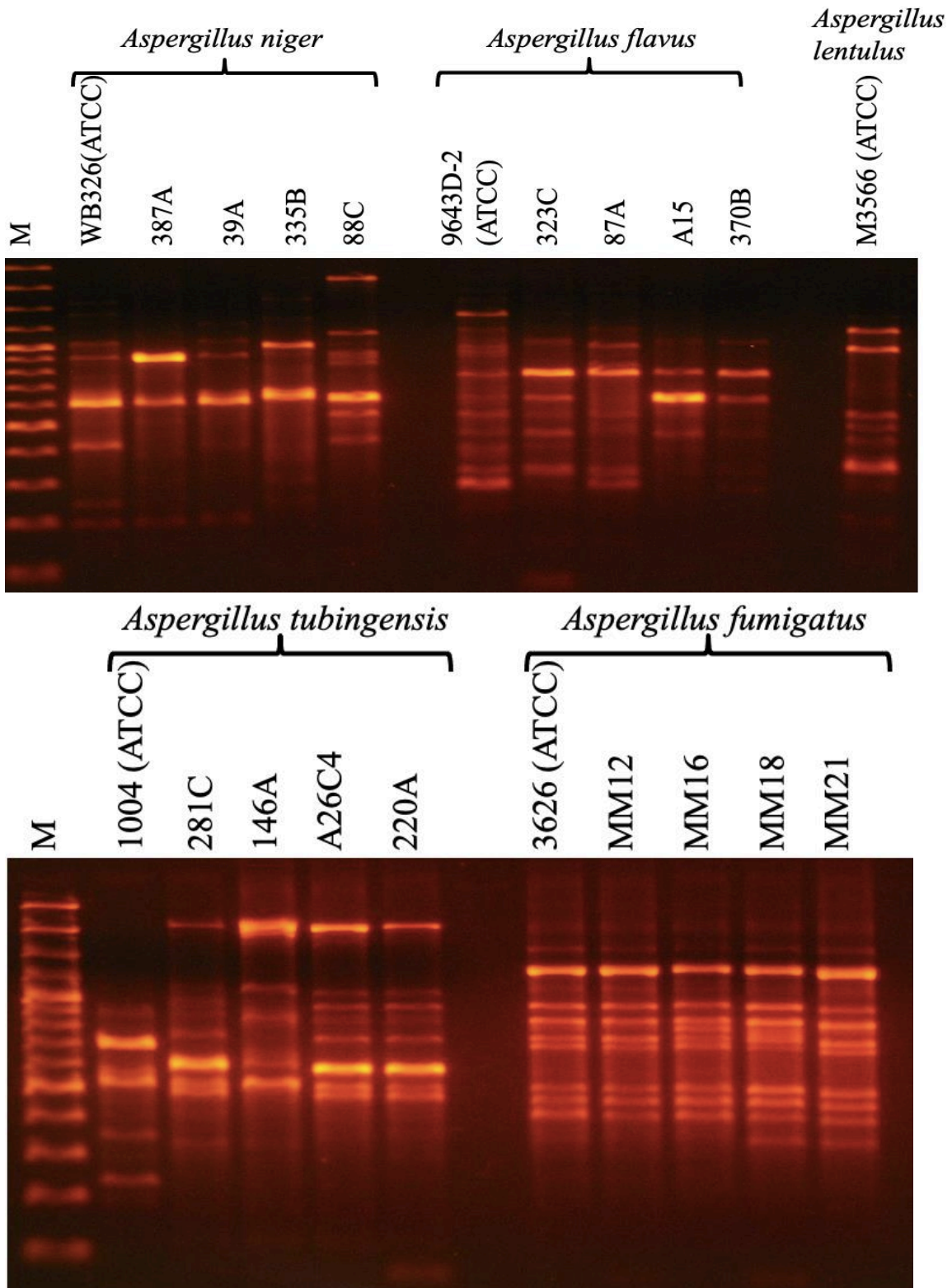


Figura 38. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPF-01.

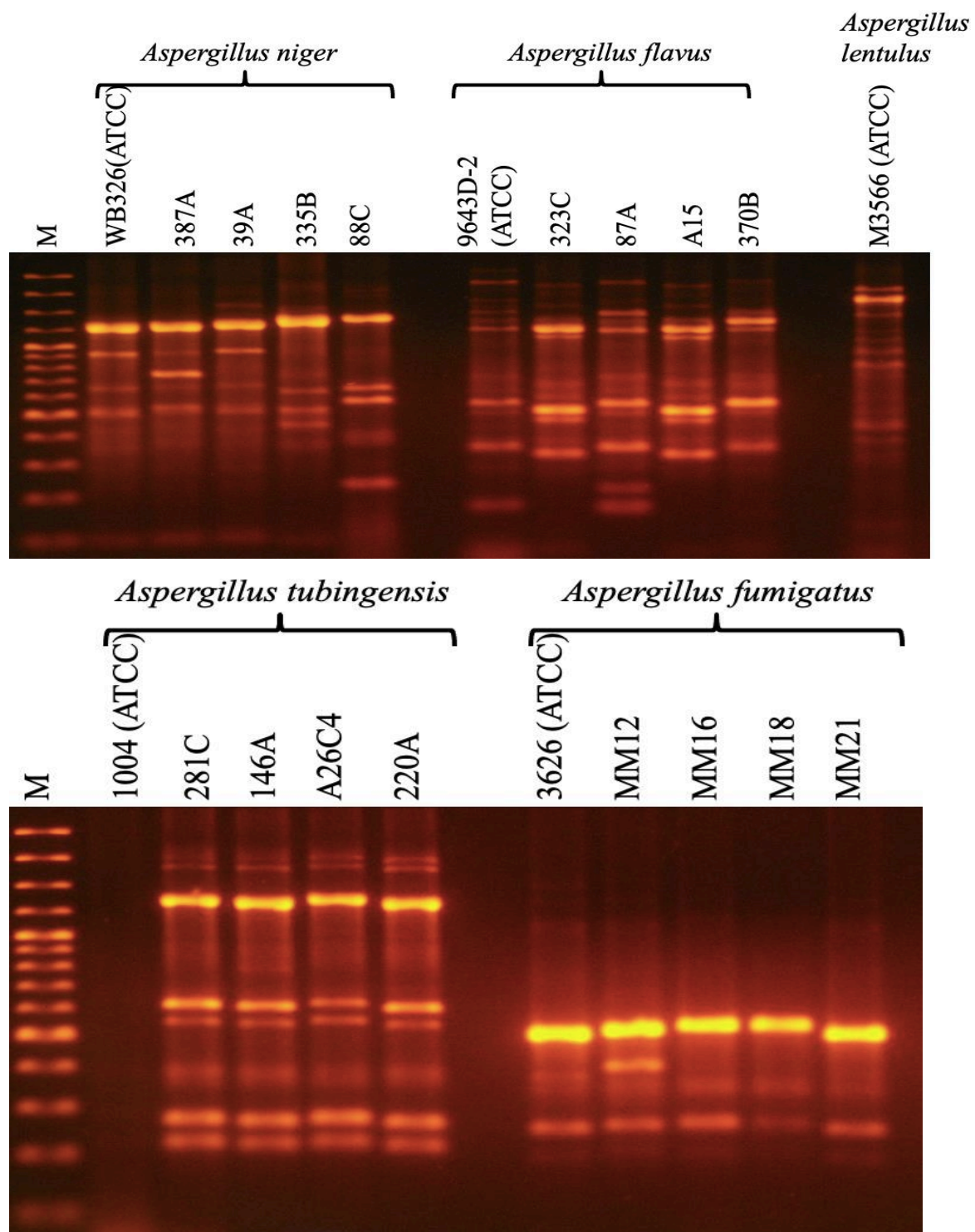


Figura 39. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPF-07.

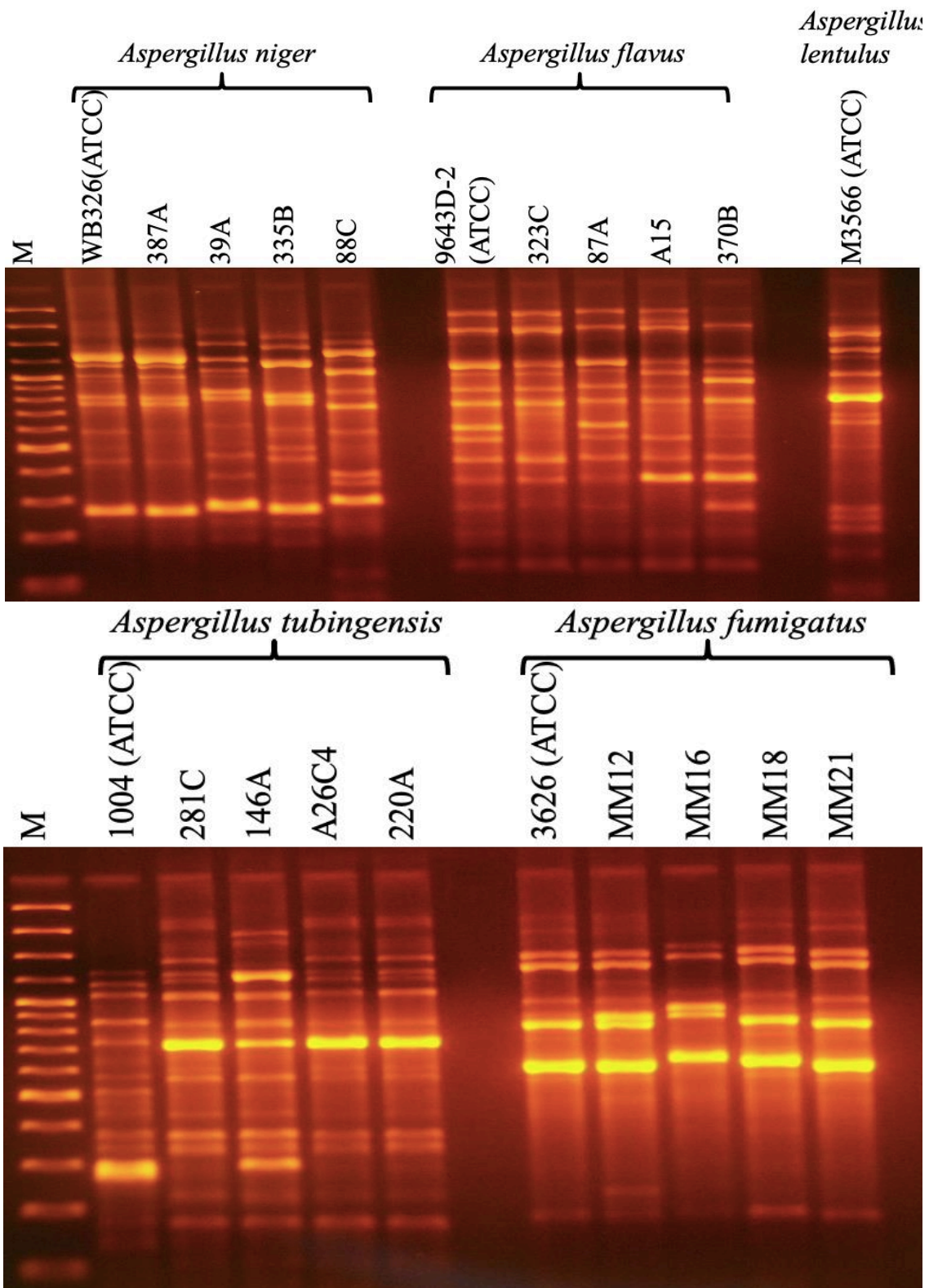


Figura 40. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPF-09.

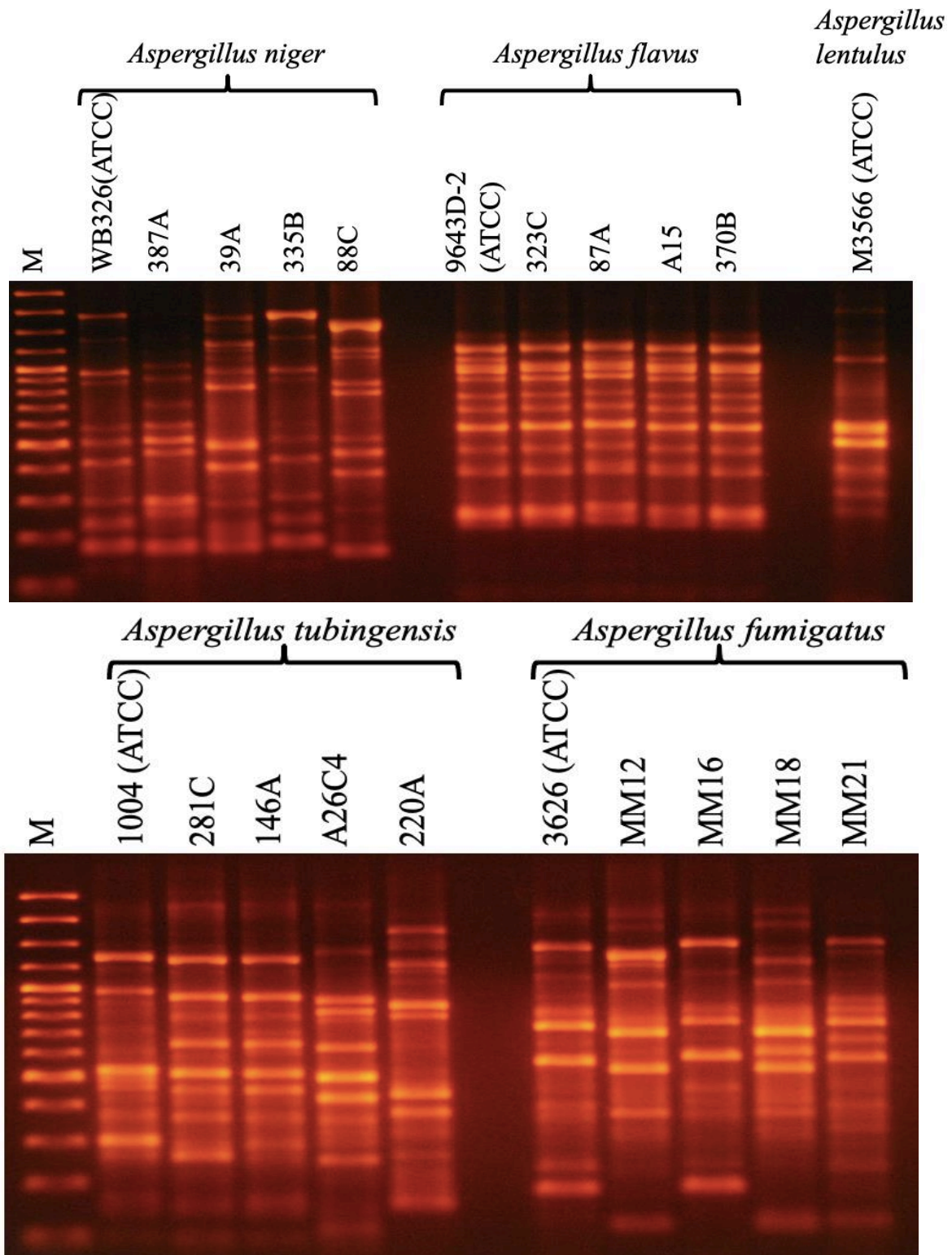


Figura 41. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPE-02.

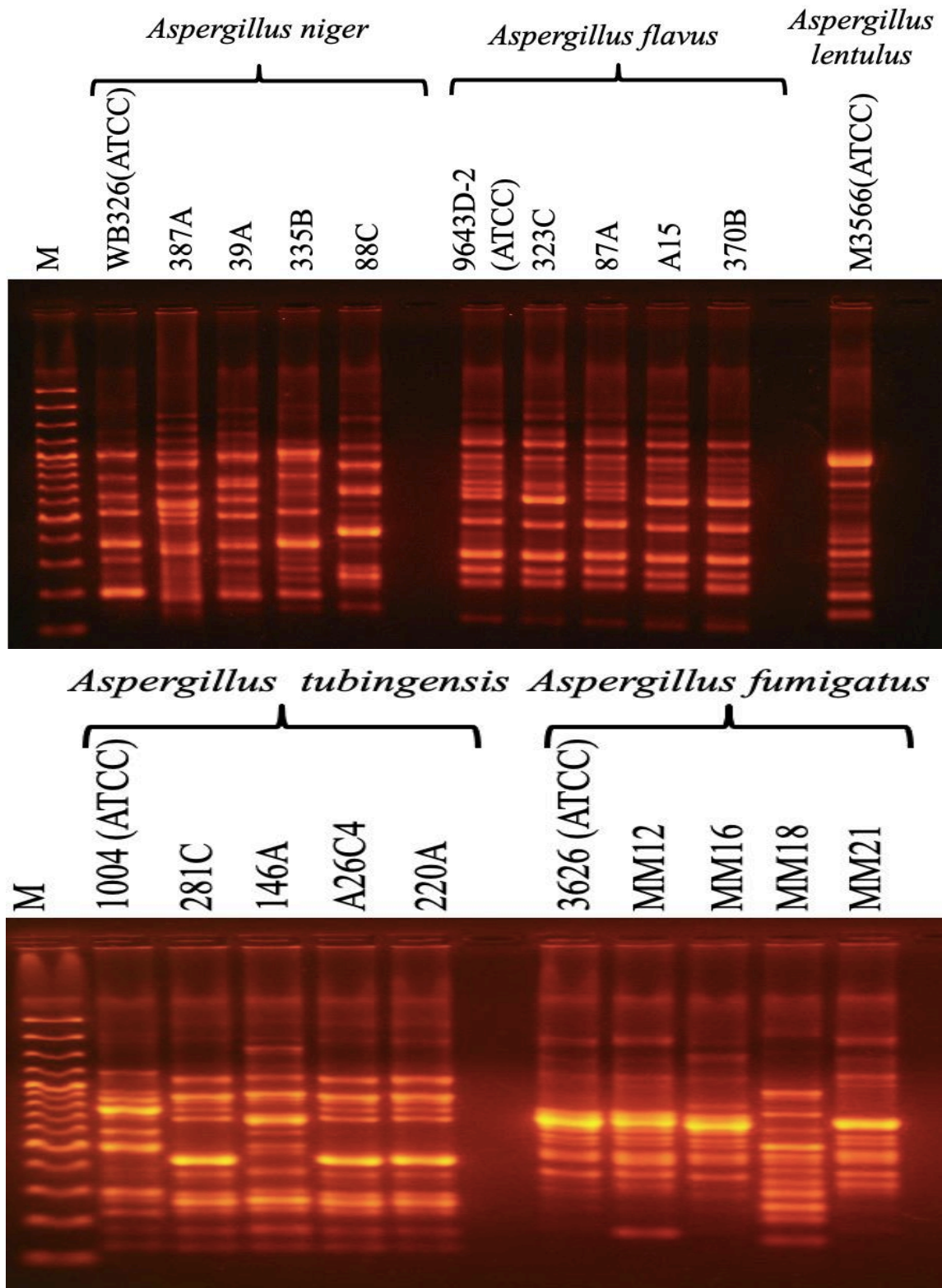


Figura 42. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido P54.

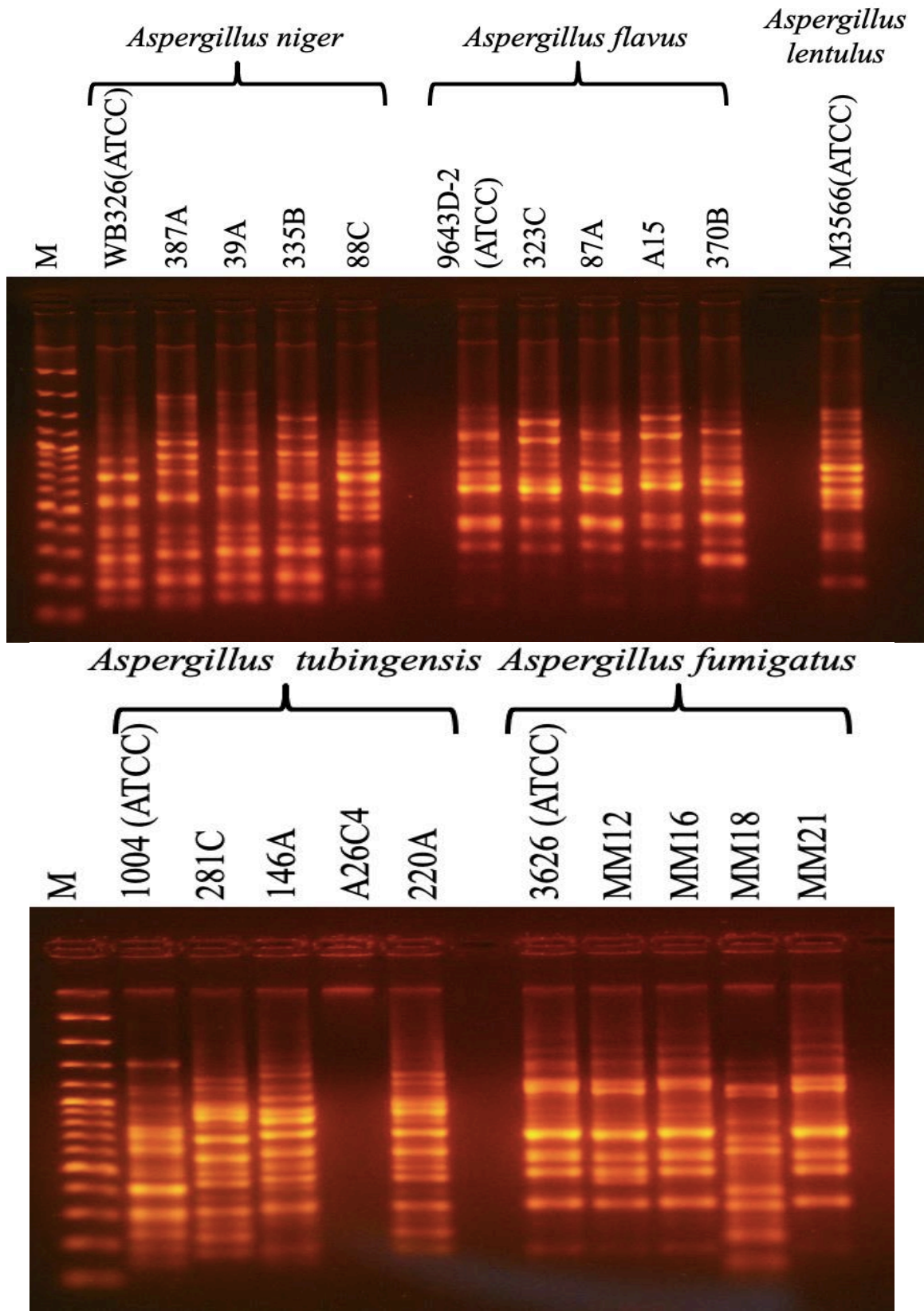


Figura 43. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido P160.

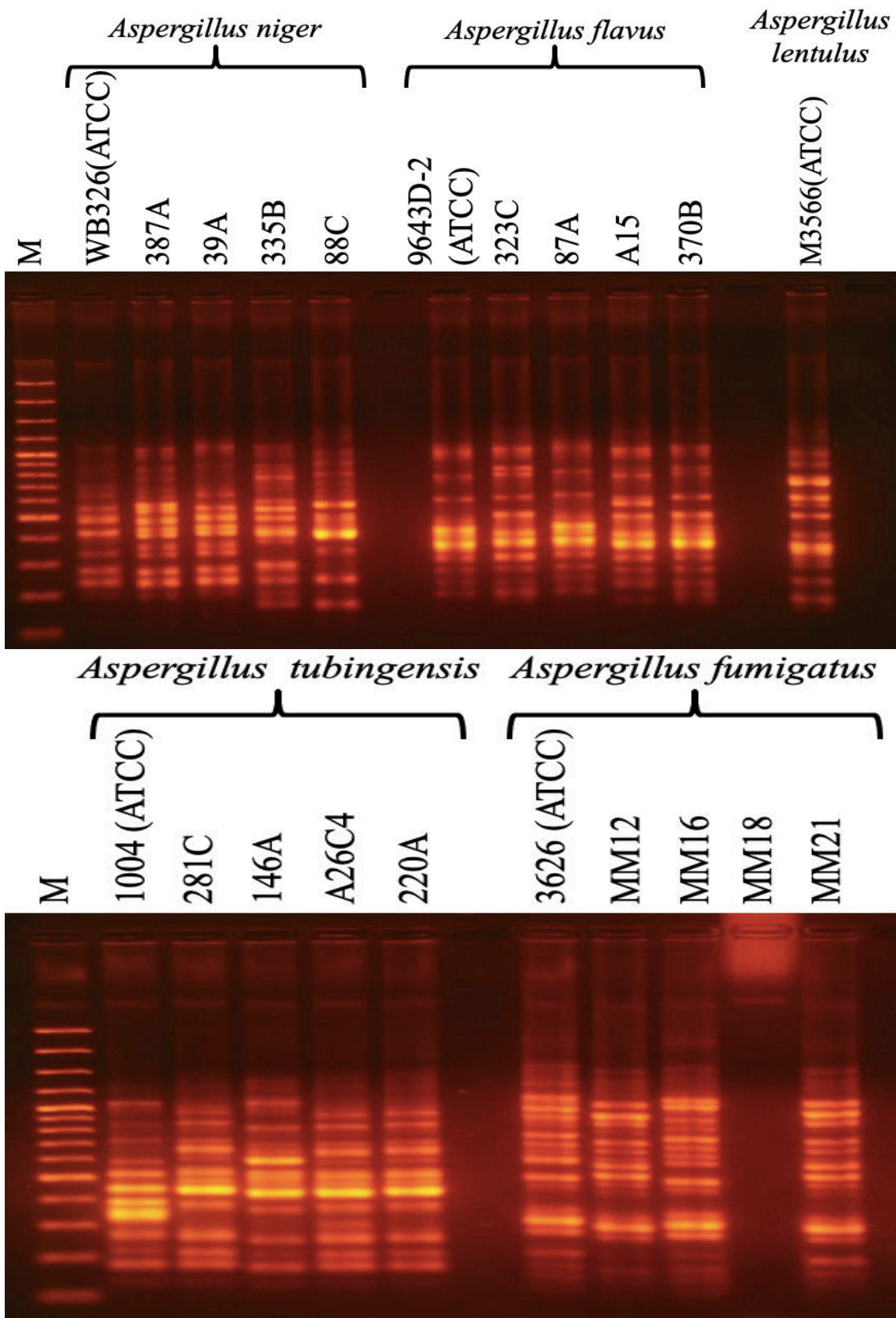


Figura 44. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido PELF.

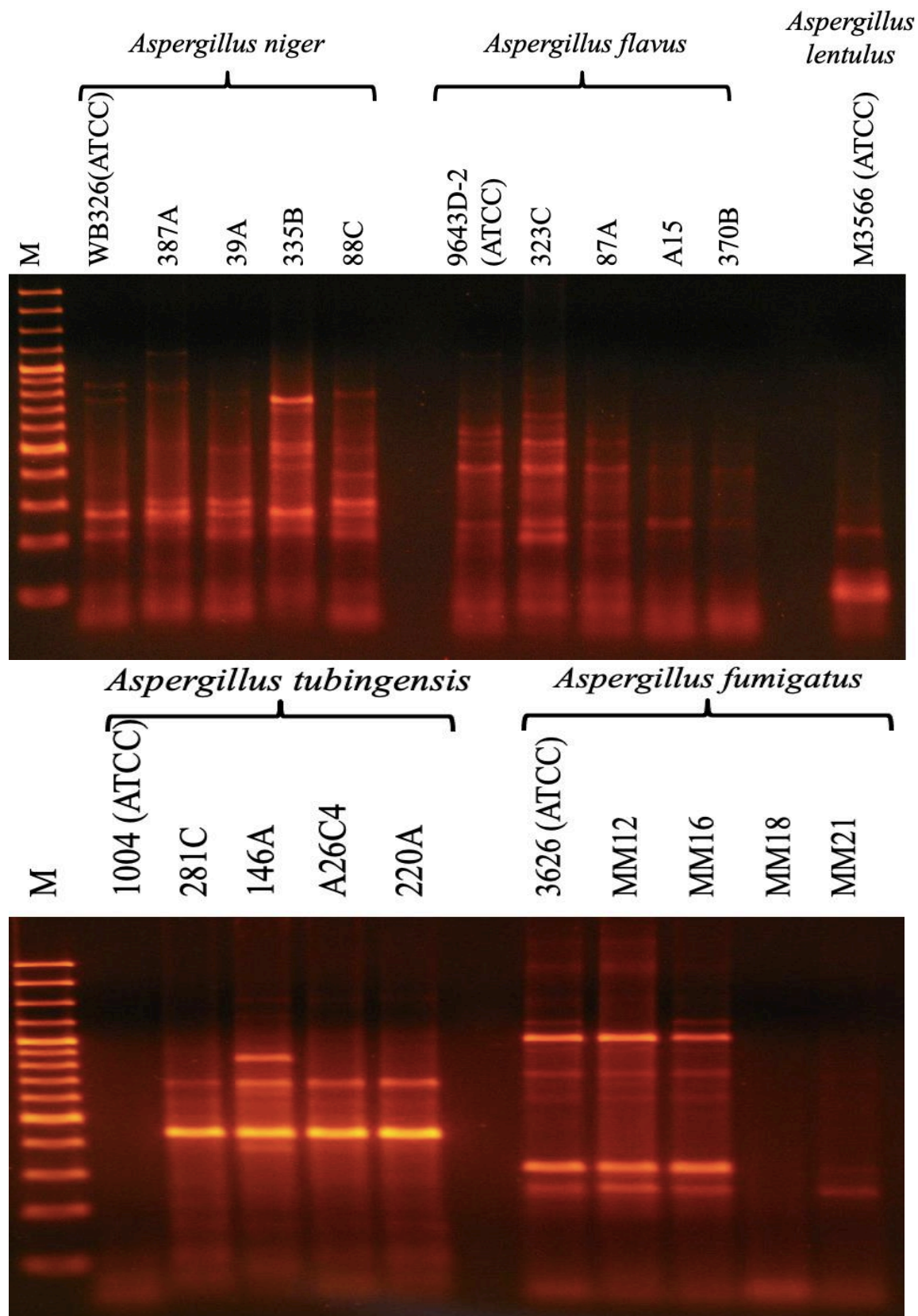


Figura 45. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido B04.

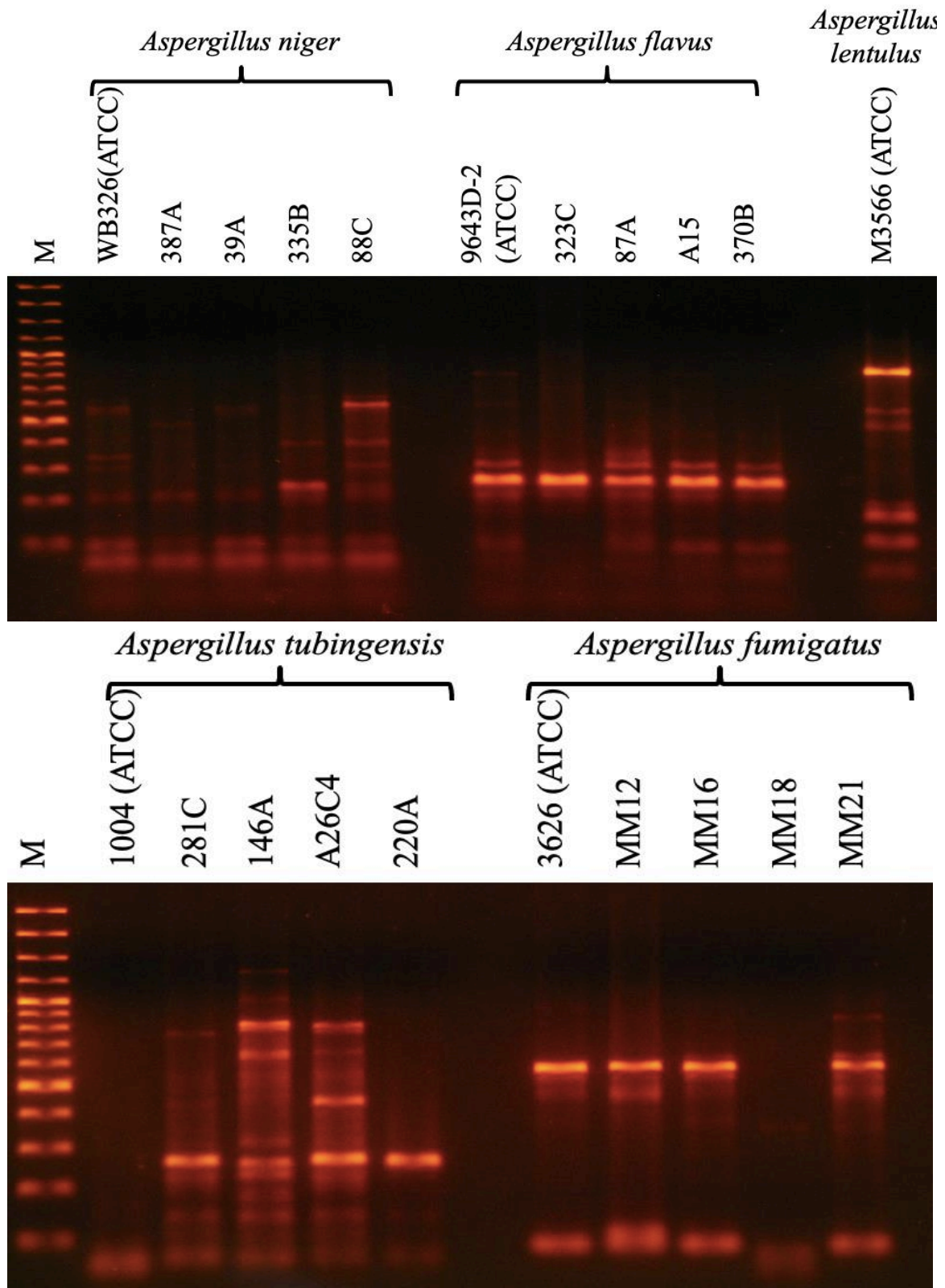


Figura 46. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPH-17.

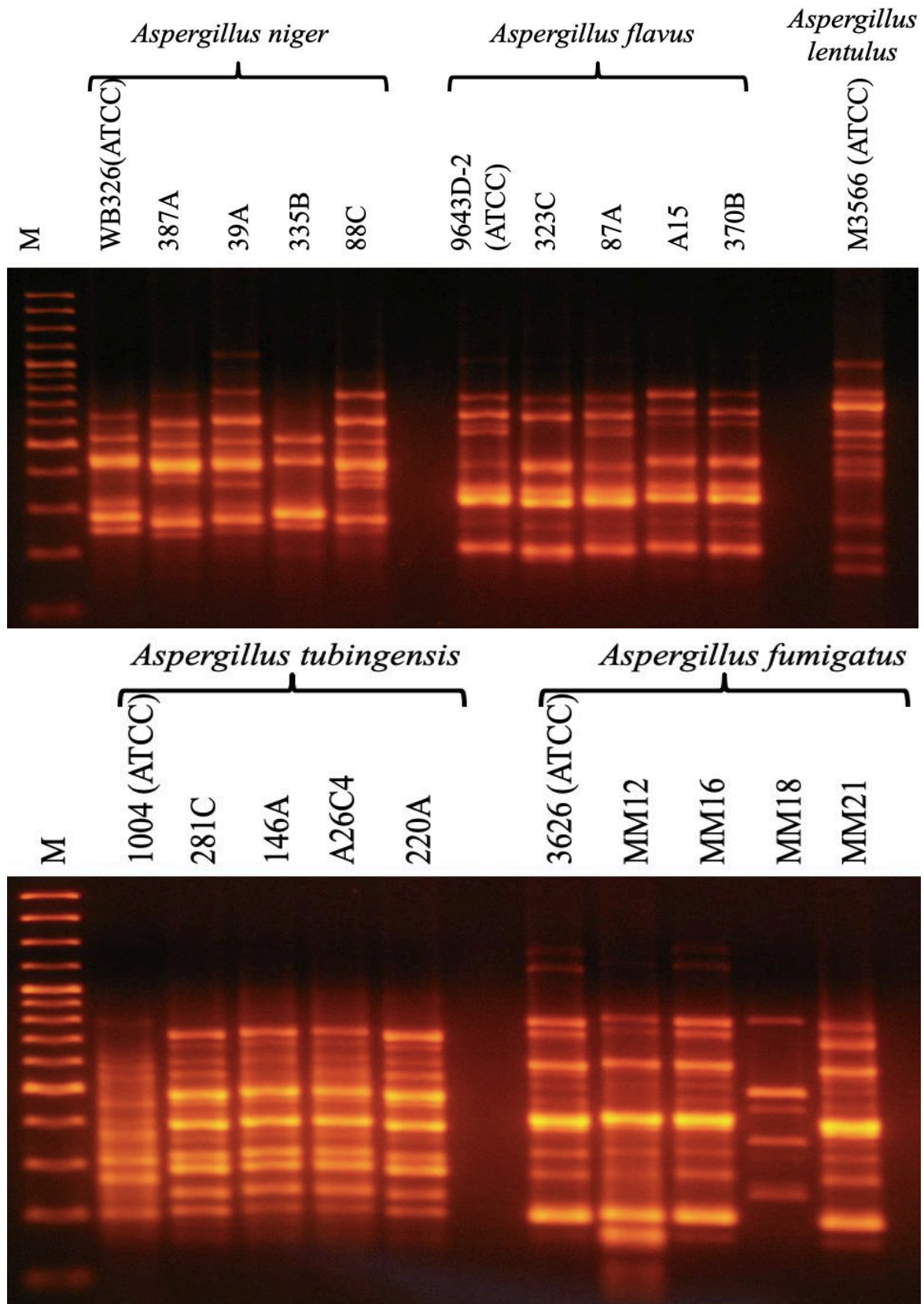


Figura 47. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido T3B.

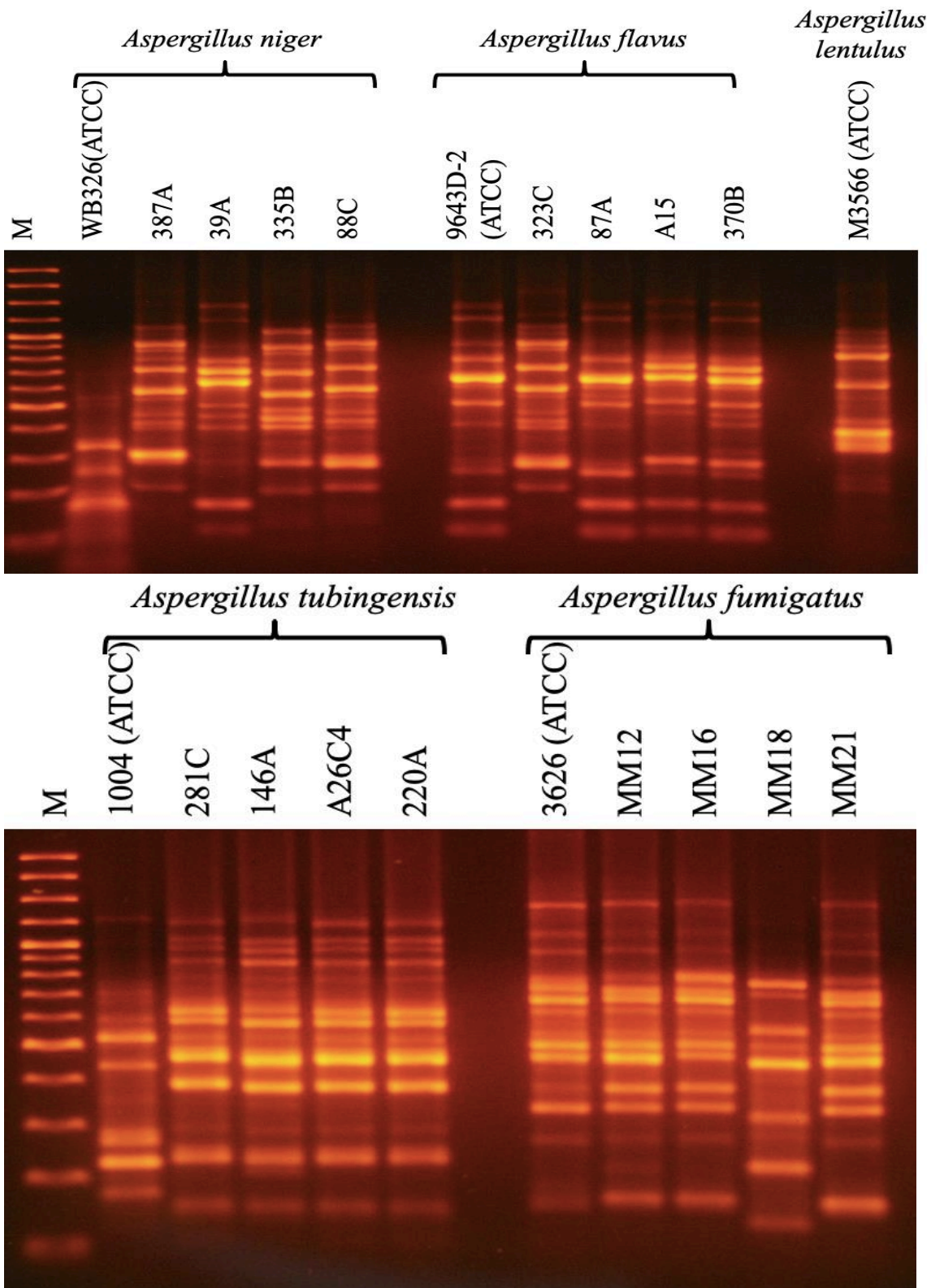


Figura 48. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPA-02.

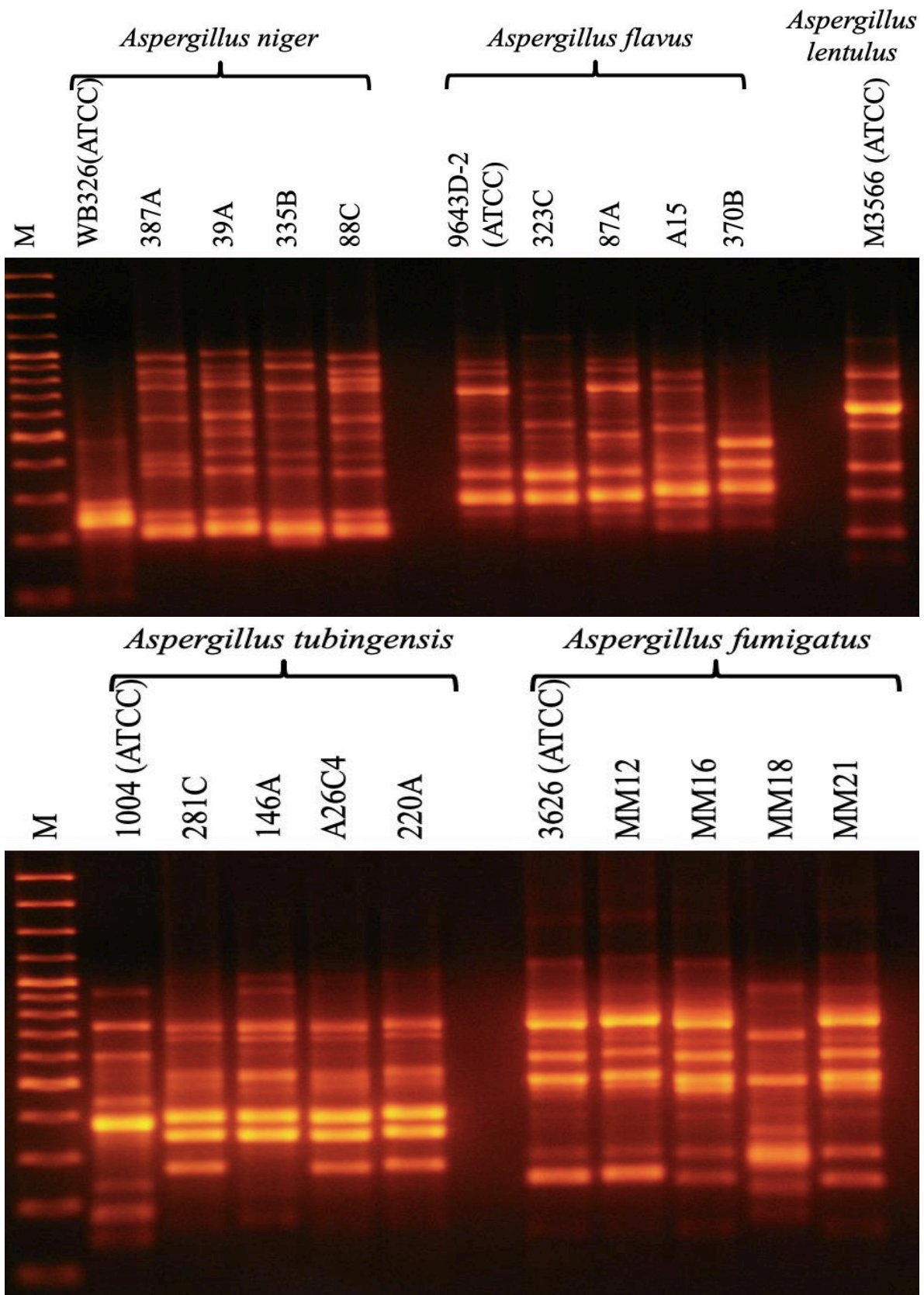


Figura 49. Patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR para las cinco especies con el oligonucleótido OPA-03.