



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la sensibilidad del marcador
molecular CSP₃₆₂ para identificar *Aspergillus*
fumigatus en muestras biológicas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

VILLANUEVA AMADOR GETSEMANÍ SINAÍ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA GUADALUPE FRÍAS DE LEÓN

México, D. F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título

Número de páginas

Año

1. Datos del alumno

Villanueva
Amador
Getsemaní Sinaí
59246603
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305293374

2. Datos del tutor

Dra.
María Guadalupe
Frías
De León

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Joaquín
Cifuentes
Blanco

4. Datos del sinodal 2

Quím.
Viviana
Escobar
Sánchez

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Silvia
Caballero
Salazar

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Esperanza
Duarte
Escalante

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de la sensibilidad del marcador molecular CSP362 para identificar *Aspergillus fumigatus* en muestras biológicas

55 p.

2015

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 14 |
| JUSTIFICACIÓN | 15 |
| OBJETIVO GENERAL | 17 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 17 |
| HIPÓTESIS | 18 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL | 18 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| • Aislados de <i>Aspergillus fumigatus</i> | 21 |
| • Muestras biológicas | 21 |
| • Cultivo de aislados | 21 |
| • Extracción de DNA de aislados de <i>A. fumigatus</i> | 21 |
| • Inoculación experimental de muestras biológicas | 23 |
| ✓ Inoculación de muestras de sangre total | 23 |
| ✓ Inoculación de muestras de suero | 24 |
| ✓ Inoculación de muestras de esputo | 24 |
| • Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) | 25 |
| • Extracción de DNA de muestras biológicas inoculadas de <i>A. fumigatus</i> | 25 |
| • Evaluación de la sensibilidad del marcador CSP ₃₆₂ de <i>A. fumigatus</i> | 26 |
| • Evaluación de la sensibilidad del marcador CSP ₃₆₂ en muestras biológicas inoculadas con <i>A. fumigatus</i> | 27 |
| • Correlación entre la sensibilidad del marcador CSP ₃₆₂ determinada por PCR y las unidades formadoras de colonias (UFC) | 27 |
| RESULTADOS | 28 |
| DISCUSIÓN | 42 |
| CONCLUSIONES | 45 |

| | |
|--------------|----|
| PERSPECTIVAS | 45 |
| GLOSARIO | 46 |
| REFERENCIAS | 48 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| 1. Marcadores moleculares para identificar <i>A. fumigatus</i> | 9 |
| 2. Muestras biológicas inoculadas con <i>A. fumigatus</i> | 27 |
| 3. Concentración de DNA de aislados de <i>A. fumigatus</i> | 28 |
| 4. UFC desarrolladas en PDA de conidios | 30 |
| 5. UFC desarrolladas en PDA de micelio | 32 |
| 6. DNA obtenido de sangre total inoculada con conidios <i>A. fumigatus</i> | 33 |
| 7. DNA obtenido de suero inoculado con DNA de <i>A. fumigatus</i> | 34 |
| 8. DNA obtenido de esputo inoculado con micelio de <i>A. fumigatus</i> | 35 |
| 9. Correlación de resultados de PCR-UFC de conidios | 40 |
| 10. Correlación de resultados de PCR-UFC de micelio | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| 1. Ciclo infeccioso de <i>A. fumigatus</i> | 5 |
| 2. Diseño experimental | 20 |
| 3. Cámara de Neubauer | 23 |
| 4. DNA de aislados de <i>A. fumigatus</i> | 28 |
| 5. Placa de conidios | 29 |
| 6. Placa de micelio | 31 |
| 7. Amplificación del control positivo MM-6 de <i>A. fumigatus</i> | 36 |
| 8. Amplificación de DNA de sangre total inoculada con conidios de <i>A. fumigatus</i> | 37 |
| 9. Amplificación de DNA de suero inoculado con DNA de <i>A. fumigatus</i> | 38 |
| 10. Amplificación de DNA de esputo inoculado con micelio de <i>A. fumigatus</i> | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

2Asp: método para identificar *Aspergillus* mediante la amplificación de una región específica del 28S rRNA, por PCR en tiempo real

4Asp: método para identificar *Aspergillus* mediante la amplificación, por PCR en tiempo real, de una región específica del 18S rRNA

API: aspergilosis pulmonar invasora

BDG: (1,3) β -D-Glucano

bp: pares de bases (siglas en inglés)

CSP: proteína de superficie celular (siglas en inglés)

DNA: ácido desoxirribonucleico (siglas en inglés)

EDTA: ácido etildiaminotetraacético (siglas en inglés)

GM: galactomanano

ITS: espaciador transcripcional interno (siglas en inglés)

LBA: lavado broncoalveolar

mtDNA: DNA mitocondrial (siglas en inglés)

PBST: amortiguador fosfato salino, pH 7.4 adicionado con tween 20 al 0.05% (siglas en inglés)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)

PDA: agar papa dextrosa (siglas en inglés)

qPCR: PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (siglas en inglés)

RNA: ácido ribonucleico (siglas en inglés)

rRNA: RNA ribosomal (siglas en inglés)

TBE: amortiguador con trisaminometano, ácido bórico y EDTA (siglas en inglés)

UFC: unidades formadoras de colonias

YDP: extracto de levadura, peptona de caseína, dextrosa (siglas en inglés)

RESUMEN

La aspergilosis invasora (AI) es una infección causada por hongos del género *Aspergillus*, siendo *A. fumigatus* el más común. La AI afecta a individuos inmunocomprometidos y presenta elevados índices de mortalidad como consecuencia de un diagnóstico erróneo o tardío que conlleva a un tratamiento farmacológico ineficaz. Con la finalidad de obtener un diagnóstico más preciso, se han desarrollado diversos ensayos de PCR para detectar marcadores moleculares (secuencias específicas de DNA) de *A. fumigatus*, como el CSP₃₆₂. Este marcador es un fragmento de 362 bp que forma parte de la secuencia del gen CSP, el cual codifica una proteína de superficie celular del hongo. El marcador CSP₃₆₂ es amplificado por PCR con los oligonucleótidos CSP₃₆₂-F y CSP₃₆₂-R, y discrimina *A. fumigatus* de especies estrechamente relacionadas como *A. lentulus*, por lo que se ha propuesto como una herramienta diagnóstica, previa validación en muestras clínicas. En este trabajo se determinó la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂, para ello se amplificaron diferentes concentraciones de DNA de *A. fumigatus*, así como el DNA obtenido de muestras de sangre total, suero y esputo, inoculadas con diferentes concentraciones de conidios, DNA y micelio del hongo, respectivamente. Asimismo, la sensibilidad se obtuvo en unidades formadoras de colonias (UFC), a partir del cultivo de cada concentración de conidios y micelio utilizada para la inoculación de las muestras.

La sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras de DNA de *A. fumigatus* fue 10⁻⁵ ng/μL. En muestras biológicas, el marcador CSP₃₆₂ presentó una sensibilidad de 10⁻³ conidios/μL equivalentes a 1 UFC/μL en sangre total; 10⁻⁵ ng/μL en suero, y de 10⁴ ng/μL equivalentes a 4 UFC/μL en esputo.

INTRODUCCIÓN

El género *Aspergillus* está integrado por hongos filamentosos caracterizados por ser termotolerantes, ubicuos en la naturaleza y saprobios (Barnes, 2006; Segal, 2009; Barton, 2012). Asimismo, *Aspergillus* forma parte de la microbiota normal orofaríngea, de fosas nasales, tegumentos y del tubo gastrointestinal (Pazos-Pacheco, 2004).

Los hongos del género *Aspergillus* pertenecen a la familia *Trichocomaceae* de la división Ascomycota (Species Fungorum, 2014). El número total de especies de este género varía dependiendo del criterio de clasificación utilizado, el cual puede basarse en el análisis de macro y micromorfología, perfiles de extrolitos (metabolitos secundarios) y polimorfismo en la secuencia de diferentes genes (β -tubulina, calmodulina, ITS, actina, entre otros) (Samson *et al.*, 2006; 2007; 2009; Geiser *et al.*, 2007). De tal manera que algunos autores reportan entre 132 y 250 especies de *Aspergillus* (Abarca, 2000; Geiser *et al.*, 2007; Guarro, 2012) y otros reportan 900 especies (De-Amorim *et al.*, 2004; Díaz-Sánchez *et al.*, 2004; Gurguí-Ferrer, 2010) refiriendo la publicación de Raper y Fennell (1988). En el "Dictionary of the Fungi" (Kirk *et al.*, 2001) solo se reportan 181 especies, mientras que en la base de dato "Mycobank" (2014) se reportan aproximadamente 1000 especies y en "Index Fungorum" (2014) 886 especies, incluyendo sinónimos y nombres no correctos. De estas especies, alrededor de 20 habían sido reportadas como causantes de enfermedades en humanos, siendo *Aspergillus fumigatus* la responsable de más del 90% de los casos, seguida por *A. terreus*, *A. niger* y *A. flavus* (Latgé, 2001; Guarro, 2003). Sin embargo, es importante destacar que en los últimos años, numerosos estudios taxonómicos han revelado que el número de especies de *Aspergillus* es mayor de lo que se pensaba, ya que muchas de las especies reconocidas anteriormente son en realidad complejos de especies, llamadas "secciones". A la fecha, y de acuerdo con los criterios del "International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants", las especies del género *Aspergillus* han sido reclasificadas en 16 secciones: *Aenei*, *Aspergillus*, *Bispori*, *Candidi*, *Circumdati*, *Clavati*, *Cremeri*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Nigri*, *Restricti*, *Terrei*, *Usti* y *Zonati*, de las cuales *Fumigati*, *Flavi*,

Nigri, *Terrei*, *Clavati* y *Nidulantes* incluyen especies patógenas para el humano (Krimitzas *et al.*, 2013). En esta nueva clasificación, los agentes etiológicos más frecuentes de aspergilosis se encuentran en cuatro secciones: *Fumigati* (*A. fumigatus*), *Nigri* (*A. niger*), *Terrei* (*A. terreus*) y *Flavi* (*A. flavus*). La sección *Fumigati* contempla 25 especies diferentes con 7 anamorfos y 18 teleomorfos (Samson *et al.*, 2006). Dentro de esta sección, además de *A. fumigatus*, las especies *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *Neorsartorya fischeri*, *N. pseudofischeri* y *N. hiratsukae* han sido reportadas como patógenas para el humano y se caracterizan por presentar patrones de susceptibilidad a los antifúngicos distintos a los de *A. fumigatus* (Samson *et al.*, 2007; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008; Krishnan *et al.*, 2009; Sugui *et al.*, 2014). La prevalencia de estas especies crípticas en muestras clínicas se ha estimado hasta en un 10% (Pappas *et al.*, 2010), por lo que su identificación correcta es de gran relevancia en el tratamiento de los pacientes.

Las formas clínicas ocasionadas por *Aspergillus* son diversas, pueden ser desde intoxicaciones, alergias y micosis superficiales (otitis externas, onicomycosis, queratomycosis, infecciones de heridas y quemaduras) hasta infecciones profundas, como la aspergilosis invasora (AI), siendo ésta una de las formas clínicas más importantes en la actualidad por el incremento en su incidencia y elevada tasa de mortalidad (Balajee & Marr, 2006; Geiser *et al.*, 2007). La AI se adquiere por la inhalación de los conidios de *Aspergillus* presentes en el aire, los cuales germinan y las hifas se pueden dispersar rápidamente hacia los tejidos (Figura 1), particularmente en el caso de pacientes inmunocomprometidos (Dagenais *et al.*, 2009; Richie *et al.*, 2011).

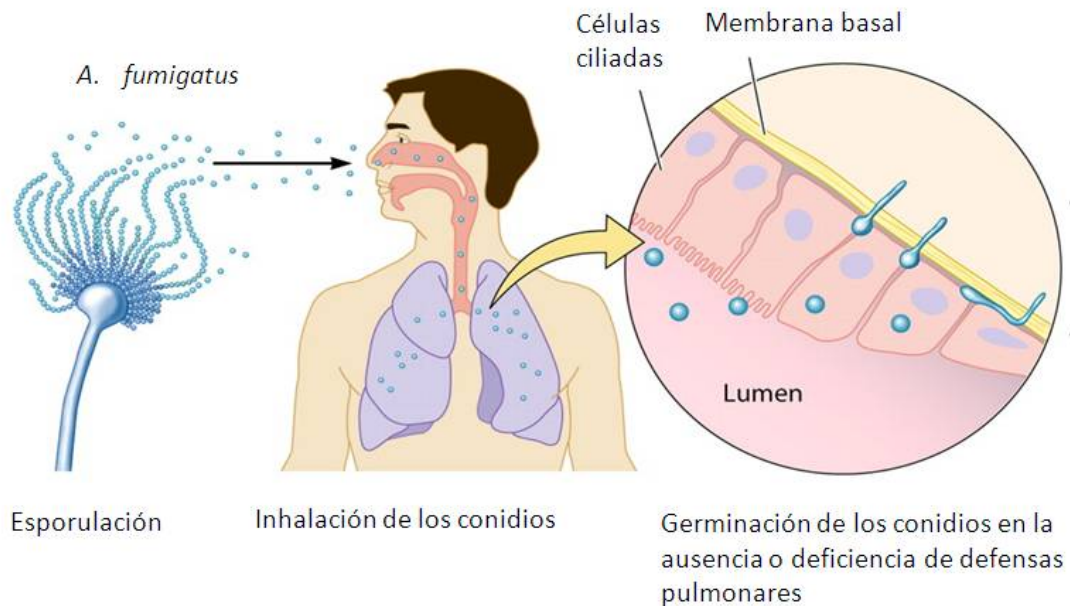


Figura 1. Ciclo infeccioso de *Aspergillus fumigatus* (Dagenais *et al.*, 2009, modificado por Villanueva Amador, G. S.).

La forma clínica y la severidad de la enfermedad dependen del estado inmunológico del hospedero y de la especie involucrada, ya que como se mencionó anteriormente, existen especies resistentes a los antifúngicos (Latgé, 2001; Guarro, 2003).

Los individuos inmunocomprometidos presentan mayor riesgo para desarrollar AI, principalmente quienes se han sometido a trasplante alogénico o autólogo de médula ósea, tratamiento con corticoides, trasplante de órgano sólido, quimioterapia. También son susceptibles quienes cursan con neutropenia prolongada (superior a dos semanas), leucemia aguda o linfoma, anemia aplásica, neutropenia no inducida farmacológicamente, enfermedad granulomatosa crónica, así como pacientes con aspergilosis previa sometidos a quimioterapia o trasplante de médula ósea (Torelli, 2011; Li *et al.*, 2013; Rogers *et al.*, 2013). En estos individuos, la tasa de mortalidad alcanza hasta el 90% debido a las limitaciones para establecer un diagnóstico oportuno y una terapia eficaz (Meersseman, 2007; Klingspor & Loeffler, 2009; Thornton, 2010; Lockner & Lass-Flörl, 2013).

El diagnóstico convencional de la AI se realiza con base en la sospecha clínica inicial y la confirmación microbiológica a través de un cultivo y examen microscópico de la muestra. Para el cultivo micológico se utiliza agar Sabouraud-cloranfenicol y se incuba entre 25 y 35° C. El cultivo tiene la ventaja de permitir el aislamiento del hongo, lo cual es necesario para identificar la especie causal mediante sus características micro y macroscópicas (del Palacio *et al.*, 2003). Sin embargo, las desventajas de los cultivos son el tiempo de crecimiento fúngico, ya que se requieren hasta cuatro semanas para observar el desarrollo del patógeno (Pontón, 2002), así como la adecuada interpretación cuando se obtiene un cultivo positivo a partir de muestras respiratorias, ya que *Aspergillus* es un contaminante frecuente debido a la ubicuidad de sus conidios (Pemán, 2003). Por tales motivos, se considera que las muestras más adecuadas para el diagnóstico de la AI mediante cultivo son las biopsias, los aspirados de lugares estériles y el lavado broncoalveolar (LBA). El aislamiento de *Aspergillus* a partir de este tipo de muestras, obtenidas de pacientes en riesgo de AI, se considera siempre como altamente sugestivo de infección (Pemán, 2000; Sun, 2011).

El examen microscópico consiste en la observación directa de las muestras clínicas (examen en fresco) con solución KOH; o con blanco de calcoflúor en un microscopio de fluorescencia. El examen en fresco tiene la ventaja de ser rápido y sensible, pero también tiene ciertas desventajas ya que depende de la experiencia del analista para identificar las estructuras fúngicas, en algunas ocasiones los elementos fúngicos pueden confundirse con las fibras de colágeno o de hisopos, gotas de grasa, o con otros patógenos que presentan una morfología similar, como *Fusarium* o *Scedosporium*. En la mayoría de los casos no es posible identificar la especie fúngica por examen microscópico, y en la actualidad es más complicado debido a la cantidad de especies crípticas descritas. La sensibilidad global del examen microscópico es alrededor del 50%, es decir que un resultado negativo no siempre descarta una infección fúngica. La sensibilidad de la técnica puede depender del lugar anatómico y tipo de tinción (Pemán, 2003; 2013; Llovo & Pontón, 2007).

Por otro lado, el diagnóstico serológico de la AI se realiza con base en la detección de

antígenos circulantes de *Aspergillus* en suero, orina, LBA, etc. Los antígenos que se identifican principalmente son el galactomanano (GM), el (1,3) β -D-Glucano (BDG) y otros diferentes antígenos de 29, 18 y 11 kDa (Pemán, 2000). El GM es un componente de la pared celular fúngica y es el primer polisacárido detectado en pacientes con AI (Pemán, 2000). Se han desarrollado dos sistemas comerciales que usan los mismos anticuerpos monoclonales para detectar al GM en muestras clínicas: 1) Pastorex *Aspergillus* (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, FR), que se lleva a cabo con base en la aglutinación de partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan con el GM y presenta una sensibilidad de 15 ng/mL; 2) Platelia *Aspergillus* (Sanofi Diagnostics Pasteur, FR) y Platelia [®]*Aspergillus* (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, FR), que utilizan el mismo anticuerpo monoclonal para detectar GM por ELISA indirecto. El primero, es capaz de detectar hasta 1 ng/mL de GM en suero (Pemán, 2000) y el segundo entre 0,5-1 ng/mL (del Palacio *et al.*, 2003). El sistema Platelia *Aspergillus* es el más empleado por su sensibilidad, mientras que Pastorex *Aspergillus* dejó de utilizarse por su baja sensibilidad (del Palacio *et al.*, 2003). Varios estudios han demostrado que, además de contribuir al diagnóstico precoz de la AI, Platelia *Aspergillus* (Sanofi Diagnostics) presenta una adecuada reproducibilidad intra e interlaboratorio, siempre y cuando se entienda como resultado positivo la existencia de dos muestras consecutivas positivas (del Palacio *et al.*, 2003). Es importante mencionar que el GM es detectable por ELISA antes de la aparición de signos o síntomas de infección fúngica, y 2-3 semanas antes de la detección por aglutinación de partículas de látex, por lo que es una herramienta útil para la instauración temprana del tratamiento y la monitorización del mismo. La muestra de suero es la más utilizada para la detección del GM, mientras que las muestras de orina y LBA se emplean comúnmente para corroborar los resultados obtenidos en suero (Pemán, 2000; del Palacio *et al.*, 2003). Sin embargo, recientemente se ha reportado que la detección de GM en LBA es más sensible que en suero, pero en éste la especificidad es mayor (Buess *et al.*, 2012).

El antígeno BDG es un componente de la pared celular de hongos como *Aspergillus*, *Candida*, *Pneumocystis*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* y *Acremonium*, que se puede detectar en suero mediante un método colorimétrico (Fungitell; Associates of Cape Cod, MA, EUA) (Alexander *et al.*, 2010). La evaluación se realiza con base en la prueba del *Limulus*. Esta prueba consiste en que el BDG se activa por el factor G, una serin proteasa zimogénica del lisado del amebocito del *Limulus*, el cual es extraído de los amebocitos de especies de cangrejos herradura. A su vez, el factor G, activa una cascada de coagulación. La actividad de esta reacción puede ser medida por colorimetría o turbidimetría. Su especificidad es del 85%, su sensibilidad del 77%, además existe gran heterogeneidad entre los estudios y los ensayos comerciales existentes (Karageorgopoulos *et al.*, 2011).

En los últimos años, se ha planteado la detección directa del DNA de *Aspergillus* spp. en muestras clínicas como una alternativa rápida, específica y sensible para el diagnóstico de la AI. La detección del patógeno se realiza amplificando una secuencia del DNA (marcador molecular) del patógeno, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en cualquiera de sus diferentes modalidades: anidada, simplex, multiplex, punto final y tiempo real. Asimismo, la hibridación de sondas de DNA específicas ha sido utilizada para detectar el material genético de *Aspergillus* spp. (Tabla 1).

Tabla 1. Marcadores moleculares para identificar *Aspergillus fumigatus*.

| Marcador molecular | Metodología | Especificidad | Sensibilidad | Muestra | Referencia |
|---|---------------------------------|---|--|--|-------------------------------|
| Secuencia del mtDNA y del gen que codifica para una proteasa alcalina | PCR y Southern blot | <i>Aspergillus</i> spp. | 5 pg de DNA por PCR y 500 fg de DNA por Southern blot | LBA de pacientes con cáncer y neumonía sugestiva | Tang, 1993 |
| Secuencia del gen 18S rRNA | PCR género o especie específica | <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Candida</i> spp. | Para <i>C. krusei</i> fue 1 pg de DNA equivalente a 1 UFC/mL. Para <i>A. fumigatus</i> 100 fg de DNA | Sangre total de pacientes neutropénicos y con infección micótica invasora | Einsele <i>et al.</i> , 1997 |
| Secuencia del gen 18S rRNA | PCR anidada | <i>Aspergillus</i> spp. | 10 fg DNA equivalentes a 1-5 UFC/mL de sangre total | Sangre total y LBA de pacientes inmunocomprometidos (neoplasias hematológicas) e inmunocompetentes (neumonía y sospecha de tumores) | Skladny <i>et al.</i> , 1999 |
| Secuencia del gen 18S rRNA | PCR panfúngica | <i>Aspergillus</i> spp. | 100% de sensibilidad y 73% de especificidad | Sangre total de pacientes en inducción o en consolidación de quimioterapia por leucemia o en altas dosis de terapia seguidos del trasplante de células madre | Herbart <i>et al.</i> , 2000 |
| Secuencia del gen 18S rRNA | qPCR con Light Cycler | <i>A. fumigatus</i> | 5 UFC/mL | Sangre total de individuos inmunocompetentes y pocas muestras de pacientes con deficiencias hematológicas | Loeffler <i>et al.</i> , 2000 |
| Secuencia del gen 18S rRNA | PCR panfúngica y anidada | <i>Fusarium solani</i> y <i>C. albicans</i> | 50 fg de DNA para <i>F. solani</i> y <i>C. albicans</i> ; y | Fluido vítreo de pacientes con sospecha de endoftalmítis | Jaeger <i>et al.</i> , 2000 |

Continuación de Tabla 1

| Marcador molecular | Metodología | Especificidad | Sensibilidad | Muestra | Referencia |
|---|--|---|---|---|--------------------------------|
| | | <i>A. fumigatus</i> | 100 fg de DNA para <i>A. fumigatus</i> | | |
| Secuencia del gen 18S rRNA | PCR | <i>Aspergillus</i> spp. | 10 UFC/mL | Plasma y sangre total de individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos (trasplantados alogénicos de médula ósea) | Loeffler <i>et al.</i> , 2000 |
| Secuencia del gen 18S rRNA | qPCR | <i>Aspergillus</i> spp. | 20 número de copias/mL | Plasma y sangre total de pacientes en quimioterapia por deficiencias hematológicas o anemia aplásica severa | Kami <i>et al.</i> , 2001 |
| Secuencia del gen 18S rRNA | PCR anidada | <i>Aspergillus</i> spp. | 10 fg de DNA correspondiente a 5 UFC/mL | LBA de pacientes con riesgo de contraer aspergilosis invasora | Buchheidt <i>et al.</i> , 2001 |
| Secuencia de las proteasas alcalinas de <i>A. fumigatus</i> | PCR anidada | <i>Aspergillus</i> spp., <i>A. fumigatus</i> y <i>A. flavus</i> | 25 fg de DNA genómico de <i>A. fumigatus</i> y 10 pg de DNA de <i>A. flavus</i> La técnica no distingue entre infección y colonización | LBA de pacientes inmunosuprimidos (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neoplasias hematológicas, trasplante de órganos, SIDA o cáncer) e inmunocompetentes | Hayette <i>et al.</i> , 2001 |
| Secuencia del gen 18S rRNA | PCR-ELISA, y PCR cuantitativa (LightCycler, Roche Diagnostics) | <i>A. fumigatus</i> | 100 fg de DNA, equivalentes a 10 UFC/mL de sangre total Por PCR-ELISA. 10 ¹ -10 ² UFC/mL de sangre total, por qPCR | Sangre total y biopsia de tejidos de ratones y conejos inmunosuprimidos | Loeffler <i>et al.</i> , 2001 |
| Secuencia del mtDNA | qPCR | <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> | ≤30 fg/mL en suero | Diferentes fracciones de sangre total: suero, plasma y células blancas de pacientes en riesgo de AI | Costa <i>et al.</i> , 2002 |

Continuación de Tabla 1

| Marcador molecular | Metodología | Especificidad | Sensibilidad | Muestra | Referencia |
|--|---|---|--|--|--|
| Secuencia del gen 18S rRNA | PCR | <i>A. fumigatus</i> | > 1.0 UFC/mL | Sangre total y LBA de individuos inmunocompetentes | Loeffler <i>et al.</i> , 2002 |
| Región 5.8 del rRNA | qPCR | <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. | 200 fg-20 ng de DNA fúngico | Suero de pacientes clasificados con infección fúngica invasora posible, probable o probada | Pham <i>et al.</i> , 2003 |
| Secuencia del mtDNA | qPCR | <i>A. fumigatus</i> y <i>Neosartorya</i> spp. | 20 pg de DNA | LBA y biopsias de pacientes en riesgo de AIP | Rantakokko-Jalava <i>et al.</i> , 2003 |
| Secuencia del gen 18S rRNA | qPCR | <i>Aspergillus</i> sp. | Sensibilidad de 90% y especificidad del 100% | LBA de pacientes con deficiencias hematológicas | Sanguinetti <i>et al.</i> , 2003 |
| Secuencia de una región del 18S rRNA | PCR anidada cualitativa y qPCR anidada | <i>Aspergillus</i> sp. | 10 UFC/mL de sangre total para ambas PCR | Tejido, sangre total, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico, LBA de pacientes hematológicos con riesgo de AI | Halliday <i>et al.</i> , 2005 |
| Secuencia del mtDNA | qPCR | <i>A. fumigatus</i> | <2.5 fg/μL | Suero de pacientes con enfermedad hematológica | Millon <i>et al.</i> , 2005 |
| Secuencia de una región del 18S rRNA y secuencia de una región ITS1 e ITS2 | qPCR para la región 18S y PCR panfúngica para la región ITS | <i>A. fumigatus</i> | 27 fg de DNA por qPCR y 0.5 pg por PCR panfúngica | Sangre total, suero, pulmón y cerebro. Modelo de conejo con AI | Gómez-López <i>et al.</i> , 2006 |
| Secuencia de una región del 18S rRNA y 28S rRNA | qPCR | <i>Aspergillus</i> sp. | 10 conidios/mL para 2Asp y 500 conidios/mL para 4Asp | Sangre total y agua. Inoculación experimental de sangre total de individuos inmunocompetentes | White <i>et al.</i> , 2006 |
| Secuencia del mtDNA | PCR-ELISA | <i>A. fumigatus</i> y <i>A. flavus</i> | 63.6% de sensibilidad y | Suero de pacientes con deficiencias | Florent <i>et al.</i> , 2006 |

Continuación de Tabla 1

| Marcador molecular | Metodología | Especificidad | Sensibilidad | Muestra | Referencia |
|---|---|--|---|---|--------------------------------------|
| | | | 89.7% de especificidad | de hematológicas | |
| Secuencia de una región del 28S rRNA | qPCR anidada | <i>Aspergillus</i> sp. | 10 UFC/mL | Sangre total de pacientes en riesgo de infección fúngica invasora | White <i>et al.</i> , 2006 |
| Secuencia de una región del 18S rRNA | qPCR | <i>Aspergillus</i> sp. | 13 fg de DNA | LBA de pacientes en alto riesgo de AI | Khot <i>et al.</i> , 2008 |
| Secuencia de una región ITS1 | qPCR | <i>Aspergillus</i> sp. | 91.6% de sensibilidad. Presenta aplicación diagnóstica cuando se combina con la detección de GM | Sangre total y suero de pacientes febriles con neutropenia | Cuenca-Estrella <i>et al.</i> , 2009 |
| Secuencias parciales de β -tubulina y Rodlet A. | PCR multiplex | <i>A. fumigatus</i> | Perfiles electroforéticos distintivos en aislados de <i>A. fumigatus</i> | Aislados clínicos | Serrano <i>et al.</i> , 2011 |
| Secuencia del mtDNA y rDNA | qPCR | <i>A. fumigatus</i> | 30 fg de DNA | Suero de pacientes con riesgo de AI | Millon <i>et al.</i> , 2011 |
| Secuencia de una región del 18S rRNA | qPCR | <i>Aspergillus</i> spp. | ≤ 50 copias del 18S rRNA, equivalentes a 1 genoma de <i>A. fumigatus</i> | LBA de pacientes de las unidades de cuidados intensivos y hematología | Torelli <i>et al.</i> , 2011 |
| Secuencia de una región ITS1 y 18S rRNA | qPCR y PAN- <i>Aspergillus</i> | Género y especie específico de <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> y <i>A. terreus</i> | 5 copias del genoma de <i>Aspergillus</i> sp. | LBA, pulmón de conejos experimentalmente inmunosuprimidos | Walsh <i>et al.</i> , 2011 |
| Secuencia de una región ITS del | PCR anidada para ITS, y qPCR para β -tubulina | <i>A. fumigatus</i> y <i>A. flavus</i> | 40 copias del genoma de <i>A. flavus</i> y 35 copias de | LBA de pacientes con incidencia de API | Zarrinfar <i>et al.</i> , 2013 |

Continuación de Tabla 1

| Marcador molecular | Metodología | Especificidad | Sensibilidad | Muestra | Referencia |
|--|--|-------------------------|-------------------------------|---|-----------------------------|
| rDNA y la secuencia de β -tubulina | | | genoma de <i>A. fumigatus</i> | | |
| Región del gen 28S del rDNA y la secuencia de una región ITS1 a 5.8S del operón ribosomal multicopia | qPCR anidada para 28S y qPCR para ITS1 | <i>Aspergillus</i> sp. | 10 conidios/mL | Sangre total y suero de pacientes receptores de trasplante de células madre | Rogers <i>et al.</i> , 2013 |
| Secuencia parcial del 28S e ITS2 rRNA | qPCR | <i>Aspergillus</i> spp. | 1 copia/mL del genoma | Sangre total y plasma de pacientes hematológicos febriles | Li <i>et al.</i> , 2013 |

2Asp: método para identificar *Aspergillus* por amplificación de una región específica del 28S rRNA; 4Asp: método para identificar *Aspergillus* por la amplificación de una región específica del 18S rRNA; API: aspergilosis pulmonar invasora; GM: galactomanano; ITS: espaciador transcripcional interno; mtDNA: DNA mitocondrial; qPCR: PCR cuantitativa o en tiempo real; rRNA: RNA ribosomal; UFC: unidades formadoras de colonia.

No obstante que, como se muestra en la tabla 1, se han reportado varios ensayos para la detección del DNA de *Aspergillus* spp., todos presentan diferentes inconvenientes que limitan su uso generalizado como método diagnóstico de la AI, como son la falta de estandarización en cuanto a la selección y manipulación de los especímenes clínicos, el método de extracción del DNA, la baja sensibilidad en la detección del DNA y la baja reproducibilidad inter-laboratorio (White *et al.*, 2010). La inespecificidad, es otra de las limitaciones que presentan los marcadores reportados para la detección de *A. fumigatus*, la cual se debe a la gran variabilidad genética que existe entre los aislados del hongo procedentes de diferentes regiones geográficas (Duarte-Escalante *et al.*, 2009; Frías De León *et al.*, 2014), por lo que es importante considerar que el marcador molecular empleado para el diagnóstico debe ser obtenido a partir de aislados autóctonos, para evitar resultados falsos negativos. Con base en lo anterior, Zavala-

Ramírez (2011) analizó el polimorfismo entre secuencias parciales del gen CSP (Proteína de Superficie Celular), utilizando aislados de *A. fumigatus* procedentes de México, Argentina, Francia y Perú. El gen CSP codifica para una proteína putativa de superficie, la cual está involucrada en procesos de adherencia a la matriz extracelular y la germinación de conidios, se localiza en el cromosoma 3 del genoma de *A. fumigatus* y contiene dos regiones repetitivas, una de 12 bp y otra de 18 bp, por lo que es utilizado en la tipificación y el estudio de relaciones filogenéticas entre aislados del hongo (Klaassen *et al.*, 2009). A partir del análisis de secuencias, Zalava-Ramírez (2011) eligió una región compartida por todas las secuencias, para el diseño de un par de oligonucleótidos que amplifican una región de 362 bp que es específica de *A. fumigatus* (marcador molecular CSP₃₆₂), verificando en la base de datos GenBank que, efectivamente, no compartiera secuencias con otros hongos para evitar resultados falsos positivos. El marcador CSP₃₆₂ mostró ser específico para aislados de *A. fumigatus* ya que no se observó amplificación cuando se probó el DNA de otros hongos patógenos, además logró discriminar *A. fumigatus* del resto de especies patógenas dentro de su género, así como *A. lentulus* que es resistente a los antifúngicos y morfológicamente indistinguible de *A. fumigatus* (Balajee *et al.*, 2005). Por lo que Zavala-Ramírez (2011) postuló que el marcador molecular CSP₃₆₂ puede funcionar como herramienta diagnóstica. Sin embargo, primero debe determinarse su sensibilidad en la detección del patógeno en muestras biológicas y posteriormente validarlo con muestras clínicas, para poder utilizarlo de manera rutinaria en el diagnóstico de la aspergilosis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las micosis invasoras, entre ellas la AI, han emergido en los últimos años como problema de salud importante a nivel mundial, debido a su elevada morbimortalidad (Meersseman *et al.*, 2007; Klingspor *et al.*, 2009; Thornton, 2010; Lockner & Lass-Flörl, 2013); por lo que en las últimas décadas ha crecido el interés por buscar mejores

herramientas diagnósticas. El uso de la PCR es una alternativa muy útil, no sólo para el diagnóstico sino también para monitorear la respuesta a la terapia antifúngica o detectar resistencia a los antifúngicos (Barton, 2012). En la literatura se han descrito muchos ensayos de PCR para detectar marcadores moleculares específicos (fragmentos del DNA) de *A. fumigatus* (Tabla 1); sin embargo, su aplicación clínica es limitada porque aún no han sido validados ni estandarizados. Además, para utilizar la PCR como prueba diagnóstica de la AI, es necesario que sea específica y sensible para detectar al patógeno en muestras clínicas, lo que depende en gran medida del marcador molecular. Una limitante importante que impide utilizar los marcadores moleculares reportados en la literatura (Tabla 1), es la gran diversidad genética que existe entre los aislados de *A. fumigatus* procedentes de distintos orígenes geográficos (Duarte-Escalante *et al.*, 2009; Zavala-Ramírez, 2011), ya que es probable que los marcadores moleculares obtenidos a partir de aislados de otros países presenten resultados negativos cuando se utilicen con aislados procedentes de México. Con base en lo anterior, Zavala-Ramírez (2011) obtuvo un marcador denominado CSP₃₆₂, a partir del análisis de la región microsatélite CSP de aislados de *A. fumigatus* procedentes de distintos países, incluyendo México. El marcador CSP₃₆₂ discrimina *A. fumigatus* del resto de las especies patógenas del género *Aspergillus*, incluso de las especies que se encuentran dentro de la sección *Fumigati*, y por ello ha sido propuesto como marcador idóneo para el diagnóstico de la AI en nuestro país. Sin embargo, es necesario determinar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ para detectar al hongo en diferentes muestras biológicas, ya que a la fecha se desconoce cuál es la muestra biológica más adecuada para el diagnóstico de la AI por PCR (Hope *et al.*, 2005). Por lo que en este trabajo se plantea evaluar la sensibilidad del marcador en muestras biológicas no invasivas (suero, sangre total y esputo) inoculadas con *A. fumigatus*.

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el incremento en la incidencia de la AI representa un grave problema debido a su elevada tasa de mortalidad, la cual ha sido atribuida en gran parte a deficiencias en las pruebas diagnósticas utilizadas, lo que conlleva a un mal manejo terapéutico de los pacientes (Patterson, 2005; Meersseman *et al.*, 2007; Klingspor & Loeffler, 2009; Thornton, 2010; Lockner *et al.*, 2013). En México, el diagnóstico de la AI se realiza con base en el resultado de estudios de gabinete y de laboratorio, de éstos últimos destacan los microbiológicos (examen directo, cultivo) y los inmunológicos (detección de GM), que presentan sensibilidad y especificidad variables, lo que limita el establecimiento de un diagnóstico oportuno y certero (Patterson, 2005; Arza *et al.*, 2006). Para mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad en el diagnóstico, se ha propuesto la PCR como prueba alternativa o confirmatoria, utilizando marcadores moleculares de DNA específicos de *A. fumigatus* (Patterson, 2005; Arza *et al.*, 2006; Cuervo-Maldonado *et al.*, 2010). Aunque son muchos los marcadores moleculares que se han reportado en la literatura (Tabla 1), en México no está implementado su uso en los laboratorios clínicos, debido a que no han sido validados ni estandarizados para garantizar la reproducibilidad de los resultados a nivel interlaboratorio (Cuervo-Maldonado *et al.*, 2010; Frías De León *et al.*, 2014). Además, considerando que entre los aislados de *A. fumigatus* existe variabilidad genética con respecto al origen geográfico (Duarte-Escalante *et al.*, 2009), es indispensable utilizar marcadores obtenidos a partir de aislados autóctonos, como es el caso del marcador CSP₃₆₂ (Zavala-Ramírez, 2011). Este marcador es específico, ya que discrimina *A. fumigatus* de otras especies de hongos patógenos, dentro y fuera del género *Aspergillus*, además ha sido probado con DNA de aislados procedentes de México y otros países, por lo que el CSP₃₆₂ se ha propuesto como candidato para emplearse en el diagnóstico de la AI (Zavala-Ramírez, 2011). No obstante, se requiere evaluar la sensibilidad de este marcador para detectar *A. fumigatus* en muestras biológicas poco invasivas, con la finalidad de ofrecer una herramienta confiable en el diagnóstico de la AI a los

laboratorios intrahospitalarios de nuestro país, con lo que se espera disminuir la tasa de mortalidad asociada a esta micosis. Cabe mencionar que la importancia de evaluar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂, en lugar de evaluar cualquier otro marcador reportado en la literatura, se debe a que ninguno de éstos ha sido obtenido considerando los cambios taxonómicos que se han dado dentro del género *Aspergillus* (Samson, 2006), por lo que no discriminan especies dentro de las secciones, lo cual es indispensable para el tratamiento. El único reporte de marcadores obtenidos para diferenciar especies dentro de la sección *Fumigati* se basa en un análisis de secuencias *in silico* y no ha sido validado probando DNA de otros organismos causantes de infecciones invasoras y menos aún en muestras clínicas (Serrano *et al.*, 2011).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la sensibilidad del marcador molecular CSP₃₆₂ para identificar *A. fumigatus* en muestras biológicas (sangre total, suero y esputo).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ utilizando diferentes concentraciones de DNA de *A. fumigatus*.
2. Determinar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras de sangre total inoculadas con diferentes concentraciones conidios de *A. fumigatus*.
3. Determinar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras de esputo inoculadas con diferentes concentraciones de micelio de *A. fumigatus*.
4. Determinar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras de suero inoculadas con diferentes concentraciones de DNA de *A. fumigatus*.
5. Correlacionar los resultados de sensibilidad del PCR marcador CSP₃₆₂ con las UFC desarrolladas a partir de las diferentes concentraciones de conidios y micelio.

HIPÓTESIS

Si el marcador molecular CSP₃₆₂ es sensible entonces se detectará el DNA de *A. fumigatus* en muestras de sangre total, suero y esputo, aun cuando se encuentre en bajas concentraciones.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂, el trabajo se dividió en cuatro etapas, como se observa en la figura 2. En la primera etapa se cultivaron diferentes aislados de *A. fumigatus* para obtener el material fúngico (conidios y micelio) necesario tanto para la extracción de DNA como para la inoculación de muestras biológicas y la determinación de UFC.

En la segunda etapa, se extrajo el DNA de los aislados de *A. fumigatus*, se cuantificó por electroforesis, se ajustaron a 10 ng/ μ L. Durante esta etapa, también se prepararon diferentes diluciones de DNA, conidios y micelio, con las que se inocularon las muestras de suero, sangre total, y esputo, respectivamente. Al mismo tiempo, se sembraron cada una de las diluciones de conidios y micelio, y se determinó el número de UFC correspondientes. Se extrajo el DNA de las muestras biológicas inoculadas con material fúngico y se verificó su calidad por espectrofotometría.

En la tercera etapa, se realizaron las amplificaciones del marcador CSP₃₆₂ utilizando los DNAs obtenidos de los aislados de *A. fumigatus* y de las muestras biológicas inoculadas con diferentes concentraciones de DNA, conidios y micelio del hongo. Las amplificaciones se realizaron por triplicado y se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa para determinar la sensibilidad o límite de detección del marcador en cada tipo de muestra (DNA, sangre total, suero y esputo).

En la cuarta etapa, se correlacionaron los resultados de sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en las muestras de sangre total y esputo con las UFC determinadas para cada concentración de conidios y micelio utilizada en la inoculación de dichas muestras

biológicas.

La inoculación de las muestras biológicas se realizó de acuerdo con las guías protocolarias de la Iniciativa de PCR Europea de *Aspergillus* (Duval *et al.*, 2008). En éstas, se indica que el tipo y la cantidad del material fúngico a inocular en una muestra biológica deben ser conocidos de manera exacta para mantenerse tras la extracción de DNA. De tal manera que se puedan determinar los límites de detección (sensibilidad) en cada muestra biológica con el respectivo material fúngico. Los autores de la Iniciativa recomiendan el uso de conidios en sangre total, ya que a pesar de que no se encuentran esporas de *A. fumigatus* a nivel de torrente sanguíneo, es un método cuantificable de inoculación (Duval *et al.*, 2008; White *et al.*, 2010; Loeffler *et al.*, 2012). En el caso de la muestra de suero, se recomienda la utilización de DNA, debido a que se ha demostrado la presencia de éste en muestras de pacientes con AI (Costa *et al.*, 2001; White *et al.*, 2011; Barton, 2012). Las muestras respiratorias como el esputo y el LBA se han utilizado ampliamente, sobretodo el LBA donde se ha demostrado la presencia de alto contenido celular del hongo (hifas y conidios). El esputo es una muestra que se obtiene por métodos no invasivos y se ha utilizado para cultivos en pacientes con AI confirmada (Zmeili & Soubani, 2007; Barton, 2012; Shrimali *et al.*, 2013), por lo que en el presente trabajo se usó esputo y no LBA. Finalmente, entre recomendaciones de las guías protocolarias está la adición de pasos de rompimiento físico o enzimático del material fúngico, para aumentar la cantidad y calidad del DNA que se extrae (Duval *et al.*, 2008; Barton, 2012).

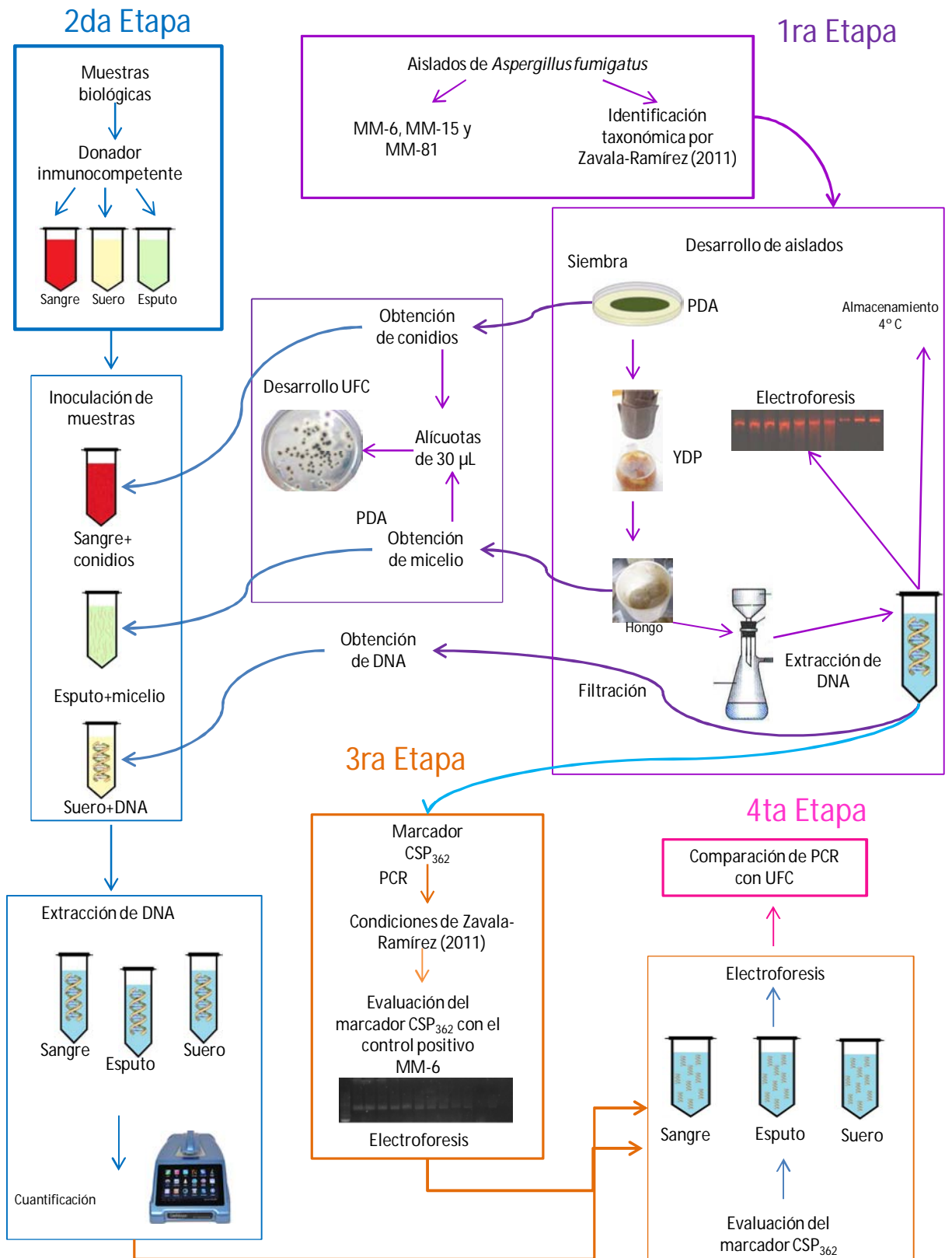


Figura 2. Diseño experimental para evaluar la sensibilidad del marcador CSP_{362} .

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *A. fumigatus*

Se utilizaron tres aislados clínicos (MM-6, MM-15 y MM-81) de *A. fumigatus*, obtenidos de la colección de cepas del Laboratorio de Micología Molecular, Unidad de Micología, Facultad de Medicina, UNAM. Estos aislados fueron ubicados taxonómicamente con base en sus características fenotípicas: macro y micromorfología, tamaño de conidios, tamaño de vesículas, termotolerancia y microscopia electrónica de barrido (Zavala-Ramírez, 2011).

Muestras biológicas

Las muestras de sangre total, suero y esputo empleadas en este estudio se obtuvieron de un donador humano inmunocompetente.

Cultivo de aislados de *A. fumigatus*

Los aislados de *A. fumigatus* se sembraron en tubos estériles de 15 mL conteniendo 4 mL de agar papa dextrosa (PDA) (Bioxón, MX) y se incubaron a 37 °C durante 4 días, o hasta observar crecimiento. Después se preparó una suspensión de conidios con 1 mL de PBST (amortiguador fosfato salino, pH 7.4, adicionado con tween 20 al 0.05%) y se inoculó en 50 mL de medio líquido YPD (1% extracto de levadura, 1% peptona de caseína, 2% dextrosa). El cultivo se incubó a 37 °C con agitación, hasta observar crecimiento micelial.

Extracción de DNA de aislados de *A. fumigatus*

La biomasa micelial de cada aislado se cosechó individualmente por filtración al vacío, utilizando papel filtro estéril. El micelio se lavó con agua milli-Q (Merck KGaA, HE, GE) para eliminar residuos del medio de cultivo y se secó con papel filtro. A partir del micelio seco de cada aislado, se extrajo el DNA utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, TX, EUA) de la siguiente manera: se depositaron 100 mg de masa micelial seca

en tubos de 1.5 mL que contenían 0.2 g de perlas de vidrio (400-455 μm de diámetro) estériles y se agregaron 400 μL del amortiguador AP1. Los tubos se procesaron en el equipo FastPrep (Thermo Savant Instruments, NY, EUA) durante 4 periodos de 40 s a 4.0 m/s con 2 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo (Zavala-Ramírez, 2011). A continuación, se adicionaron 4 μL de RNasa A (100 mg/mL), se agitó vigorosamente en vórtex (Daigger vortex Genie 2 Scientific Industries, Inc, NY, EUA) y se incubó por 10 min a 65 °C, durante este periodo se mezcló por inversión de 2 a 3 veces. Después de la incubación, se adicionaron 130 μL del amortiguador AP2, se colocaron los tubos en hielo durante 5 min y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a la columna lila QIAshredder mini spin colocada en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 14 000 rpm por 2 min. El sobrenadante (100 μL) obtenido en el tubo colector se transfirió a un tubo nuevo, se le adicionaron 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E y se mezcló rápidamente con ayuda de una micropipeta. Se transfirieron 650 μL de la mezcla anterior a la columna DNeasy mini spin colocada en un tubo colector y se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min, desechando el sobrenadante obtenido, este paso se repitió hasta acabar con el volumen. Posteriormente, se cambió el tubo colector y se realizaron dos lavados con 500 μL del amortiguador AW, en el primer lavado se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min y el segundo a 14 000 rpm por 2 min. Por último, para eluir el DNA, la columna se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL, adicionando 50 μL de agua milli-Q sobre la membrana, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. La concentración de los DNAs obtenidos se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, teñido con 0.6 μL de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000X (Biotium, CA, EUA), comparando contra diferentes concentraciones (20, 50 y 100 ng/ μL) de fago λ sin digerir (GIBCO BRL®, NY, EUA). Antes de cargar cada una de las muestras en el gel, se mezclaron con 2 μL de amortiguador de carga 6X (0,25% p/v azul de bromofenol, 0,25% p/v xilene cianol FF, 30% v/v glicerol). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM). La imagen del gel se capturó en un fotodocumentador GelDoc™ XR Imaging System (Bio-Rad, MX).

Los DNAs se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Inoculación de *A. fumigatus* en muestras biológicas

Inoculación de muestras de sangre total con conidios de *A. fumigatus*

Siete alícuotas de 500 μL de sangre total fueron inoculadas con 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} conidios/ μL , como se describe a continuación. A partir del cultivo del aislado MM-15 en PDA, se preparó una suspensión de conidios con 1 000 μL de solución salina isotónica-tween 20 al 0.05%, se tomaron 10 μL de esta suspensión y se colocaron sobre una cámara de Neubauer. El conteo de conidios (Figura 3) se realizó de acuerdo con los siguientes criterios:

1. Se contaron los conidios localizados en el cuadrante central
2. Se contaron los conidios localizados en las partes superior y a la izquierda
3. Los conidios que se encontraban en las partes inferior y a la derecha no se tomaron en cuenta

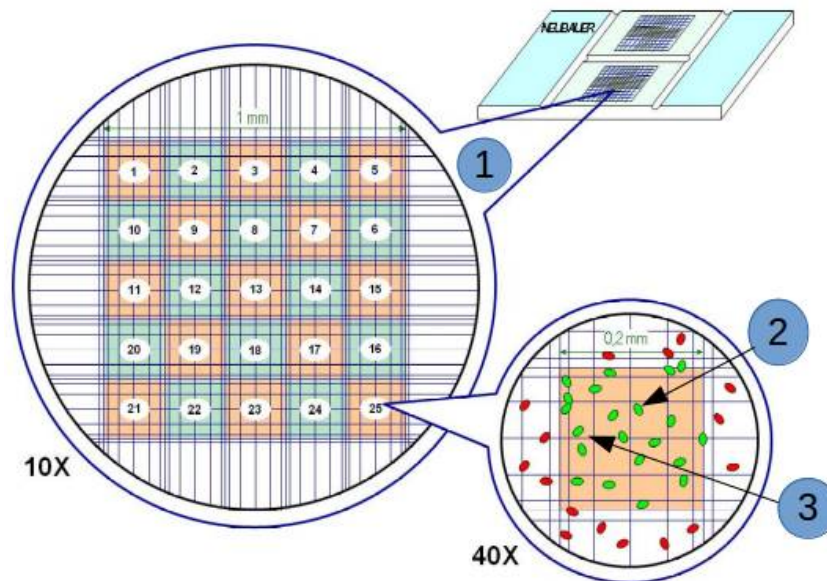


Figura 3. Esquema que ilustra los criterios considerados para el conteo de conidios en cámara de Neubauer. La imagen fue tomada de insilico.ehu.es y modificada por Villanueva Amador, G. S.

Una vez cuantificados los conidios, se ajustó a una concentración de 10^3 conidios/ μL y se realizaron diluciones seriadas con solución salina isotónica para obtener: 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} conidios/ μL . De cada concentración de conidios se tomaron 30 μL , se inocularon en cada alícuota de sangre total y se mezcló con ayuda de la micropipeta. Como testigo negativo, se utilizó una alícuota de 500 μL de sangre total sin el inóculo. Las muestras inoculadas y testigo se conservaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Inoculación de muestras de suero con DNA de *A. fumigatus*

Se tomaron nueve alícuotas de 500 μL de suero para inocularse con diferentes concentraciones de DNA obtenido del aislado MM-81 de *A. fumigatus*. Para ello, la concentración del DNA se ajustó a 10^3 ng/ μL y se realizaron diluciones seriadas con agua milli-Q para obtener: 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ng/ μL . Posteriormente se tomaron 30 μL de cada concentración de DNA y se adicionaron a las alícuotas de suero, agitando vigorosamente. Como testigo negativo, se utilizó una alícuota de 500 μL de suero sin el inóculo. Las muestras inoculadas y testigo se conservaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Inoculación de muestras de esputo con micelio de *A. fumigatus*

Siete alícuotas de 500 μL de esputo fueron inoculadas con diferentes concentraciones de micelio obtenido, como se describió con anterioridad, del aislado MM-15 de *A. fumigatus*. A 100 mg de micelio se le agregó 1 mL de solución salina isotónica, se mezcló vigorosamente y se transfirió a un tubo de 2 mL conteniendo 0.2 g de perlas de vidrio estériles (400 a 455 μm de diámetro lavadas previamente con ácido clorhídrico), para posteriormente disgregar el micelio en el FastPrep (Thermo Savant Instruments) durante 1 periodo de 40 s a 4.0 m/s. Para uniformizar unidades, los 100 mg/mL se expresaron como 10^5 ng/ μL . A partir de esta concentración de micelio, se realizaron diluciones seriadas con agua milli-Q para obtener 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} ng de micelio/ μL . Posteriormente, se tomaron 30 μL de cada dilución para inocular las alícuotas de 500 μL de esputo, agitando vigorosamente. Como testigo negativo, se

utilizó una alícuota de 500 μL de esputo sin el inóculo. Las muestras inoculadas y testigo se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC)

Se tomaron 30 μL de cada una de las concentraciones de conidios y micelio, empleadas para la inoculación de sangre total y esputo, respectivamente, y se sembraron en PDA por el método de extendido en placa. Las placas se sembraron por triplicado, se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 días y se contaron las UFC desarrolladas. Se calculó el promedio de UFC de las tres placas sembradas por cada concentración de conidios y micelio, así como la desviación estándar (σ).

Extracción de DNA de muestras biológicas

El DNA de las muestras de sangre total, suero y esputo inoculadas experimentalmente con *A. fumigatus*, así como de las muestras testigo, se extrajo utilizando el DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen), de acuerdo con el siguiente procedimiento: se tomaron 150 μL de muestra (sangre total, suero o esputo) y se colocaron en tubos de 2 mL conteniendo 0.2 g de perlas de vidrio estériles y se agregaron 20 μL de proteinasa K (20 mg/mL). Las muestras se procesaron en el FastPrep (Thermo Savant Instruments) por 4 periodos de 40 s a 4.0 m/s con 2 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Posteriormente, se añadieron 200 μL de amortiguador AL, se mezcló vigorosamente con ayuda de la micropipeta para lograr una solución homogénea y se incubó a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Después del periodo de incubación, se adicionaron 200 μL de etanol (96-100%) a cada muestra y se mezcló hasta obtener una solución homogénea. Las mezclas se vertieron a una columna spin de 2 mL, colocada dentro de un tubo colector y se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min. Se desechó el filtrado y el tubo colector, las columnas spin se colocaron dentro de tubos colectores nuevos y se les agregaron 500 μL del amortiguador AW1, se centrifugó durante 1 min a 8 000 rpm, para después desechar el filtrado y el tubo colector. Las columnas spin se pasaron a tubos colectores nuevos, se les añadieron 500 μL de amortiguador AW2 y se centrifugaron por 3 min a 14 000 rpm,

para secar la membrana. Por último, el filtrado y el tubo colector se desecharon y la columna spin se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL, evitando el contacto con el etanol del filtrado. Se agregaron 200 µL de agua milli-Q en el centro de la membrana de la columna spin, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 min para eluir el DNA. Este último paso se repitió agregando 200 µL de agua milli-Q a la membrana y centrifugando a 8 000 rpm durante 1 min, utilizando el mismo tubo recolector. Todos los DNAs obtenidos se homogeneizaron en vortex (Daigger vortex Genie 2 Scientific Industries) y se centrifugaron por 30 s a 500 rpm. La calidad de los DNAs obtenidos se determinó por espectrofotometría (DS-11 spectrophotometer, DeNovix Inc., DE, EUA) mediante el cociente de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm.

Evaluación de la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en DNA *A. fumigatus*

Para determinar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras de DNA de *A. fumigatus*, se amplificaron diferentes concentraciones (3×10^1 , 2×10^1 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ng/µL) del DNA del aislado MM-6, con los oligonucleótidos CSP₃₆₂-F (5'-GACGAGGTATGCGTAGCCCGC-3') y CSP₃₆₂-R (5'-CAGTGGGCACGACCACTCGAG-3'), que amplifican un fragmento de 362 bp (Zavala-Ramírez, 2011). La amplificación de las diferentes concentraciones de DNA se realizó en un termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) con las siguientes condiciones: 100 pmol/µL de cada oligonucleótido (SIGMA-ALDRICH, Texas, EUA), 1.2 mM de MgCl₂, 1x de amortiguador con KCl (Fermentas Life Sciences, EUA), 200 µM de dNTPs (Fermentas Life Sciences), 1 U *Taq* DNA polimerasa recombinante (Fermentas Life Sciences). Como testigo positivo se usaron 10 ng/µL de DNA del aislado MM-6 y como testigo negativo se utilizó 1 µL de agua milli-Q. El programa de amplificación consistió de un ciclo de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 1 min a 72 °C, con una extensión final de 5 min a 72 °C. La amplificación de cada concentración de DNA se realizó por triplicado. Los amplicones se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con 0.6 µL de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000X (Biotium). El corrimiento electroforético se

llevó a cabo como se describió anteriormente. Como marcador de tamaño molecular, se usó el GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas Life Sciences).

Evaluación de la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras biológicas inoculadas con *A. fumigatus*

Para evaluar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras biológicas, se amplificaron los DNAs obtenidos a partir de cada muestra biológica inoculada con *A. fumigatus* (Tabla 2). Las amplificaciones y la visualización de los amplicones se llevaron a cabo siguiendo las condiciones descritas anteriormente.

Tabla 2. Muestras biológicas inoculadas con *A. fumigatus* para la evaluación, por PCR, de la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂.

| Muestra biológica | Aislado | Concentración del inóculo | Testigo negativo |
|--------------------------|----------------|---|--------------------------|
| Sangre total | MM-15 | 10 ² , 10 ¹ , 10 ⁰ , 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ conidios/μL | Sangre total sin inóculo |
| Suero | MM-81 | 10 ² , 10 ¹ , 10 ⁰ , 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ ng DNA/μL | Suero sin inóculo |
| Espuito | MM-15 | 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² , 10 ¹ , 10 ⁰ , 10 ⁻¹ ng micelio/μL | Espuito sin inóculo |

Correlación de la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ determinada por PCR con las UFC de *A. fumigatus*

Dado que en la literatura la sensibilidad de muchos marcadores moleculares se reporta en UFC (Skladny *et al.*, 1999; Loeffler *et al.*, 2000; 2001; 2002; Buchheidt *et al.*, 2001; Halliday *et al.*, 2005; White *et al.*, 2006), se hizo la correlación entre la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ obtenida por PCR en muestras de sangre total y espuito inoculadas con diferentes concentraciones de conidios y micelio, respectivamente, y los valores de UFC obtenidos de cada concentración de inóculo.

RESULTADOS

Extracción de DNA de aislados de *A. fumigatus*

La concentración de los DNAs de los aislados de *A. fumigatus* (MM-6, MM-15 y MM-81) se obtuvo en el rango de 50-100 ng/ μ L (Tabla 5), la cual fue una cantidad adecuada para llevar a cabo los ensayos de PCR.

Tabla 3. Concentración de DNA obtenida de aislados de *Aspergillus fumigatus*.

| Aislado | Concentración |
|---------|-----------------|
| MM-6 | 50 ng/ μ L |
| MM-15 | 70 ng/ μ L |
| MM-81 | 100 ng/ μ L |

Asimismo, se pudo comprobar por electroforesis que la calidad de los DNAs fue adecuada, ya que se observó una sola banda correspondiente a un DNA íntegro y sin residuos de RNA o proteínas (Figura 4).

Después de determinar la concentración de los DNAs y verificar la calidad de los mismos, se realizaron las diluciones pertinentes para obtener las concentraciones requeridas para los ensayos de PCR.

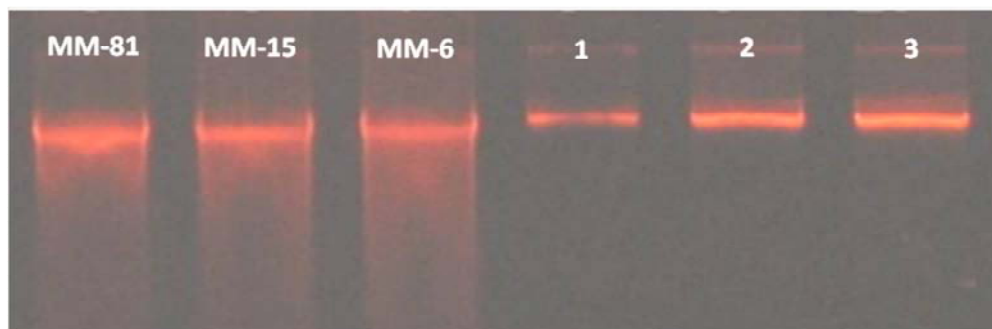


Figura 4. DNA obtenido de aislados de *Aspergillus fumigatus*. Los carriles finales (1-3) corresponden a 20, 50 y 100 ng/ μ L del fago λ (GIBCO BRL[®]), respectivamente.

Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC)

UFC desarrolladas a partir de las diferentes concentraciones de conidios de *A. fumigatus*

En el número de UFC desarrolladas a partir de las diferentes concentraciones de conidios (Figura 5), utilizadas como inóculo en las muestras de sangre total, se observó una disminución escalonada, de manera paralela a la concentración de conidios, como se reporta en la tabla 3. La desviación estándar del conteo de UFC fue mayor en el conteo de las UFC desarrolladas a partir de las concentraciones más altas de conidios.

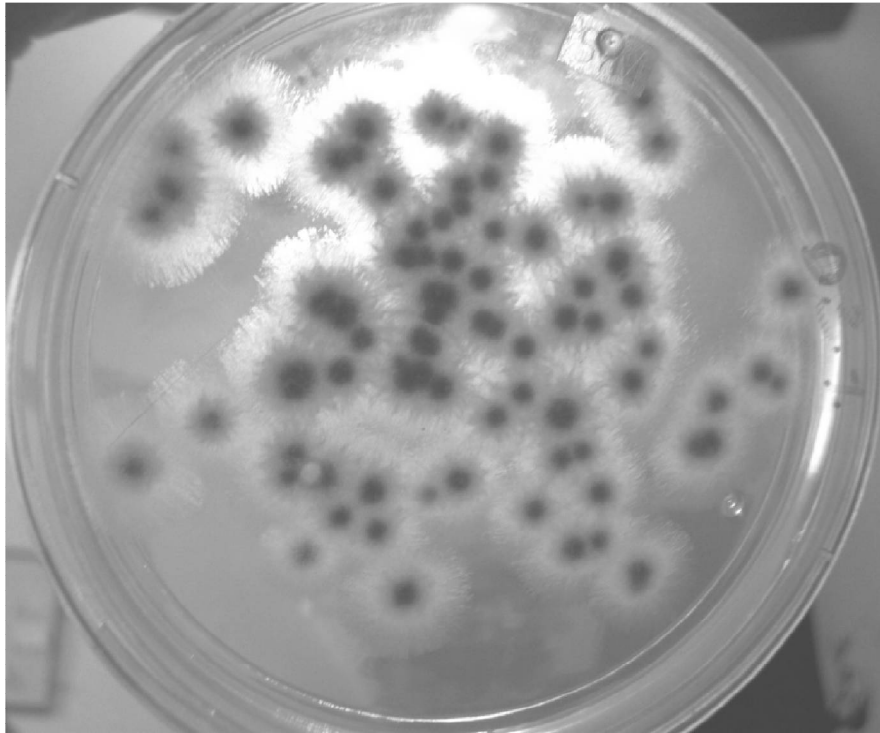


Figura 5. Unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas en PDA, a 28 °C, a partir de la concentración de 10^{-4} conidios/ μL de *Aspergillus fumigatus*.

Tabla 4. Número de UFC desarrolladas en PDA a partir de las diferentes concentraciones de conidios de *Aspergillus fumigatus* inoculadas en muestras de sangre total.

| Conidios/ μL | UFC/ μL promedio $\pm \sigma$ |
|-------------------------|--|
| 10^2 | 24 ± 55.64 |
| 10^1 | 18 ± 155.70 |
| 10^0 | 6 ± 31.48 |
| 10^{-1} | 5 ± 49.30 |
| 10^{-2} | 2 ± 19.39 |
| 10^{-3} | 1 ± 5.71 |
| 10^{-4} | 1 ± 16.049 |

σ : desviación estándar

UFC desarrolladas a partir de las diferentes concentraciones de micelio de *A. fumigatus*

En las UFC desarrolladas a partir de cada concentración de micelio empleado con las muestras de esputo se observó una reducción gradual y paralela con la disminución de la concentración de micelio (Figura 6), excepto entre las concentraciones 10^3 y 10^2 , como se muestra en la tabla 4. La desviación estándar fue alta en las dos concentraciones mayores (10^5 y 10^4).

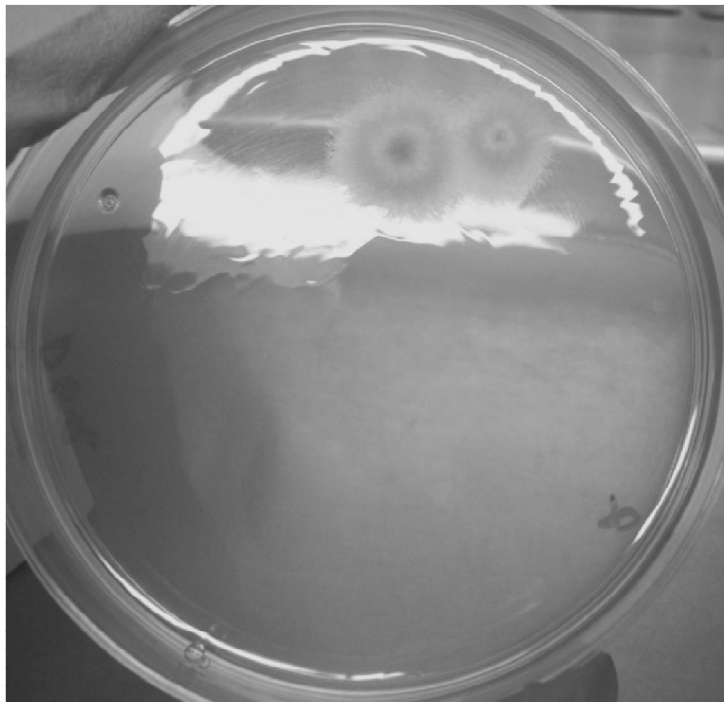


Figura 6. Unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas, en PDA a 28 °C, a partir de 10^0 ng/ μ L de micelio de *A. fumigatus*.

Tabla 5. Número de UFC desarrolladas en PDA a partir de las diferentes concentraciones de micelio de *Aspergillus fumigatus* inoculadas en las muestras de esputo.

| Micelio ng/ μ L | UFC/ μ L promedio \pm σ |
|---------------------|--------------------------------------|
| 10^5 | 13 \pm 129.38 |
| 10^4 | 8 \pm 80.68 |
| 10^3 | 4 \pm 10.42 |
| 10^2 | 5 \pm 8.06 |
| 10^1 | 2 \pm 5.79 |
| 10^0 | 1 \pm 0.5 |
| 10^{-1} | 1 \pm 0 |

σ : desviación estándar

Extracción de DNA de muestras biológicas

En este caso, la concentración de los DNAs no fue determinada, solo fue necesario garantizar una buena calidad del material genético para la amplificación. La calidad de los DNAs obtenidos a partir de las muestras de sangre total, suero y esputo inoculadas con *A. fumigatus*, resultó adecuada para llevar a cabo los ensayos de PCR. Los cocientes de lectura de absorbancia (A260/280) estuvieron en el rango de 1.5-2.0 (Tablas 6-8), indicando la ausencia de contaminación del DNA con proteínas o RNA.

Tabla 6. Calidad del DNA total obtenido de las muestras de sangre total inoculadas con diferentes concentraciones de conidios de *Aspergillus fumigatus*.

| Conidios/ μ L | A 260/A 280 |
|---------------------------|-------------|
| 10^2 | 1.49 |
| 10^1 | 1.45 |
| 10^0 | 1.42 |
| 10^{-1} | 1.29 |
| 10^{-2} | 1.63 |
| 10^{-3} | 1.46 |
| 10^{-4} | 1.74 |
| Sangre total sin inocular | 1.38 |

A 260/A 280: Cociente de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm.

Tabla 7. Calidad del DNA total obtenido a partir de muestras de suero inoculadas con diferentes concentraciones de DNA de *Aspergillus fumigatus*.

| DNA (ng/μL) | A 260/A 280 |
|-----------------------------------|--------------------|
| 10^2 | 1.88 |
| 10^1 | 2.22 |
| 10^0 | 2.69 |
| 10^{-1} | 2.12 |
| 10^{-2} | 3.53 |
| 10^{-3} | 2.96 |
| 10^{-4} | 2.16 |
| 10^{-5} | 2.49 |
| 10^{-6} | 1.55 |
| Suero sin inocular | 2.46 |

A 260/A 280: Cociente de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm.

Tabla 8. Calidad del DNA total obtenido a partir de muestras de esputo inoculadas con diferentes concentraciones de micelio de *Aspergillus fumigatus*.

| Micelio (ng/μL) | A 260/A 280 |
|---------------------------------------|--------------------|
| 10^5 | 1.87 |
| 10^4 | 1.865 |
| 10^3 | 1.87 |
| 10^2 | 1.9 |
| 10^1 | 1.86 |
| 10^0 | 1.865 |
| 10^{-1} | 1.84 |
| Esputo sin inocular | 1.88 |

A 260/A 280: Cociente de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm.

Evaluación de la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en DNA de *A. fumigatus*

Se amplificaron, por PCR, diferentes concentraciones de DNA del aislado de *A. fumigatus* (MM-6). En todas las concentraciones probadas, desde 3×10^1 hasta 10^{-6} ng/ μ L se observó el amplicón esperado de 362 bp en la electroforesis, además se visualizó una disminución escalonada en la intensidad de las bandas, como se muestra en la figura 7. Por lo que la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ fue de 10^{-6} ng/ μ L.

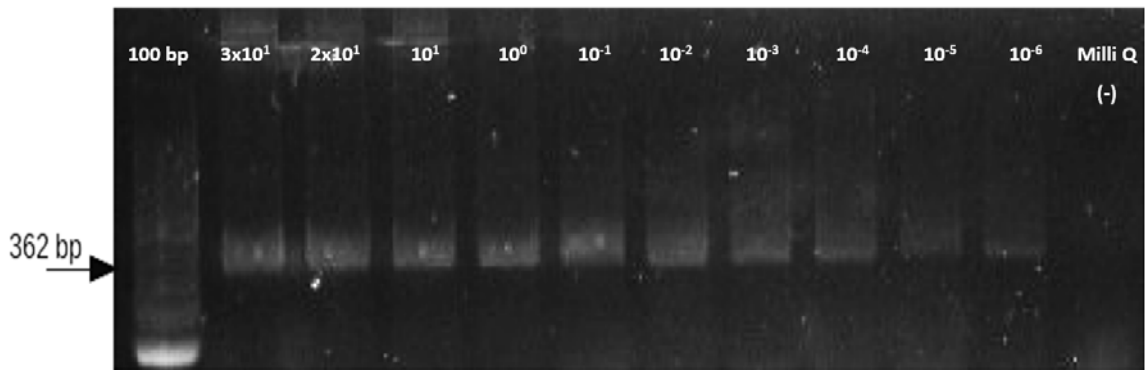


Figura 7. Amplificación variando la concentración de templado de DNA del aislado MM-6 de *Aspergillus fumigatus* con los oligonucleótidos CSP₃₆₂-F y CSP₃₆₂-R. 100 bp: marcador de tamaño molecular. La concentración mínima detectable con el marcador CSP₃₆₂ fue de 10^{-6} ng/ μ L.

Evaluación de la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras biológicas inoculadas con *A. fumigatus*

Sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en sangre total inoculada con conidios de *A. fumigatus*

Cuando se amplificaron los DNAs obtenidos de las muestras de sangre total inoculadas con conidios del aislado MM-15 de *A. fumigatus*, se pudo observar nítidamente, por electroforesis, la banda esperada de 362 bp desde la concentración de 10² hasta a 10⁻³ conidios/μL; sin embargo, en la concentración 10⁻³ también se observa aunque muy tenue (Figura 8). Por lo que la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en sangre total fue 10⁻³ conidios/μL. Este resultado fue reproducible al realizar por triplicado el ensayo y no se registró, en ninguno de los casos, inhibición de la PCR por algún componente de la sangre.

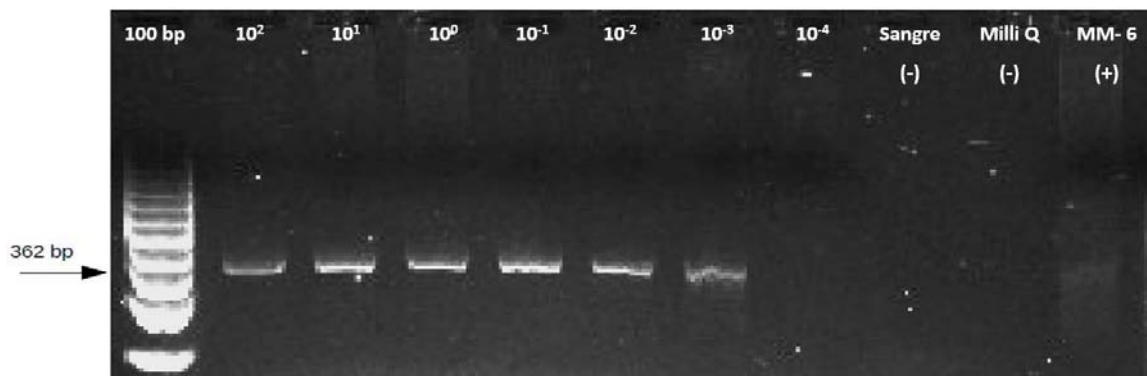


Figura 8. Amplificación del DNA obtenido de sangre total inoculada con diferentes concentraciones de conidios de *Aspergillus fumigatus*, utilizando los oligonucleótidos CSP₃₆₂-F y CSP₃₆₂-R. 100 bp: marcador de tamaño molecular. Testigos negativos: sangre (-) y milli-Q. Testigo positivo: MM-6. La concentración mínima detectable por electroforesis con el marcador CSP₃₆₂ fue 10⁻³ conidios/μL.

Sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en suero inoculado con DNA de *A. fumigatus*

Los amplicones de 362 bp obtenidos al amplificar los DNAs obtenidos de suero, inoculado con diferentes concentraciones de DNA de *A. fumigatus*, fueron observados nítidamente desde 10^2 hasta 10^{-5} ng/ μ L; mientras que en la concentración 10^{-6} ng/ μ L se puede visualizar una banda más tenue (Figura 9). Por lo que la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras de suero resultó de 10^{-5} ng/ μ L de DNA. Es importante destacar que en esta concentración fue donde se alcanzó a observar el amplicón por electroforesis; sin embargo, puede ser que a menor concentración todavía haya amplificación no detectable por electroforesis.

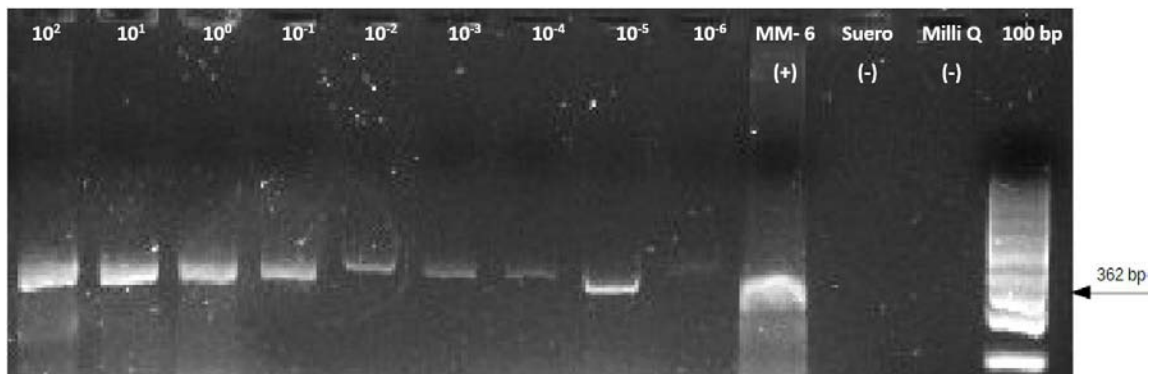


Figura 9. Amplificación, con los oligonucleótidos CSP₃₆₂-F y CSP₃₆₂-R, del DNA extraído de suero inoculado con diferentes concentraciones de DNA de *Aspergillus fumigatus*. Testigo positivo: MM-6. Testigos negativos: suero (-) y milli-Q. 100 bp: marcador de tamaño molecular. La concentración mínima detectable del marcador CSP₃₆₂ en muestras de suero mediante electroforesis es fiable hasta 10^{-5} ng/ μ L.

Sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en esputo inoculado con micelio de *A. fumigatus*

Al amplificar el DNA obtenido de las muestras de esputo inoculadas con diferentes concentraciones de micelio, se observó claramente el amplicón esperado de 362 bp en las muestras inoculadas 10^5 , 10^4 y 10^3 ng/ μ L de micelio. Sin embargo, en las muestras inoculadas con 10^2 a 10^{-1} ng/ μ L de micelio se observó un amplicón con menor intensidad (Figura 10). Por lo que la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ en muestras de esputo es de 10^3 ng/ μ L de micelio.

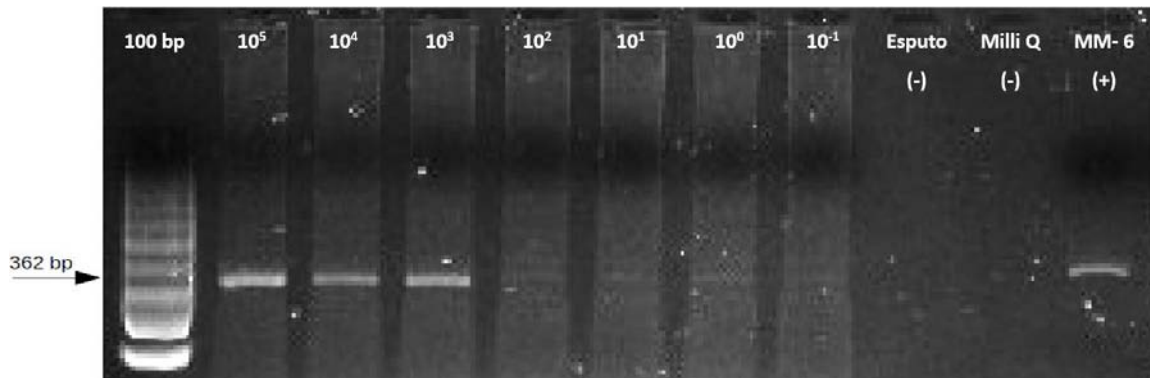


Figura 10. Amplificación, con los oligonucleótidos CSP₃₆₂-F y CSP₃₆₂-R, del DNA extraído de esputo inoculado con diferentes concentraciones de micelio de *Aspergillus fumigatus*. 100 bp: marcador de tamaño molecular. Testigos negativos: esputo (-) y milli-Q. Testigo positivo: MM-6. El límite de detección del marcador CSP₃₆₂ en muestras de esputo mediante electroforesis es fiable hasta 10^3 ng/ μ L.

Correlación de la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ determinada por PCR con las UFC de *A. fumigatus*

La correlación de los resultados obtenidos de la amplificación del DNA de las muestras de sangre total y esputo inoculadas con diferentes concentraciones de conidios y micelio de *A. fumigatus* y las UFC obtenidas a partir de las mismas concentraciones de inóculo reveló que en sangre total la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ corresponde a 10⁻³ conidios/μL equivalente a 1 UFC/μL de *A. fumigatus* (Tabla 9), mientras que en muestras de esputo la sensibilidad fue de 10³ ng/μL de micelio equivalentes a 4 UFC/μL del hongo (Tabla 10).

Tabla 9. Correlación entre los resultados de la PCR en muestras de sangre total inoculadas con diferentes concentraciones de conidios de *Aspergillus fumigatus* y las UFC.

| Conidios/μL | UFC/μL | PCR |
|------------------|--------|-----|
| 10 ² | 24 | + |
| 10 ¹ | 18 | + |
| 10 ⁰ | 6 | + |
| 10 ⁻¹ | 5 | + |
| 10 ⁻² | 2 | + |
| 10 ⁻³ | 1 | + |
| 10 ⁻⁴ | 1 | - |

(+): Presencia del fragmento de 362 bp, (-): ausencia del fragmento de 362 bp de la observación de la banda de 362 bp en electroforesis.

Tabla 10. Correlación entre los resultados de la PCR en muestras de esputo inoculadas con diferentes concentraciones de micelio de *Aspergillus fumigatus* y las UFC.

| Micelio ng/μL | UFC/μL | PCR |
|-------------------------------------|------------------------------|------------|
| 10^5 | 13 | + |
| 10^4 | 8 | + |
| 10^3 | 4 | + |
| 10^2 | 2 | + |
| 10^1 | 1 | + |
| 10^0 | 1 | + |
| 10^{-1} | 1 | + |

(+): Presencia del fragmento de 362 bp, (-): ausencia del fragmento de 362 bp de la observación de la banda de 362 bp en electroforesis.

DISCUSIÓN

Dentro de la sección *Fumigati*, se encuentran las especies *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *N. pseudofischeri* y *N. udagawae*, las cuales han sido reportadas como patógenas en casos severos de AI (Balajee *et al.*, 2005; Guarro *et al.*, 2003), con una prevalencia de hasta el 10% (Pappas *et al.* 2010). Estas especies pueden confundirse con *A. fumigatus*, ya que morfológicamente son indistinguibles, pero resistentes a los antifúngicos azólicos o anfotericina B, mientras que *A. fumigatus* es generalmente susceptible a los antifúngicos disponibles para el tratamiento (Guarro *et al.*, 2003; Alcázar-Fuoli *et al.*, 2008), por lo que la caracterización molecular es esencial para la identificación correcta de las especies dentro de la sección *Fumigati*. Al respecto, en la literatura se han reportado diversos marcadores moleculares para identificar *Aspergillus* a nivel de género o a nivel de sección (Tabla 1); sin embargo, solo existen dos reportes sobre marcadores que diferencian entre las especies pertenecientes a la sección *Fumigati* (Zavala-Ramírez, 2011; Serrano *et al.*, 2011). Los marcadores reportados por Serrano *et al.* (2011) fueron obtenidos *in silico* a partir del análisis del polimorfismo de secuencias parciales de los genes β tub (β tubulina) y rodA (rodlet A) depositadas en las bases de datos GenBank y EMBL-Bank, por lo que una de sus principal limitantes es que la especificidad depende de la calidad de las secuencias. Mientras que el marcador CSP₃₆₂, reportado por Zavala-Ramírez (2011) se obtuvo del análisis del polimorfismo de la región microsatélite del gen CSP de *A. fumigatus* y además consideró la variabilidad genética asociada al origen geográfico, ya que en su estudio involucró aislados de *A. fumigatus* procedentes de distintos países. Cabe destacar que ambos marcadores fueron propuestos por sus autores como herramienta diagnóstica, pero ninguno ha sido evaluado en la detección del patógeno en muestras biológicas para su aplicación rutinaria en el diagnóstico. Por lo que en este trabajo se planteó evaluar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂, utilizando DNA de *A. fumigatus*, así como DNA obtenido de muestras de sangre total, suero y esputo inoculadas experimentalmente con conidios, DNA y micelio del hongo, respectivamente. Cuando se amplificaron las diferentes

concentraciones de DNA de *A. fumigatus*, se observó una sensibilidad de 1 fg/μL de DNA, esta sensibilidad fue mayor que la reportada por Tang (1993), quien únicamente logró amplificar hasta 5 pg de DNA de *A. fumigatus* por PCR simplex. Incluso, la sensibilidad del CSP₃₆₂ resultó mayor que la del ensayo de PCR anidada donde amplifican hasta 25 fg de DNA (Hayette *et al.*, 2001). Cabe destacar que este último ensayo es uno de los más sensibles que se han reportado para *A. fumigatus* (Tabla 1).

La amplificación del DNA obtenido de muestras de sangre total inoculadas con diferentes concentraciones de conidios de *A. fumigatus*, mostró que la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ es de 10⁻³ conidios/μL, equivalente a 1 UFC/μL. En la literatura, solo se encontró un ensayo similar, donde se inocularon experimentalmente muestras de sangre total con conidios del hongo y obtuvieron el mismo resultado pero en un ensayo de qPCR amplificando una región de un gen multicopia (White *et al.*, 2006). Esto nos indica que el CSP₃₆₂ tiene la suficiente sensibilidad para detectar al hongo en muestras de sangre total. Un aspecto muy importante es que durante la PCR no se observó inhibición de la DNA polimerasa por el grupo hemo, como se ha reportado en la literatura al manipular muestras de sangre total (Poma *et al.*, 2012). Esto nos revela, indirectamente, que el método empleado para la extracción del DNA de las muestras biológicas fue adecuado, ya el DNA se obtuvo libre de otros componentes de la sangre que pudieran contaminar el DNA e impedir la amplificación.

En suero, la sensibilidad fue de 1 fg/μL de DNA de *A. fumigatus*. Esta sensibilidad es mayor en comparación con la sensibilidad de los marcadores encontrados en la literatura, donde reportan entre 30 y <2.5 fg de DNA obtenido de muestras de pacientes en quienes se desconoce la carga fúngica (Costa *et al.*, 2002; Pham *et al.*, 2003; Millon *et al.*, 2005; 2011; Gómez-López *et al.*, 2006). Cabe señalar que los marcadores con los que se hace esta comparación son detectados por qPCR, lo que nos demuestra que el CSP₃₆₂ es altamente sensible.

En esputo, la sensibilidad fue de 10⁻¹ ng/μL de micelio, equivalente a 1 UFC/μL. Este resultado no pudo compararse con trabajos reportados en la literatura, ya que ordinariamente el esputo no es utilizado para el diagnóstico de la AI. Sin embargo,

Stevens *et al.* (2000) determinaron que los cultivos de esputo, positivos para *Aspergillus*, tienen impacto según los grupos de riesgo para desarrollar aspergilosis pulmonar invasora. Por ejemplo, en pacientes de alto riesgo (pacientes sometidos a trasplante de médula ósea o los pacientes hematológicos), el cultivo se interpreta como infección, mientras que en pacientes de menor riesgo (pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido o con tratamiento esteroideo), el cultivo positivo se interpreta como colonización. Por lo que consideramos que en estos casos, la PCR en muestras de esputo puede ser de utilidad para reemplazar a los cultivos, ya que éstos son más susceptibles de contaminación asociada a los conidios de *A. fumigatus* encontrados en el ambiente.

Por otro lado, comparando la sensibilidad del marcador con respecto al tipo de muestra biológica utilizada, observamos que en sangre total es mayor sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ que en esputo; sin embargo, esto puede no ser un resultado contundente puesto que las desviaciones estándar en la determinación de las UFC fueron altas, particularmente en las concentraciones mayores de inóculo. Esta dispersión de los datos nos hace sugerir, para ensayos futuros, la cuantificación de estructuras fúngicas para la inoculación experimental de muestras sea mediante métodos ópticos, como la turbidimetría, con el fin de tener uniformidad del inóculo. En cuanto a las muestras de suero y DNA puro del hongo, la sensibilidad del marcador fue la misma (1 fg/μL de DNA).

Finalmente, es necesario destacar que, aunque se pretende en algún momento proporcionar el marcador CSP₃₆₂ a los laboratorios clínicos para el diagnóstico de la AI, el presente trabajo sólo representa el inicio de la validación del método, ya que existen muchas limitaciones que, incluso a nivel internacional, aún no han sido superadas. Por ejemplo, la procedencia del DNA en muestras de sangre y derivados se desconoce, pero se considera que su presencia está asociada a procesos inmunológicos del hospedero, a la terapia antifúngica, a la autólisis y posible crecimiento exponencial del hongo (White *et al.*, 2011; Barton, 2012). En el caso de muestras respiratorias (broncoaspirado, esputo y LBA), se conoce la presencia de micelio y fragmentos de hifas; sin embargo,

este tipo de muestras sólo tiene importancia clínica en pacientes con AI confirmada (Stevens *et al.*, 2000). Por lo que, sería conveniente que en futuros ensayos, todas las muestras biológicas se inoculen con los tres componentes fúngicos (DNA, conidios y micelio), con el fin de garantizar que el hongo podrá ser detectado con el marcador CSP₃₆₂.

CONCLUSIONES

El marcador CSP₃₆₂ es altamente sensible, ya que su límite de detección es de 10⁻⁵ ng/μL de DNA de *A. fumigatus*; 10⁻³ conidios/μL o 1 UFC/μL en sangre total; 10⁻⁵ ng/μL en suero, y 10³ ng/μL de micelio o 4 UFC/μL en esputo. La sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ resultó similar o mayor que la sensibilidad de otros marcadores moleculares reportados en la literatura, incluyendo aquellos que son detectados mediante técnicas teóricamente más sensibles, como la PCR anidada o en tiempo real.

PERSPECTIVAS

La alta sensibilidad del marcador CSP₃₆₂ encontrada en este estudio, aunada a su especificidad reportada, nos impulsa a continuar la validación del marcador con DNA de especímenes clínicos procedentes de pacientes inmunocompetentes con AI confirmada y de pacientes con sospecha de enfermedad.

Además, con el fin de incrementar la sensibilidad del marcador CSP₃₆₂, y a su vez su potencial como marcador en el diagnóstico de la AI, se plantea cambiar la modalidad de PCR simplex a PCR anidada o qPCR.

Asimismo, por el gran potencial de identificación y detección de DNA de *A. fumigatus*, se considera que el marcador CSP₃₆₂ podría proponerse como marcador en el proyecto Código de Barras Genético aplicable a los hongos, por lo que se verificará la especificidad del marcador CSP₃₆₂ en bases de datos especializados (<http://www.aspergillusgenome.org/>; <http://fungidb.org/fungidb/>).

GLOSARIO

Clasificación de linajes: es el proceso mediante el cual, la separación de dos especies, la ancestría de cada gene converge en el total de la filogenia de las especies.

Especie biológica: población cuyos miembros son capaces de reproducirse naturalmente, ya que pertenecen a la misma especie. Requiere que los miembros de la misma especie sean sexualmente fértiles y cuya progenie de las cruces sean viables y fértiles. En hongos, sólo puede aplicarse a las especies heterotálicas.

Especie críptica: es una especie en cualquiera de sus acepciones no morfológicas posibles de este término, pero que a nivel práctico son indistinguibles por su apariencia, que antes de acudir a los marcadores moleculares, se suelen considerar como una sola especie y en realidad no se tiene la seguridad de su posición taxonómica sea correcta. A pesar de ser identificadas por un especialista como una misma especie por sus caracteres morfológicos o químicos, son biológica y genéticamente distintas puesto que pertenecen a linajes filogenéticos independientes.

Especie filogenética: corresponde a un grupo monofilético compuesto de la agrupación más pequeña derivado de organismos individuales dentro del cual hay un patrón de ancestría y de descendencia. Evita la subjetividad de determinar los límites de especies apoyándose en la concordancia de más de un gen por genealogía, basado en la coalescencia y clasificación de linajes.

Especie morfológica o fenotípica: se basa en la similitud de caracteres morfológicos observables o usualmente fisiológicos. Puede incluir tamaño de espora, forma o características de cultivo para los hongos.

Especificidad: en el presente trabajo se denota como especificidad analítica, la cual se

refiere a la capacidad de un ensayo para medir un organismo o sustancia particular sobre otras en una muestra biológica. Los dichos organismos o sustancias pueden ser "similares" pero son distintas a la que busca el ensayo. Por lo que tiene la capacidad de reconocer e identificar siempre al mismo organismo.

Morbilidad: proporción de personas que enferman en un sitio y tiempo determinado.

Mortalidad: número de muertos en una población especificada y en un periodo de tiempo determinado.

Sensibilidad: en el presente trabajo se denota como sensibilidad analítica, la cual representa la mínima cantidad de sustancia (por ej. DNA) que puede medirse en una muestra biológica de forma precisa por un ensayo (por ej. PCR). Se entiende como sinónimo de límite de detección o mínima concentración detectable.

REFERENCIAS

1. Abarca, M. L., 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17:S79-S84.
2. Alcazar-Fuoli, L., E. Mellado, A. Alastruey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella y J. L. Rodríguez-Tudela, 2008. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(4):1244-51.
3. Alexander, B. D., P. B. Smith, R. D. Davis, J. R. Perfect y B. Reller, 2010. The (1, 3) β -glucan test as an aid to early diagnostics of invasive fungal infections following lung transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(11):4083-4088.
4. Arza-Fernández, S., J. J. Coria-Lorenzo, E. Rosales-Uribe y D. Gómez-Barreto, 2006. Aspergilosis invasiva en el paciente pediátrico oncológico: revisión del tema a propósito de un caso. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 19(75):80-92.
5. Balajee, S. A. y K. A. Marr, 2006. Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. *Future Microbiology*. 1(4):435-445.
6. Balajee, S. A., J. L. Gribskov, E. Hanley, D. Nickle y K. A. Marr, 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic cell*. 4(3):625-32.
7. Barnes, P. D. y K. A. Marr, 2006. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infectious Disease Clinics of North America*. 20:545-561.
8. Barton, R. C., 2012. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica*. 2013, ID 459405:29 p.
9. Buchheidt, D., C. Baust, H. Skladny, J. Ritter, T. Suedhoff, M. Baldus, W. Seifarth, C. Leib-Moesch y R. Hehlmann, 2001. Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: clinical results. *Clinical Infectious Diseases*. (33):428-35.
10. Buess, M., G. Cathomas, J. Halter, L. Junker, P. Grendelmeier, M. Tamm y D. Stolz, 2012. *Aspergillus*-PCR in bronchoalveolar lavage form detection of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. *BMC Infectious Diseases*. 12:237.
11. Christie, J. D. 2003. Diagnosis of invasive mold infection. Is PCR the answer? *American Journal of Clinical Pathology*. 119:11-13.
12. Costa, C., D. Vidaud, M. Olivi, E. Bart-Delabesse, M. Vidaud y S. Bretagne, 2001. Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *Journal of Microbiological Methods*. 44(3):263–269.
13. Costa, C., J. M. Costa, C. Desterke, F. Botterel, C. Cordonnier y S. Bretagne, 2002. Real-time PCR coupled with automate DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:2224-2227.

14. Cuenca-Estrella, M., Y. Meije, C. Díaz-Pedroche, A. Gómez-López, M. J. Buitrago, L. Bernal-Martínez, C. Grande, R. San Juan, M. Lizasoain, J. L. Rodríguez-Tudela y J. M. Aguado, 2009. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(2):379-384.
15. Cuervo-Maldonado, S. I., J. C. Gómez-Rincón, P. Rivas y F. O. Guevara, 2010. Actualización en aspergilosis con énfasis en aspergilosis invasora. *Infectio*. 14(S2):S131-S144.
16. Dagenais, T. R., T. Dagenais y N. P. Keller, 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 22(3):447-465.
17. De-Amorim, D. S, N. L. de-Maria-Moreira, C. D. R. De-Amorim, S. Silva-Santos, J. M. de Oliveira, C. Pereira-Nunes, P. C. de Oliveira y A. P. Gomes, 2004. Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais. *Revista Pulmão RJ*. 13(2):111-118.
18. Del Palacio, A., M. S. Cuétara y C. Pazos, 2003. ¿Qué podemos esperar de las nuevas técnicas de diagnóstico micológico de la AI? Detección de antígenos (ELISA: Platelia *Aspergillus*®). *Revista Iberoamericana de Micología*. 51-61.
19. Del Palacio, A., M. S. Cuétara y J. Pontón, 2003. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. *Revista Iberoamericana de Micología*. 20:90-98.
20. Díaz-Sánchez, C. y A. López-Viña, 2004. *Aspergillus* y pulmón. *Archivos de Bronconeumología*. 40(3):114-22.
21. Duarte-Escalante E., G. Zúñiga, O. N. Ramírez, S. Córdoba, N. Refojo, R. Arenas, L. Delhaes y M. R. Reyes-Montes, 2009. Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104(3):427-33.
22. Dupont, B., M. Huber, S. J. Kim y J. E. Bennett. 1990. Galactomannan antigenemia and antigenuria in aspergillosis: studies in patients and experimentally infected rabbits. *The Journal of Infectious Diseases*. 155:1-11.
23. Duval, S. M., J. P. Donnelly, R. Barnes y J. Löffler, 2008. PCR-Based methods with *Aspergillus* as a model. *The Journal of Invasive Fungal Infections*. 2(2):46-51.
24. Einsele, H., H. Hebart, G. Roller, J. Löffler, I. Rothenhofer, C. A. Müller, R. A. Bowden, J. van Burik, D. Engelhard, L. Kanz y U. Schumacher, 1997. Detection and pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(6):1353-1360.
25. Florent, M., S. Katsahian, A. Vekhoff, V. Levy, B. Rio, J. P. Marie, A. Bouvet y M. Cornet, 2006. Prospective evaluation of polymerase chain reaction-ELISA targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in patients with hematological malignancies. *The Journal of Infectious Diseases*. 193(5):741-747.
26. Frías-De León, M. G., G. Acosta-Altamirano, E. Duarte-Escalante, J. E. Martínez-Hernández, M. A. Martínez-Rivera y M. R. Reyes-Montes, 2014. Marcadores moleculares: una herramienta importante en el diagnóstico, tratamiento y epidemiología de la aspergilosis invasora. *Cirugía y Cirujanos*. 82:109-118.
27. García-Ruiz, J.C., E. Amutio y J. Pontón, 2004. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21:55-62.

28. Geiser, D. M., M. A. Klich, J. C. Frisvad, S. W. Peterson, J. Varga y R. A. Samson, 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 59:1-10.
29. Gómez-López, A., M. T. Martín-Gómez, P. Martín-Dávila, P. López-Onrubia, J. Gavalda, J. Fortún, A. Pahissa, J. L. Rodríguez-Tudela y M. Cuenca-Estrella, 2006. Detection of fungal DNA by real-time polymerase chain reaction: evaluation of 2 methodologies in experimental pulmonary aspergillosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 56(4):387-93.
30. Guarro, J., 2003. Etiología de la aspergilosis invasora. En: J. Pontón (Edit.) Guía de bolsillo de aspergilosis invasora. *Revista Iberoamericana de Micología*. ISBN 84-607-9035-2. Disponible en: <http://aspergilosis.reviberoammicol.com/>
31. Guarro, J., 2012. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 30(1):33-39.
32. Gurguí-Ferrer, M., 2010. Aspergilosis invasiva y otras infecciones fúngicas causadas por hongos filamentosos. En: *Medicina stm Editores, S. L. Parte II: Síndromes y agentes patógenos*. Última fecha de actualización 20/Jul/2010. Disponible en: http://www.imedicinas.com/pfw_files/cma/pdffiles/MartinoSierra/C04567040.pdf
33. Halliday, C., Q. X. Wu, G. J. y T. Sorrell, 2005. Development of nested qualitative real-time PCR assay to detect *Aspergillus* species DNA in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(10):5366.
34. Harrington, B.J. y G. J. Hageage, 1991. Calcofluor white: tips for improving its use. *Clinical Microbiology Newsletter*. 13:3-5.
35. Hayette, M., D. Vaira, F. Susin, P. Boland, G. Christiaens, P. Melin y P. De-Mol, 2001. Detection of *Aspergillus* species DNA by PCR in bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(6):2338-2340.
36. Herbart, H., J.E. Loeffler, H. Reitze, A. Engel, U. Schumacher, T. Klingebiel, P. Bader, A. Boehme, H. Martin, D. Bunjes, W. V. Kern, L. Kanz y H. Einsele, 2000. Prospective screening by panfungal polymerase chain reaction assay in patients at risk for fungal infections: implications for the management of febrile neutropenia. *British Journal of Haematology*. 111(2):635-40.
37. Hope, W.W., T. J. Walsh y D. W. Denning, 2005. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 5:609-22.
38. Jaeger, E. E. M., N. M. Carroll, S. Choudhury, A. A. S. Dunlop, H. M. A. Towler y M. M. Matheson, 2000. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(8):2902-2908.
39. Kami, M., T. Fukui, S. Ogawa, Y. Kazuyama, U. Machida, Y. Tanaka, Y. Kanda, T. Kashima, Y. Yamazaki, T. Hamaki, S. Mori, H. Akiyama, Y. Mutou, H. Sakamaki, K. Osumi, S. Kimura y H. Hirai, 2001. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*. 33(9):1504-12.
40. Karageorgopoulos, D. E., E. K. Vouloumanou, F. Ntziora, A. Michalopoulos, P. I. Rafailidis y M. E. Falagas, 2011. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive

- fungal infections: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 52(6):750-770.
41. Khot, P. D., D. L. Ko, R. C. Hackman y D. N. Fredricks, 2008. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infectious Diseases*. 8:73.
 42. Kirk, P. M, P. F. Cannon, J. C. David y J. A. Stalpers. 2001. *Dictionary of the Fungi*. 9th Edit. CABI Publishing. 665p.
 43. Klaassen C. H., H. A. de-Valk, S. A. Balajee y J. F. Meis, 2009. Utility of CSP typing to sub-type clinical *Aspergillus fumigatus* isolates and proposal for a new CSP type nomenclature. *Journal of Microbiological Methods*. 77(3):292-6. Doi:10.1016/j.mimet.2009.03.004.
 44. Klingspor, L. y J. Loeffler, 2009. *Aspergillus* PCR formidable challenges and progress. *Medical Mycology*. 47 Suppl 1:s241-7.
 45. Krimitzas, A., I. Pyrri, V. N. Kouvelis, E. Kapsanaki-Gotsi y M. A. Typas, 2013. A phylogenetic analysis of greek isolates of *Aspergillus* species based on morphology and nuclear and mitochondrial gene sequences. *BioMed Research International (Journal of Biomedicine and Biotechnology)*. 2013:1-18, ID:260395.
 46. Krishnan, S. E. K. Manavathu y P. H. Chandrasekar, 2009. *Aspergillus flavus*: an emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. *Mycoses*. 56:206-222.
 47. Latgé, J. P., 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*. 9(8):382-387.
 48. Latgé, J. P., 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 12:310-350.
 49. Li, Y., L. Gao, Y. Ding, Y. Xu, M. Zhou, W. Huang, Y. Jing, H. Li, L. Wang y L. Yu, 2013. Establishment and application of real-time quantitative PCR for diagnosing invasive aspergillosis via the blood in hematological patients: targeting a specific sequence of *Aspergillus* 28S-ITS2. *BMC Infectious Diseases*. 13:255.
 50. Llovo, J. y J. Pontón, 2007. Diagnóstico microscópico de las micosis. *Revista Iberoamericana de Micología*. ISBN:978-84-611-8776-8.
 51. Lockner, M. y C. Lass-Flörl, 2013. Up-date on diagnostic strategies of invasive aspergillosis. *Current Pharmaceutical Design*. 19(20):3595-3614.
 52. Loeffler, J., N. Henke, H. Hebart, D. Schmidt, L. Hagemeyer, U. Schumacher y H. Einsele, 2000. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(2):586-90.
 53. Loeffler, J., H. Hebart, U. Brauchle, U. Schumacher y H. Einsele, 2000. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(10):3830-3833.
 54. Loeffler, J., K. Kloepfer, H. Hebart, L. Najvar, J. R. Graybill, W. R. Kirkpatrick, T. F. Patterson, K. Dietz, R. Bialek y H. Einsele, 2001. Polymerase chain reaction of *Aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 185:1203-6.

55. Loeffler, J., K. Schmidt, H. Hebart, U. Schumacher y H. Einsele, 2002. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA pure LC system. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(6):2240-2243.
56. Loeffler, J., R. Barnes y J. P. Donnelly, 2012. Letter to the editor: Standardization of *Aspergillus* PCR diagnosis. *Bone Marrow Transplantation*. 47(2):299-300
57. Meersseman, W. K., K. Lagrou, J. Maertens y E. Von-Wijngaerden, 2007. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases*. 45 (2):205-216.
58. Millon, L., F. Grenouillet, F. Legrand, S. Loewert, A. P. Bellanger, H. Gbaguidi-Haore, E. Scherer, T. Henon, P. Rohrlisch y E. Deconinck, 2011. Ribosomal and mitochondrial DNA target for real-time PCR diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1058-1063.
59. Millon, L., R. Piarroux, E. Deconinck, C. E. Bulabois, F. Grenouillet, P. Rohrlisch, J. M. Costa y S. Bretagne, 2005. Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(10):5097-5101.
60. Pappas, P. G., B. D. Alexander, D. R. Andes, S. Hadley, C. A. Kauffman, A. Freifeld, E. J. Anaissie, L. M. Brumble, L. Herwaldt, J. Ito, D. P. Kontoyiannis, G. M. Lyon, K. A. Marr, V. A. Morrison, B. J. Park, T. F. Patterson, T. M. Perl, R. A. Oster, M. G. Schuster, R. Walker, T. J. Walsh, K. A. Wannemuehler y T. M. Chiller, 2010. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the transplant-associated infection surveillance network (TRANSNET). *Clinical Infectious Diseases*. 50(8):1101-11.
61. Patterson, T. F., 2005. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *The Lancet Infectious Diseases*. 366:1013-25
62. Pazos-Pacheco, C., 2004. Diagnóstico de las micosis invasoras. Detección de antígeno de galactomanano. *Revista Española de Quimioterapia*. 17(1):79-82.
63. Pemán, J., 2000. Diagnóstico de la aspergilosis invasiva. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17:90-92.
64. Pemán, J., 2003. Diagnóstico: ¿Qué se puede esperar del diagnóstico micológico de la aspergilosis invasora?. En: J. Pontón (Edit.) *Guía de Bolsillo de Aspergilosis Invasora*. Revista Iberoamericana de Micología. ISBN:84-607-9035-2. Disponible en: <http://aspergilosis.reviberoammicol.com/>
65. Pemán, J., 2013. Servicio de Microbiología Hospital Universitario y Politécnico, La Fé, Valencia.
66. Perkhofer, S., B. E. Kehrel, M. P. Dierich, J. P. Donnelly, W. Nussbaumer, J. Hofmann, C. von Eiff y C. Lass-Flörl, 2008. Human platelets attenuate *Aspergillus* species via granule-dependent mechanisms. *Journal of Infectious Diseases*. 198(8):1243-1246.
67. Pham, A. S., J. J. Tarrand, G. S. May, M. S. Lee, D. P. Kontoyiannis y X. Y. Han, 2003. Diagnosis of invasive mold infection by real-time quantitative PCR. *American Journal of Clinical Pathology*. 119:38-44.
68. Poma, H. R., C. Davies, D. Gutiérrez-Cacciabue, M. C. Mora, M. A. Basombrío y V.

- B. Rajal, 2012. Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos *kits* comerciales y empleando la qPCR. Efecto de las sustancias inhibidoras. *Revista Argentina de Microbiología*. 44:144-149.
69. Pontón J., 2002. Diagnostico microbiológico de las micosis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19:25-29.
70. Rantakokko-Jalava, K., S. Laaksonen, J. Issakainen, J. Vauras, J. Nikoskelainen, M. K. Viljanen y J. Salonen, 2003. Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(9):4304-4311.
71. Richie, D. L., X. Feng, L. Hartl, V. Aimaniada, K. Krishnan, M. V. Powers-Fletcher, D. S. Watson, A. K. Galande, S. M. White, T. Willett, J. Latgé, J. C. Rhodes y D. S. Askew, 2011. The virulence of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* requires cooperation between the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway (ERAD) and the unfolded protein response (UPR). *Virulence*. 2(1):12-21.
72. Rogers, T. R., C. O. Morton, J. Springer, E. Conneally, W. Heinz, C. Kenny, S. Frost, H. Einsele y J. Loeffler, 2013. Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. *British Journal of Haematology*. 161:517-524.
73. Samson, R. A. y J. Varga, 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*. 47(s1):S1-S8, doi:10.1080/13693780802354011
74. Samson, R. A., S. B. Hong y J. C. Frisvad, 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*. 44(1):133-148.
75. Samson, R. A., S. Hong, S. W. Peterson, J. C. Frisvad y J. Varga, 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*. 59:147-203.
76. Sanguinetti, M., B. Posteraro, L. Pagano, G. Pagliari, L. Fianchi, L. Mele, M. La Sorda, A. Franco y G. Fadda, 2003. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(8):3922-3925.
77. Segal, B. H., 2009. Aspergillosis. *The New England Journal of Medicine*. 360:1870-84.
78. Serrano, R., L. Gusmão, A. Amorim y R. Araujo, 2011. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. *BMC Microbiology*. 11:82.
79. Shrimali, G. P., J. K. Bhatt, R. Rajat, R. V. Parmar, S. Nayak y D. Chandralekha, 2013. Isolation of *Aspergillus* species from sputum samples: a study conducted in a tertiary care hospital, Ahmedabad. *National Journal of Medical Research*. 3(3):289-291.
80. Skladny H., D. Buchheidt, C. Baust, F. Krieg-Schneider, W. Seifarth, C. Leib-Mösch y R. Hehlmann, 1999. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-

step PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 3865-3871.

81. Stevens D. A., V. L. Kan, M. A. Judson, V. A. Morrison, S. Dummer, D. W Denning, J. E. Bennett, T. J. Walsh, T. F. Patterson y G. A. Pankey, 2000. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Infection Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases*. 30(4):696-709.
82. Sugui, J. A., S. W. Peterson, A. Figat, B. Hansen, R. A. Samson, E. Mellado, M. Cuenca-Estrella y K. J. Kwon-Chung, 2014. Genetic relatedness versus biological compatibility between *Aspergillus fumigatus* and related species. *Journal of Clinical Microbiology*. Doi:10.1128/JCM.01704-14.
83. Sun, W., K. Wang, W. Gao, X. Su, Q. Qian, X. Lu, Y. Song, Y. Guo y Y. Shi, 2011. Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *PLOS ONE* 6(12):e28467. Doi:10.1371/journal.pone.0028467.
84. Tang, C. M., D. W. Holden, A. Aufavre-Brown y J. Cohen, 1993. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *The American Review of Respiratory Disease*. 148:1313-1317.
85. Thornton, C. R., 2010. Detection of invasive aspergillosis. Chapter 6; *Advances in Applied Microbiology*. 70:187-216.
86. Torelli, R., M. Sanguinetti, A. Moody, L. Pagano, M. Caira, E. De Carolis, L. Fuso, G. De-Pascale, G. Bello, M. Antonelli, G. Fadda y B. Posteraro, 2011. Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(12):4273.
87. Walsh, T. J., M. C. Wissel, K. J. Grantham, R. Petraitiene, V. Petraitis, M. Kasai, A. Francesconi, M. P. Cotton, J. E. Hughes, L. Greene, J. D. Bacher, P. Manna, M. Salomoni, S. B. Kleiboeker y S. K. Reddy, 2011. Molecular detection and species-specific identification of medically important *Aspergillus* species by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(12):4150.
88. White, P., R. Barton, M. Guiver, C. J. Linton, S. Wilson, M. Smith, B. L. Gomez, M. J. Carr, P. T. Kimmitt, S. Seaton, K. Rajakumar, T. Holyoake, C. C. Kibbler, E. Johnson, R. P. Hobson, B. Jones y R. A. Barnes, 2006. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis? *The Journal of Molecular Diagnostics*. 8(3):376-384.
89. White, P. L., C. J. Linton, M. D. Perry, E. M. Johnson y R. A. Barnes, 2006. The evolution and evaluation of whole blood PCR assay for the detection of IA in hematology patients in a routine clinical setting. *Clinical Infectious Diseases*. 42(4):479-86.
90. White, P. L., C. Mengoli, S. Bretagne, M. Cuenca-Estrella, N. Finnstrom, L. Klingspor, W. J. G. Melchers, E. McCulloch, R. A. Barnes, J. P. Donnelly, y J. Loeffler, 2011. Evaluation of *Aspergillus* PCR protocols for testing serum specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(11):3842-3848.

91. White, P. L., M. D. Perry, J. Loeffler, W. Melchers, L. Klingspor, S. Bretagne, E. McCulloch, M. Cuenca-Estrella, N. Finnstrom, J. P. Donnelly y R. A. Barnes, 2010. European *Aspergillus* PCR initiative: critical stages of extracting DNA from *Aspergillus fumigatus* in whole-blood specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(10):3753-3755.
92. Zarrinfar, H., K. Makimura, K. Satoh, H. Khodadadi y H. Mirhendi, 2013. Incidence of pulmonary aspergillosis and correlation of conventional diagnostic methods with nested PCR and real-time PCR assay BAL fluid in intensive care unit patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 27:181-185.
93. Zavala-Ramírez, A. O. M. 2011. Diversidad genética de aislados de *A. fumigatus* de diferente origen geográfico y diseño de un marcador molecular para su identificación. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Quimicobiológicas. México, D. F. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. 72p.
94. Zmeili, O. S. y A. O. Soubani, 2007. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM: An International Journal of Medicine*. 100(6):317-334.
95. http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer_improved.php
96. <http://www.speciesfungorum.org/Names/fundic.asp>
97. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
98. <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank>