



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

Orientación: Bioquímica Clínica

**Genotipificación de aislados ambientales de *Aspergillus* spp. con
base en la secuencia parcial del gen *benA***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MUÑOZ CALDERÓN MARCELA

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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, y en el laboratorio de Epidemiología Molecular del Hospital Juárez de México bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Frías De León.

El proyecto fue financiado por la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-DGAPA-IN219212) y por el Hospital Juárez de México (HJM 2088/12-C).

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todas aquellas personas que contribuyeron para hacer posible la realización de este trabajo.

Primeramente agradezco a mi Alma Mater, la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme aceptado ser parte de ella y abrirme las puertas para poder realizar mi carrera, así como también a los diferentes docentes que brindaron su conocimiento durante este camino y así poder ser “ORGULLOSAMENTE UNAM”.

Un agradecimiento particular debo a la Dra. María Guadalupe Frías De León, por la orientación, apoyo, seguimiento y la supervisión que como directora de esta tesis me ha otorgado.

Me gustaría agradecer a la Dra. María del Rocío Reyes Montes, a la Dra. Esperanza Duarte Escalante, al M. en C. Erick Martínez y a mi jurado asignado, el Dr. Arturo Valle Mendiola, la QFB. Patricia Vidal Millán, la QFB. Rosalba Cervantes Cruz y el QFB. Francisco Javier Parada García por el interés, la orientación y las sugerencias recibidas para hacer posible este proyecto.

Al M. en C. Emmanuel Rosas de Paz por el apoyo y asesoría en el desarrollo del análisis bioinformático.

A mis compañeros tesistas, Lesli, Bruno y Emmanuel por esos momentos compartidos, por el apoyo durante todo este tiempo, por todas las risas que nos hicieron más a meno este camino.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y ánimos recibidos por parte de mi familia, a mi mamá por todo el apoyo que me das, por la

educación que me diste, y por todo el esfuerzo que hiciste para que esto fuera posible, muchas gracias!

A mis hermanos Pedro y Gerardo, gracias por el apoyo recibido y por cada granito de arena que han puesto para mi formación.

A mi compañero de vida, Javier, por ser un pilar importante en mi vida, por el apoyo y consejos otorgados durante este camino, pero sobre todo por la confianza y admiración que me tienes, te amo.

A Valeria, mi chipis hermosa, por llegar a mi vida y darme ese impulso para ser mejor cada día, eres una gran inspiración!

Y por último quiero agradecer a mi segunda familia, Mariana, Adry, Nadia, Sofía y Gil, amigos como ustedes no se encuentran fácil. Gracias por todo lo que vivimos en esta aventura llamada “La licenciatura”, gracias por las risas de cada día, por el apoyo incondicional, por compartir tantas cosas, los quiero infinitamente amigos.

A todos ellos muchas gracias!

DEDICATORIA

A mi mamá Coco, por lo que soy hasta ahora.

A Valeria, por todo lo que seré por ti y para ti.

A mí papá, que desde arriba sé que estuviste apoyándome.

ÍNDICE	Pág.
Resumen	10
1. Introducción	11
2. Marco teórico	12
2.1. Taxonomía del género <i>Aspergillus</i>	12
2.2. Identificación fenotípica	15
2.3. Identificación genotípica	18
2.4. β -tubulina	18
3. Planteamiento del problema	19
4. Hipótesis	20
5. Objetivos	20
5.1. Objetivo general	20
5.2. Objetivos particulares	20
6. Material y métodos	21
6.1. Origen de los aislados de <i>Aspergillus</i> spp.	21
6.2. Cultivos monospóricos y mantenimiento de los aislados de <i>Aspergillus</i> spp.	22
6.3. Extracción de DNA genómico.....	23
6.4. Amplificación de la secuencia parcial del gen <i>benA</i>	24
6.5. Purificación de los fragmentos amplificados del gen <i>benA</i>	25
6.6. Secuenciación y análisis de secuencias	25

6.7. Reconstrucción filogenética	26
7. Resultados	27
7.1. Cultivos monospóricos	27
7.2. Extracción de DNA genómico	27
7.3. Amplificación de la secuencia parcial del gen <i>benA</i>	30
7.4. Purificación de los fragmentos amplificados del gen <i>benA</i>	36
7.5. Secuenciación y análisis de secuencias	37
7.6. Identificación genotípica	39
7.7. Reconstrucción filogenética	43
8. Discusión	48
9. Conclusiones	51
10. Referencias	51
11. Anexo 1	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un microtúbulo de α y β -tubulina

Figura 2. Cuantificación del DNA obtenido de aislados de *Aspergillus* spp. por electroforesis

Figura 3. Cuantificación de DNAs ajustados a 10 ng/ μ L

Figura 4. Amplificación de la secuencia parcial del gen *benA* con las condiciones descritas por Glass y Donaldson (1995)

Figura 5. Curva de concentración de DNA

Figura 6. Curva de concentración de dNTPs

Figura 7. Curva de concentración de MgCl₂

Figura 8. Curva de concentración de oligonucleótidos

Figura 9. Curva de temperatura de alineamiento

Figura 10. Amplificación de la secuencia parcial del gen *benA* con las condiciones óptimas de reacción

Figura 11. Purificación de los fragmentos amplificados del gen *benA*

Figura 12. Electroferograma de la secuencia del fragmento del gen *benA*

Figura 13. Alineamiento de secuencias en el GenBank

Figura 14. Dendrograma de la secuencia parcial del gen *benA* obtenido por el método de inferencia bayesiana

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secciones del género *Aspergillus* en las que se encuentran especies patógenas para el humano.

Tabla 2. Características fenotípicas de las especies de *Aspergillus* de mayor importancia clínica, observadas en CYA.

Tabla 3. Origen e identificación fenotípica de 71 aislados ambientales de *Aspergillus* spp.

Tabla 4. Cuantificación espectrofotométrica de 71 DNAs obtenidos de los aislados ambientales de *Aspergillus* spp.

Tabla 5. Comparación de las secuencias de los aislados ambientales de *Aspergillus* spp. recuperados del Hospital Juárez de México con las secuencias depositadas en el GenBank.

Tabla 6. . Comparación de las secuencias de los aislados ambientales de *Aspergillus* spp. obtenidos del Instituto de Oftalmología IAP Conde de Valenciana con las secuencias depositadas en el GenBank.

Tabla 7. Secuencias del gen *benA* tomadas del GenBank como referencia para el análisis filogenético.

RESUMEN

La presencia de *Aspergillus* spp. en determinadas zonas del ambiente hospitalario puede provocar, tras su inhalación, procesos infecciosos de consecuencias fatales en pacientes inmunocomprometidos. Esta situación crea la necesidad de conocer las especies de *Aspergillus* que prevalecen en el ambiente intrahospitalario, ya que éstas pueden en algún momento ocasionar una infección nosocomial. Por lo que el objetivo de este estudio fue identificar, con base en el análisis de las secuencias parciales del gen *benA* (β -tubulina), 71 aislados de *Aspergillus* spp. obtenidos del ambiente de dos hospitales, los cuales fueron previamente fenotipificados como: *Aspergillus* sp., *A.* sección *Fumigati*, *A.* sección *Flavi*, *A.* sección *Nigri* y *A.* sección *Terrei*. A partir de cada aislado, se obtuvieron cultivos monospóricos, se extrajo el DNA, se amplificó, por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), un fragmento de 500 bp correspondiente al gen *benA*, se purificaron y secuenciaron los amplicones. Las secuencias se editaron, alinearon, compararon en el GenBank y se utilizaron para construir tres árboles filogenéticos por los métodos de máxima verosimilitud, inferencia bayesiana y UPGMA (método multivariado de agrupamiento por promedio aritmético de grupos de pares no ponderado). Se incluyeron secuencias de referencia correspondientes a diferentes especies de las secciones *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Usti*, *Circumdati*, *Terrei* y *Penicillium flavigenum* como grupo externo. La topología de los tres dendrogramas fue similar; sin embargo, el obtenido por inferencia bayesiana describió mejor la relación de las secuencias estudiadas. Con base en este dendrograma, se identificaron 60 aislados a nivel de especie (25 *A. fumigatus*, 1 *A. neoellipticus*, 6 *A. niger*, 16 *A. tubingensis*, 1 *A. awamori*, 5 *A. flavus*, 2 *A. oryzae*, 2 *A. terreus*, 1 *A. ochraceus* y 1 *A. calidoustus*). Nueve aislados se ubicaron sólo a nivel de sección (6 *A.* sección *Nigri* y 3 *A.* sección *Flavi*). Un aislado de *Aspergillus* sp. no se logró ubicar a nivel de sección y otro aislado se ubicó en el género *Penicillium*. Estos resultados demuestran que la secuencia del gen *benA* sólo es informativa para las secciones *Fumigati* y *Usti*, mientras que se requiere analizar un mayor número de genes para discriminar las especies de las secciones *Nigri*, *Flavi*, *Circumdati* y *Terrei*.

1. INTRODUCCIÓN

La incidencia de las infecciones fúngicas de origen nosocomial se ha incrementado considerablemente durante las últimas décadas (39, 40), siendo las formas invasoras las que presentan mayor morbimortalidad debido principalmente a la dificultad para realizar el diagnóstico, lo que provoca un retraso o falla en la elección del tratamiento. De las enfermedades invasoras causadas por hongos filamentosos, la aspergilosis invasora (AI) es la más prevalente, seguida de las infecciones causadas por otros hongos considerados emergentes, como *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., o los mucorales (39).

Los hongos del género *Aspergillus* utilizan la materia vegetal en descomposición como nicho ecológico primario; y tienen la habilidad de crecer a temperaturas extremas, lo que les permite tener una distribución ubicua y desempeñar un papel importante en la descomposición de la materia orgánica. Además, la mayoría de las especies de *Aspergillus* esporulan abundantemente, y en consecuencia liberan grandes cantidades de conidios al ambiente (37). Los conidios de *Aspergillus* son transportados con facilidad por las corrientes de aire, y se cree que la inhalación de estas partículas infecciosas es la vía de transmisión para la aspergilosis pulmonar y la AI. La exposición a estos hongos dentro del ambiente hospitalario, especialmente durante periodos de obras de construcción, ha causado brotes de AI en pacientes inmunodeprimidos y de alto riesgo, como son los pacientes sometidos a trasplante de órganos y médula ósea o tratamiento con corticoesteroides, así como los que padecen enfermedades pulmonares o neoplasias malignas hematológicas (2, 21, 54, 55). La etiología de la AI es muy diversa, no obstante que *A. fumigatus* es la especie que causa más del 90% de los casos, otras especies como *A. terreus*, *A. niger* y *A. flavus* también pueden causar la enfermedad (2, 15, 29, 30), y actualmente el número de especies patógenas es mayor debido a los múltiples cambios que se han presentado en la taxonomía de *Aspergillus* y a la descripción de nuevas especies (1, 29). A la fecha, se consideran más de 250 especies clasificadas en 7 subgéneros y 20 secciones, de las cuales *Fumigati*, *Nigri*, *Flavi*, *Terrei*, *Usti*, *Clavati* y *Nidulantes* son las que

contienen especies a las que se les atribuyen infecciones en el hombre (3). Es importante mencionar que algunas de estas especies, particularmente las que pertenecen a una misma sección, no son distinguibles por métodos fenotípicos, pero presentan patrones de susceptibilidad antifúngica diferente, por lo que se han implementado técnicas moleculares con base en la amplificación y secuenciación de genes constitutivos como b-tubulina (*benA*), Actina (*Act*) y calmodulina (*CaM*) o la región ITS (espaciador transcrito interno) de genes ribosomales para su identificación adecuada (2, 5, 8, 26, 30, 33, 55).

A pesar de la terapia antifúngica, la AI es difícil de diagnosticar y su mortalidad suele ser mayor al 50% (22), por lo que se requieren nuevas estrategias diagnósticas, terapéuticas y preventivas. Por otro lado, la presencia de estos patógenos en el ambiente intrahospitalario, evidencia que la aspergilosis se adquiere en este entorno y considerando la diversidad de especies dentro del género *Aspergillus* (5, 8), se hace necesario conocer cuáles son las especies de *Aspergillus* que prevalecen en el ambiente nosocomial, debido a que éstas pueden causar infección en pacientes susceptibles (18, 47). En nuestro país, la información sobre la epidemiología de la AI es escasa y menos aún se conoce la composición de la microbiota de ambientes intrahospitalarios. Por lo que con el fin de aportar información sobre las especies de *Aspergillus* presentes en áreas críticas, en este trabajo se clasificaron taxonómicamente con base en el análisis de la secuencia parcial del gen *benA*, 71 aislados de *Aspergillus* spp., recuperados del ambiente de dos hospitales de la Ciudad de México, previamente ubicados a nivel de sección, con base en sus características morfológicas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Aspergillus*

El género *Aspergillus*, perteneciente al orden *Eurotiales* (clase *Euromycetes*), ha sufrido cambios importantes en la taxonomía desde su primera clasificación, la cual se realizó con criterios morfológicos e incluyó 150 especies separadas en 18

grupos (46). En 1985, Gams *et al.* (25), dividieron estas 150 especies en subgéneros y secciones. A partir de esta fecha, el número de especies se ha modificado, de acuerdo a la aplicación del concepto especie filogenética, el cual toma en cuenta criterios morfológicos, además de criterios bioquímicos y moleculares (24, 26, 42, 48). De manera que, actualmente el género *Aspergillus* está integrado por 250 especies, de acuerdo con los criterios del “*International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants*”, las cuales han sido reclasificadas en 20 secciones (*Fumigati, Nigri, Flavi, Terrei, Usti, Clavati, Nidulantes, Zonati, Aspergillus, Raperi, Sparsi, Candidi, Cremei, Circumdati, Silvati, Bispori, Crvini, Flavipedes, Restricti, Ochraceoroseus*). De éstas, *Fumigati, Nigri, Flavi, Terrei, Usti, Circumdati, Clavati* y *Nidulantes* son las que contienen especies reportadas como causantes de infección en humanos (2, 6, 28, 29, 32, 36, 49) (Tabla 1). Es importante mencionar que el aumento en el número de especies, no sólo se debe a la descripción de nuevas especies, sino también a la reclasificación de muchas especies que antes se consideraban sinónimos, con base en la morfología pero que filogenéticamente son distintas (24, 26, 52). Por lo que es importante que los aislados de *Aspergillus* sean correctamente clasificados a nivel taxonómico, ya que en una misma sección se encuentran especies patógenas y no patógenas que pueden confundirse por su similitud morfológica.

Tabla 1. Secciones del género *Aspergillus* en las que se encuentran especies patógenas para el humano.

Sección	Especies	
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumisynematus</i>	<i>N. spinosa</i>
	<i>A. duricaulis</i>	<i>N. stramenia</i>
	<i>A. brevipes</i>	<i>N. spathulata</i>
	<i>A. unilateralis</i>	<i>N. tetenoi</i>
	<i>A. novofumigatus</i>	<i>N. multiplicata</i>
	<i>A. fumigatiaffinis</i>	<i>N. sublevispora</i>
	<i>Neosartorya aurata</i>	* <i>N. udagawae</i>
	<i>N. aureola</i>	* <i>N. hiratsukae</i>
	<i>N. coreana</i>	* <i>N. fischeri</i>

	<i>N. glabra</i> <i>N. lacinosa</i>	* <i>N. pseudofischeri</i> * <i>A. lentulus</i> * <i>A. fumigatus</i>
<i>Nigri</i>	<i>A. heteromorphus</i> <i>A. brasiliensis</i> <i>A. awamori</i> <i>A. lacticoffeatus</i> <i>A. vadensis</i> <i>A. costaricaensis</i> <i>A. piperis</i> <i>A. foetidus</i>	<i>A. carbonarius</i> <i>A. sclerotiumiger</i> <i>A. homomorphus</i> <i>A. aculeatus</i> <i>A. uvarum</i> * <i>A. niger</i> * <i>A. tubingensis</i>
<i>Flavi</i>	<i>A. avenaceus</i> <i>A. leporis</i> <i>A. lanosus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. sojae</i> <i>A. toxicarius</i> <i>A. alliaceus</i>	<i>A. bombycis</i> <i>A. caelatus</i> <i>A. coremiiformis</i> * <i>A. nomius</i> * <i>A. pseudonomius</i> * <i>A. flavus</i> * <i>A. oryzae</i>
<i>Terrei</i>	<i>A. niveus</i> <i>A. allahabadii</i> <i>A. carneus</i> <i>A. ambiguus</i>	<i>A. microcysticus</i> * <i>A. terreus</i> * <i>A. alabamensis</i>
<i>Usti</i>	<i>A. puniceus</i> <i>A. insuetus</i> <i>Emericella heterothallica</i> * <i>A. ustus</i>	* <i>A. calidoustus</i> <i>A. granulosis</i> <i>A. deflectus</i>
<i>Circumdati</i>	<i>A. auricomus</i> <i>A. cretensis</i> <i>A. petrakii</i> <i>A. bridgeri</i> <i>A. sclerotium</i> <i>A. roseoglobulosus</i>	<i>A. steynii</i> <i>A. insulicola</i> <i>A. ostianus</i> <i>A. westerdijkiae</i> * <i>A. ochraceus</i>
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i> <i>A. longiversica</i> <i>A. clavatonanicus</i>	<i>A. giganteus</i> <i>A. apicalis</i> <i>A. palidus</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>A. multicolor</i> <i>A. recurvatus</i> <i>A. unguis</i> <i>A. caespitosus</i> <i>A. protoberus</i>	<i>A. aureolatus</i> <i>A. crustosus</i> <i>E. rugulosa</i> <i>E. fruticulosa</i> * <i>A. nidulans</i>

	<i>A. sydowii</i>	* <i>A. sydowii</i>
	<i>A. varians</i>	* <i>Emmericella nidulans</i>
	<i>A. asperscens</i>	* <i>E. quadrilineata</i>

*Especies patógenas

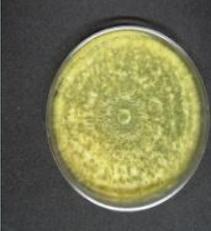
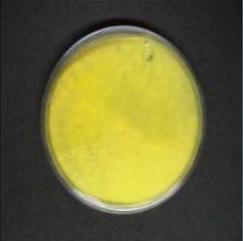
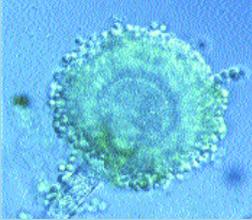
2.2 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

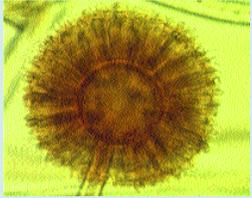
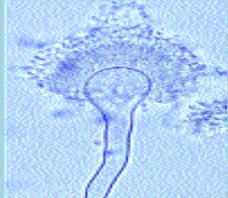
La clasificación del género *Aspergillus* en subgéneros y secciones se realiza fundamentalmente, considerando cuatro características: presencia de teleomorfo, presencia o ausencia de mótulas; disposición de las mótulas o fiálides sobre la vesícula y coloración de las colonias (25).

Klich y Pitt (34), propusieron un sistema de identificación con base en la utilización de tres medios de cultivo, CYA (agar extracto de levadura Czapek), una placa de CYA con 20% de sacarosa (CY20S) y una placa de MEA (agar extracto de malta) y dos temperaturas de incubación, a 37°C y a 25°C. Después de siete días de incubación se procede a la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos. Las características macroscópicas incluyen: diámetro de las colonias, coloración del anverso y del reverso de las colonias, presencia de esclerocios, presencia de gotas de exudado, presencia de pigmento difusible y textura de las colonias. Las características microscópicas son: disposición de las mótulas o fiálides sobre la vesícula, longitud y anchura de los estipes, forma y diámetro de las vesículas, longitud y anchura de las mótulas y fiálides, forma, diámetro y color de los conidios, forma, tamaño y color de las células de Hülle y forma, tamaño y color de las ascosporas (1, 52) (Tabla 2).

Sin embargo, el análisis morfológico para la identificación de las especies de *Aspergillus* tiene algunas desventajas, como son el retraso o escasez en la producción de sus estructuras típicas en los medios de cultivo y la ausencia de un ciclo de reproducción sexual en algunas especies, lo que hace difícil la identificación de las características microscópicas o macroscópicas, principalmente entre las especies de una misma sección (44).

Tabla 2. Características fenotípicas de las especies de *Aspergillus* de mayor importancia clínica, observadas en CYA.

Característica Especie	Morfología colonial		Temperatura óptima de crecimiento	Morfología microscópica
	Anverso	Reverso		
<i>A. fumigatus</i>	<p>Colonias planas, vellosas, de aspecto aterciopelado, color verde grisáceo.</p> 	<p>Inicialmente incoloro, después torna a amarillo.</p> 	37 a 50°C	<p>Conidióforo corto (3.8µm), de pared lisa. Conidios de color verde, rugosos, globosos, de 2-3µm de diámetro. Vesícula redonda, fíalides uniseriadas.</p> 
<i>A. flavus</i>	<p>Colonias pulverulentas, con surcos radiales, rugosos o granulosos, de color verde-amarillo.</p> 	<p>Incoloro.</p> 	30 a 37°C	<p>Conidióforo de pared gruesa, hialino, rugoso. Conidios de color verde-amarillento, lisos, esféricos. Vesícula globosa, fíalides uni o biseriadas.</p> 

<p><i>A. niger</i></p>	<p>Colonias de textura granular, al principio color blanco-amarillo, después torna a negro.</p> 	<p>Incoloro o crema.</p> 	<p>37°C</p>	<p>Conidióforo de pared lisa, hialina, de 1.5-3 mm. Conidios globosos y rugosos de color castaño o marrón a negro. Vesícula globosa, fálides biseriadas.</p> 
<p><i>A. terreus</i></p>	<p>Colonias de textura aterciopelada, color canela.</p> 	<p>Blanco a marrón.</p> 	<p>25 a 37°C</p>	<p>Conidióforo corto y de pared lisa. Vesículas de forma esférica o subglobosa fialides biseriadas, agrupados en forma tubular.</p> 
<p><i>A. ustus</i></p>	<p>Colonia de textura lanosa, color amarillo-marrón tornándose a gris-purpura.</p> 	<p>Amarillo a rojizo.</p> 	<p>25 a 37°C</p>	<p>Conidióforo corto, color marrón pálido. Conidios globosos, marrón oscuro. Vesícula redondeada, semiesférica, hialina, lisa fialides biseriadas.</p> 

2.3 IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

Dada la complejidad taxonómica actual del género *Aspergillus*, se recomienda que la identificación a nivel de especie se realice con base en la combinación de los resultados del análisis fenotípico con los resultados de pruebas moleculares. Para la caracterización molecular de los aislados de *Aspergillus* spp., diversos autores han utilizado el RFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción), RAPD (Amplificación aleatoria de DNA polimórfico), AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), SSPD (Polimorfismo de DNA de secuencia específica), MLST (Tipificación de secuencias multilocus), MLEE (Electroforesis de enzimas multilocus), el análisis de microsatélites STR (Repeticiones cortas en tándem) y VNTR (Número variable de repeticiones en tándem) y la secuenciación de regiones ITS (espaciador transcripcional interno), así como secuencias parciales de diferentes genes, como *benA*, *caM*, *Act*, *rodlet A*, citocromo B y DNA mitocondrial (5, 8, 9, 13, 17, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 47, 55). No obstante la cantidad de métodos moleculares utilizados para diferenciar entre especies de *Aspergillus*, los que han presentado mayor sensibilidad y reproducibilidad son el análisis secuencias de genes o las regiones ITS (2, 8, 20, 26, 33, 36). Sin embargo, las regiones ITS no tienen suficiente poder discriminatorio para diferenciar entre las especies *A. fumigatus* y no-*A. fumigatus* (6, 7).

Un método que ha resultado útil, es la secuencia parcial del gen *benA*, que ha permitido tanto la identificación, como el descubrimiento de nuevas especies o secciones dentro del género *Aspergillus* (2, 33, 36).

2.4 β -tubulina

Las tubulinas son proteínas globulares que constituyen los principales componentes de los microtúbulos, proporcionan la base molecular para la segregación de cromosomas, la división celular, la generación y el mantenimiento de la forma celular, el transporte intracelular y el movimiento flagelar-ciliar. La unidad para la construcción de un microtúbulo es la subunidad de tubulina, un

heterodímero de α -tubulina y β -tubulina (Figura 1), estos monómeros se encuentran en todas las células eucariontes y sus secuencias están muy conservadas (38). El gen *benA* es altamente conservado y común en todos los eucariotas, por lo que es empleado para establecer comparaciones entre miembros de un mismo género, permitiendo la diferenciación de especies. Ha sido utilizado en la caracterización de patógenos y en la reconstrucción de relaciones filogenéticas (19, 36). En *A. fumigatus*, el gen *benA* se encuentra en el cromosoma 1 y cuenta con 9 exones (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3510492>).

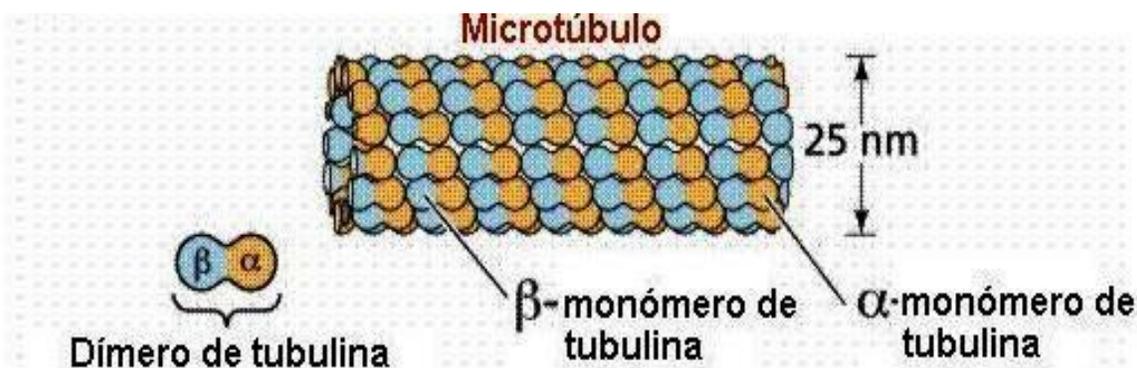


Figura 1. Estructura de un microtúbulo de α y β tubulina. Tomada de <http://www.efri.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/filament.gif>.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial, la AI se ha convertido en una de las infecciones fúngicas más graves entre los pacientes inmunodeprimidos debido a su elevada tasa de mortalidad, particularmente en los pacientes neutropénicos, como son los receptores de trasplantes o los que padecen diferentes tipos de cáncer (11, 12, 16). La presencia de *Aspergillus* en el ambiente intrahospitalario se ha asociado con brotes de aspergilosis y elevadas tasas de mortalidad, a pesar de la terapia antifúngica (4, 23). La mayoría de estas infecciones son causadas por *A. fumigatus*, no obstante, con el advenimiento de la taxonomía molecular, actualmente se reconocen como patógenas muchas especies de *Aspergillus*, algunas de las cuales son morfológicamente indistinguibles entre sí, pero con

distintos perfiles de susceptibilidad a antifúngicos. Por esta razón, aunada a la actual complejidad de la taxonomía del género *Aspergillus*, resulta necesario conocer las especies de *Aspergillus* que prevalecen en el ambiente hospitalario, ya que en algún momento, éstas pueden ser las causantes de brotes importantes de aspergilosis.

Por lo que el objetivo del presente trabajo, fue clasificar taxonómicamente aislados de *Aspergillus* spp. recuperados del ambiente (aire y superficies) de dos hospitales de la Ciudad de México, con base en las secuencias parciales del gen *benA*.

4. HIPÓTESIS

Si la secuencia parcial del gen *benA* es suficientemente polimórfica entre especies, entonces permitirá identificar aislados ambientales de *Aspergillus* spp.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar genotípicamente 71 aislados ambientales de *Aspergillus* spp. con base en el análisis de las secuencias parciales del gen *benA*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener cultivos monospóricos de 71 aislados ambientales de *Aspergillus* spp.
2. Obtener el DNA de 71 cultivos monospóricos de *Aspergillus* spp.
3. Amplificar la secuencia parcial del gen *benA* en los 71 aislados ambientales de *Aspergillus* spp.
4. Secuenciar los fragmentos amplificados del gen *benA*, correspondientes a los 71 aislados ambientales de *Aspergillus* spp.

- Realizar una reconstrucción filogenética con las secuencias del gen *benA* para identificar la especie de cada uno de los 71 aislados estudiados.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ORIGEN DE LOS AISLADOS DE *Aspergillus* spp.

Se trabajó con 71 aislados de *Aspergillus* spp., colectados del ambiente (aire y superficies) en las áreas de hematología, terapia intensiva adultos y terapia intensiva de pediatría del Hospital Juárez de México, y en consulta externa, sala de recuperación y quirófano del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP, ubicados en la Ciudad de México. Todos los aislados fueron previamente clasificados en secciones de acuerdo con sus características fenotípicas (Tabla 3).

Tabla 3. Origen e identificación fenotípica de 71 aislados ambientales de *Aspergillus* spp.

Hospital Juárez de México		Hospital Conde de Valenciana	
CLAVE	CLASIFICACIÓN	CLAVE	CLASIFICACIÓN
392A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	257C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
270B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	235A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
312B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	222A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
411A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	9A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
100A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	176A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
262A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	233A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
394A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	A10	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
B21	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	A35	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
B18	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	A36	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
385B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	A28	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>
B11	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	A26	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
435A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	284B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
373C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	A13	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
B4	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	31E	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
B20	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	220A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
B39	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	217A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>

B27	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	243A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
373A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	381D	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
140A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	312A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
412A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	314B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
87B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	A25	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
360B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	335B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
387A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	87A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>
B52	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	A15	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>
264A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	A38	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>
B49	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	24B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>
B12	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	A17	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>
88C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	202B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>
395A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	A40	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>
323C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	A39	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>
55C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	237C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Terrei</i>
370B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	202A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Terrei</i>
57B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	237B	<i>Aspergillus</i> sp.
B5	<i>Aspergillus</i> sección <i>Terrei</i>	283A	<i>Aspergillus</i> sp.
444D	<i>Aspergillus</i> sección <i>Terrei</i>	343B	<i>Aspergillus</i> sp.
369B	<i>Aspergillus</i> sp.		

6.2 CULTIVOS MONOSPÓRICOS Y MANTENIMIENTO DE LOS AISLADOS DE *Aspergillus* spp.

A partir del crecimiento (2-4 días) de cada aislado en agar Sabouraud a 37°C, se preparó una suspensión de conidios con 1 mL de amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.4 adicionado con tween 20 al 0.05% (PBST). Esta suspensión se diluyó 1:1000, se tomaron 50 µL y se sembraron en el centro de una caja de Petri conteniendo agar Sabouraud (Bioxón, México). Las cajas se incubaron a 37°C y se revisaron hasta observar el desarrollo de colonias. Se tomó sólo una colonia por cada placa y se sembró en tubos con agar Sabouraud a 37°C. Finalmente, los conidios de los cultivos monospóricos se conservaron en agua estéril a 4°C, y a temperatura ambiente en tubos con agar Sabouraud (Bioxón) cubiertos con aceite mineral estéril.

6.3 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

A partir de cada cultivo monospórico de *Aspergillus* spp., sembrado en tubos con agar Sabouraud, se obtuvo una suspensión de conidios de la siguiente manera: se agregó a cada tubo 1 mL de PBST y se resuspendió agitando en vórtex (Daigger Inc, USA). Posteriormente, se sembró en 30 mL de medio YPD (1% extracto de levadura, 1% peptona, 2% glucosa) y se incubó a 37°C en agitación, durante 2 días o hasta observar crecimiento micelial. Se obtuvo individualmente la biomasa micelial de cada aislado por filtración al vacío. Enseguida, se lavó el micelio con agua Milli Q estéril y se secó con papel filtro, posteriormente, la extracción del DNA se llevó a cabo con el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA). Para ello, se tomaron 100 mg de masa micelial y se depositaron en tubos de 1.5 mL que contenían 0.2 g de perlas de vidrio estériles (400 a 455 μm de diámetro, lavadas previamente con ácido clorhídrico) y 400 μL del amortiguador de extracción AP1. Las muestras de micelio fueron procesadas en un equipo FastPrep (Thermo Savant Instruments, USA) por 4 periodos de 40 s a 6 m/s, con 5 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Después de pulverizar el micelio, se adicionaron 4 μL de RNAsa (100 mg/mL), se agitó vigorosamente en el vórtex y se incubó la mezcla por 10 min a 65°C, mezclando por inversión 2 o 3 veces. Posteriormente, se adicionaron 130 μL del amortiguador AP2 y se incubó por 5 min en hielo, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min. Se transfirió el volumen total del sobrenadante a la columna lila QIAshredder mini spin colocada sobre un tubo colector de 2 mL, para centrifugar a 14,000 rpm por 2 min. El sobrenadante obtenido en el tubo colector se transfirió a un 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 de 2 mL y se centrifugó 1 min a 9000 rpm desechando el sobrenadante, este paso se repitió hasta pasar todo el volumen. Posteriormente, se cambió el tubo colector, se realizaron dos lavados con 500 μL del amortiguador AW, en el primero se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min y en el segundo a 14,000 rpm durante 2 min. Por último, para eluir el DNA, la columna se colocó en un tubo nuevo de 1.5 mL, se adicionaron 50 μL de agua Milli Q a la

membrana, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. La concentración del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, teñido con 0.8 μ L/100 mL de GelRed (10000X, Biotium, USA), comparando con diferentes concentraciones (10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L) del fago λ (Gibco BRL®, USA). La electroforesis se realizó a 90 V en amortiguador TBE 0.5X (45 mM Tris-base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA). La imagen del gel se capturó en un fotodocumentador (GelDoc XR, BioRad, USA). Posteriormente, el DNA obtenido de cada uno de los aislados de *Aspergillus* spp. se ajustó a una concentración final de 10 ng/ μ L con agua Milli Q.

6.4 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA PARCIAL DEL GEN *benA*

El procedimiento se llevó a cabo, según lo reportado por Glass y Donaldson (27). Inicialmente, en un volumen final de reacción de 25 μ L, se emplearon: 10 ng de DNA genómico, 2.0 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs (Applied Biosystems Inc., USA), 1 U *Taq* polimerasa (Fermentas Inc., USA) y 30 pmol de cada oligonucleótido Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') (Sigma-Aldrich, USA) y Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Sigma-Aldrich). La amplificación se realizó en un termociclador (ESCO Swift maxi, USA) usando el programa: un ciclo a 95°C por 8 min, 35 ciclos de 95°C por 15 s, 55°C por 20 s y 72°C por 1 min, y un ciclo de 72°C por 5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con 0.8 μ L/100 mL de GelRed (10000X, Biotium). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V en amortiguador TBE 0.5X. Como estándar de tamaño molecular se empleó el 100 bp DNA Ladder (Fermentas Inc.). Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad).

6.5 PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DEL GEN *benA*

Los fragmentos amplificados del gen *benA* se purificaron usando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones descritas por el fabricante. Para ello, se colocaron 20 μL del producto de amplificación de cada aislado más 2 μL del amortiguador de corrida, en un gel de agarosa al 1.5% teñido con 0.8 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ de GelRed (10000X, Biotium). El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TBE 0.5X, una vez concluido el corrimiento, se observaron los geles a través de un transiluminador de luz UV y se cortó el fragmento del gel, de aproximadamente 400 mg, conteniendo la banda amplificada de 500 bp, y se colocó en tubos de 1.5 mL. Posteriormente, se agregaron 500 μL de amortiguador QG por cada 100 mg de gel, las muestras fueron incubadas a 50°C por 10 min, mezclando por inversión de 2-3 veces durante la incubación, cuidando que el color de la mezcla permaneciera amarilla. Se agregaron 800 μL de la muestra a la columna QIAquick spin colocada en un tubo de 2 mL, se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min, se descartó el líquido colectado en el tubo colector. Las columnas se reutilizaron cuando el volumen de la muestra fue mayor a 800 μL , se adicionaron 500 μL de amortiguador QG a la columna QIAquick y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Posteriormente, se agregaron 750 μL de amortiguador PE a la columna y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min, se descartó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente por 1 min a 13,000 rpm. Posteriormente, se colocó la columna QIAquick en un tubo de 1.5 mL estéril, se agregaron 50 μL de agua Milli Q en la membrana de la columna QIAquick, se dejó reposar la columna por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min, obteniéndose así el DNA purificado.

6.6 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Una vez purificados los fragmentos amplificados del gen *benA* correspondientes a los 71 aislados ambientales de *Aspergillus* spp., se secuenciaron en ambos sentidos con los oligonucleótidos Bt2a y Bt2b. La secuenciación se llevó a cabo en

el High Throughput Genomics Center (Universidad de Washington, USA). Una vez obtenidas las secuencias, se revisó que el tamaño fuera adecuado y no menor al esperado de 500 bp. Posteriormente, las secuencias se editaron con el programa Chromas Lite ver. 2.1.1. (<http://www.technelysium.com.au>). Las secuencias editadas se alinearon y compararon con todas las secuencias de hongos depositadas en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), mediante el algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y utilizando la herramienta Megablast. Con base en los alineamientos más significativos, se seleccionaron secuencias de referencia del gen *benA* para la reconstrucción filogenética.

6.7 RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA

Se realizó la reconstrucción filogenética con las secuencias de los 71 aislados de *Aspergillus* spp. estudiados y las secuencias de referencia del gen *benA*, correspondientes a diferentes especies de las secciones *Fumigati*, *Nigri*, *Flavi*, *Terrei*, *Circumdati* y *Usti*. Como grupo externo se utilizó una secuencia de *Penicillium flavigenum* (No. acceso AY495995.1).

Las secuencias obtenidas en formato FASTA se editaron con el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) resultando una secuencia consenso, la cual fue utilizada para la construcción filogenética.

Para realizar el alineamiento múltiple de las secuencias, se obtuvo un único archivo en formato FASTA con ayuda del programa UGENE 1.14 (<http://ugene.unipro.ru>). Se realizó una traducción reversa con el programa MEGA 6, a partir de esta secuencia de aminoácidos se obtuvo la secuencia de DNA utilizando el código genético de *A. fumigatus* (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html). Una vez obtenidas estas secuencias se evaluaron cinco alineamientos múltiples: CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), MUSCLE (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/), MAFFT (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/), KALIGN (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/) y MULTALIN

(<http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/multalin.py>) en el programa GENEDOC (<http://genedoc.software.informer.com/2.7/>). El mejor alineamiento obtenido fue editado con el programa GENEDOC. Posteriormente se eligió el mejor modelo evolutivo con el programa JMODELTEST 2.1.3 (<https://code.google.com/p/jmodeltest2/>), tomando en cuenta los criterios: verosimilitudes, criterio de información de AKAIKE (AIC), criterio de información Bayesiana (BIC) y la teoría de decisiones (DT). Por último se llevó a cabo la construcción del árbol filogenético por los métodos de máxima verosimilitud, UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e inferencia bayesiana. Para máxima verosimilitud y UPGMA se utilizó el programa MEGA6 (MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 6.0) y el programa Mr. Bayes para la inferencia bayesiana (<http://mrbayes.sourceforge.net>).

7. RESULTADOS

7.1 CULTIVOS MONOSPÓRICOS

Se obtuvieron cultivos monospóricos de los 71 aislados de *Aspergillus* spp. incluidos en el estudio y se preservaron como se describió en material y métodos.

7.2 EXTRACCIÓN DE DNA

De acuerdo con el análisis espectrofotométrico y electroforético, la cantidad e integridad de los DNAs obtenidos, correspondientes a los 71 aislados ambientales de *Aspergillus* spp. fue adecuada para los ensayos de PCR. Las lecturas realizadas en espectrofotómetro mostraron concentraciones entre 9.8 y 365 ng/μL, con una pureza adecuada (Tabla 4). A pesar que no todos los valores de la relación de absorbancia a 260 y 280 nm, se encontraron entre 1.7-1.9, valor que indica que una muestra de DNA es pura, en el corrimiento electroforético se observó una sola banda (Figura 2), lo que corroboró la calidad de los DNAs. Así mismo, las concentraciones de DNA, determinadas por comparación con

diferentes concentraciones de fago λ , concordaron con las determinadas por espectrofotometría. Los DNAs obtenidos de cada uno de los aislados de *Aspergillus* spp. se diluyeron a 10 ng/ μ L con agua Milli Q y se verificó la concentración por electroforesis (Figura 3).

Tabla 4. Cuantificación por espectrofotometría de los 71 DNAs obtenidos de los aislados ambientales *Aspergillus* spp.

AISLADO	CONCENTRACIÓN		AISLADO	CONCENTRACIÓN	
	(ng/ μ L)	A260/A280		(ng/ μ L)	A260/A280
392A	16.35	1.65	444D	40.65	1.9
270B	20.24	1.78	369B	18.65	1.85
312B	18.7	1.93	257C	34.6	1.89
411A	56.2	1.83	235A	76.23	1.75
100A	13.25	1.77	222A	27.5	1.6
262A	10.05	1.69	9A	34.2	1.92
394A	9.8	1.9	176A	28.6	1.83
B21	21.25	1.59	233A	27.35	1.76
B18	66.15	1.82	A10	323.25	1.82
385B	34.8	1.97	A35	43.85	1.77
B11	73.85	1.87	A36	162.05	1.98
435A	40.75	1.98	A28	23.6	1.76
373C	13.35	1.76	A26	147.65	1.86
B4	35.2	1.64	284B	274.35	1.78
B20	56.87	1.89	A13	365.05	1.93
B39	90.45	1.64	31E	42.7	1.65
B27	45.3	1.76	220A	63.55	1.81
373A	18.8	1.68	217A	34.87	1.9
140A	24.7	1.98	243A	28.9	1.61
412A	54.6	1.69	381D	73.65	1.72
87B	54.87	1.78	312A	17.85	1.81
360B	36.3	1.92	314B	22.7	1.77
387A	23.55	1.63	A25	80.38	1.84
B52	56.4	1.75	335B	31.6	1.77
264A	15.45	1.82	87A	65.32	1.73
B49	43.6	1.71	A15	45.5	1.85
B12	44.8	1.98	A38	40	1.9
88C	25.6	1.64	24B	76.3	1.77

395A	23.67	1.83	A17	49.1	1.62
312A	65.2	1.66	202B	65.3	1.8
323C	73.65	1.67	A40	23.91	1.91
55C	22.45	1.83	A39	65.1	1.76
370B	18	1.65	88C	36.45	1.8
57B	20.05	1.82	237C	43.86	1.92
B5	65.8	1.65	202A	27.3	1.58
283A	55.96	1.67	237B	84.3	1.83
343B	74.45	1.92			

A260/A280: cociente de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm

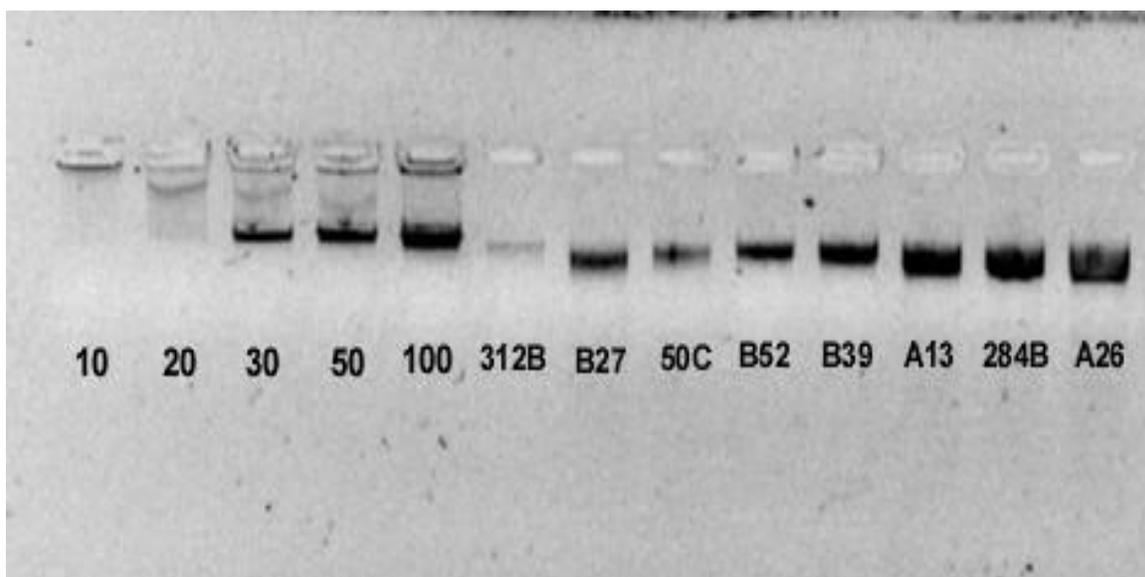


Figura 2. Cuantificación del DNA obtenido de aislados de *Aspergillus* spp. por electroforesis. La cuantificación se realizó comparando las muestras de DNA con diferentes concentraciones (10, 20, 30, 50 y 100 ng/μL) de DNA del fago λ (primeros cinco carriles). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed.

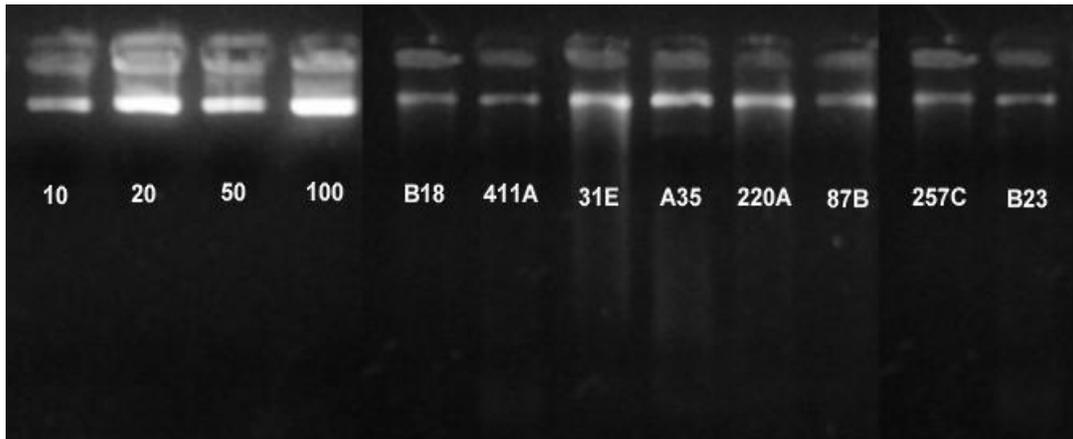


Figura 3. Cuantificación de DNAs ajustados a 10 ng/ μ L. DNAs obtenidos de aislados de *Aspergillus* spp., ajustado a 10 ng/ μ L. La cuantificación se llevó a cabo por comparación con diferentes concentraciones (10, 20, 50, y 100 ng/ μ L) de DNA del fago λ (cuatro primeros carriles). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed.

7.3 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA PARCIAL DEL GEN *benA*

La amplificación del fragmento del gen *benA* con las condiciones descritas por Glass y Donaldson (27) no resultó óptima, ya que aunque se observaron los amplicones del tamaño esperado (500 bp), la intensidad de los mismos fue débil (Figura 4). Por lo que fue necesario estandarizar las condiciones de reacción mediante la realización de curvas de concentración de DNA, dNTPs, MgCl₂ y oligonucleótidos, así como probar diferentes temperaturas de alineamiento.

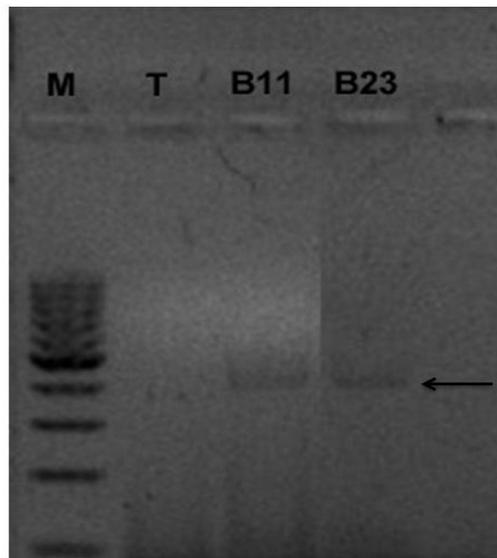


Figura 4. Amplificación de la secuencia parcial del gen *benA* con las condiciones descritas por Glass y Donaldson (1995). La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed, a 100V. M: marcador de tamaño molecular de 100 bp. T: testigo negativo.

CURVA DE CONCENTRACIÓN DE DNA

La estandarización para la amplificación de la secuencia parcial del gen *benA* se inició con una curva de DNA, en donde se probaron 1, 5, 10 y 20 ng/ μ L de DNA. Esta curva se llevó a cabo con dos DNAs obtenidos de diferentes aislados, y en ambos casos la amplificación del fragmento de 500 bp se observó con las cuatro concentraciones de DNA probadas; sin embargo, con 10 ng/ μ L el amplicón es más nítido (Figura 5). Este resultado fue reproducible cuando se amplificaron DNAs diferentes, por lo que se seleccionó la concentración de 10 ng/ μ L para continuar con la estandarización de la PCR.

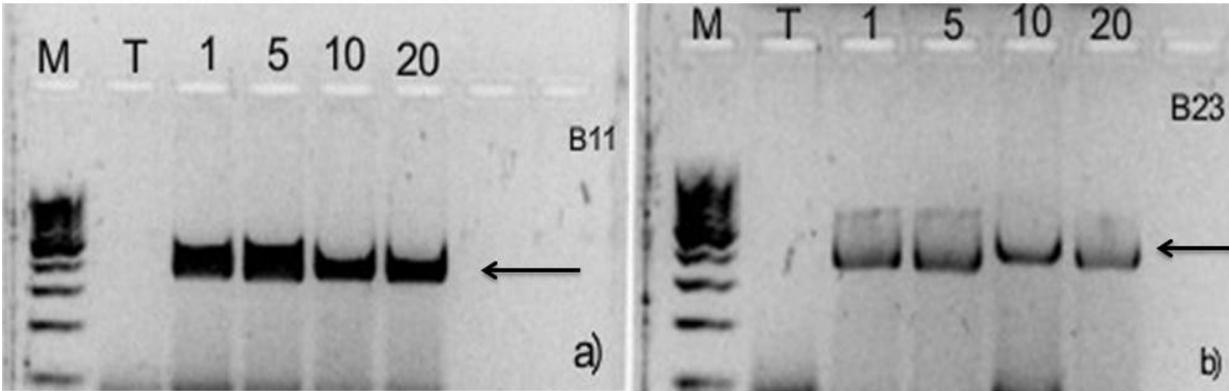


Figura 5. Curva de concentración de DNA. La curva se realizó probando las concentraciones de 1, 5, 10 y 20 ng/μL de dos DNAs obtenidos de los aislados a) B11 y b) B23. La flecha señala el amplicón de 500 bp. M: Marcador de tamaño molecular (100 bp). T: testigo negativo.

CURVA DE CONCENTRACIÓN DE dNTPs

La curva se realizó con 50, 100, 150 y 200 μM de dNTPs. La amplificación del fragmento de 500 bp se observó con las cuatro concentraciones probadas; sin embargo, se eligió la concentración de 200 μM para continuar los ensayos de estandarización de la PCR, ya que a esta concentración la banda se observa más definida (Figura 6).

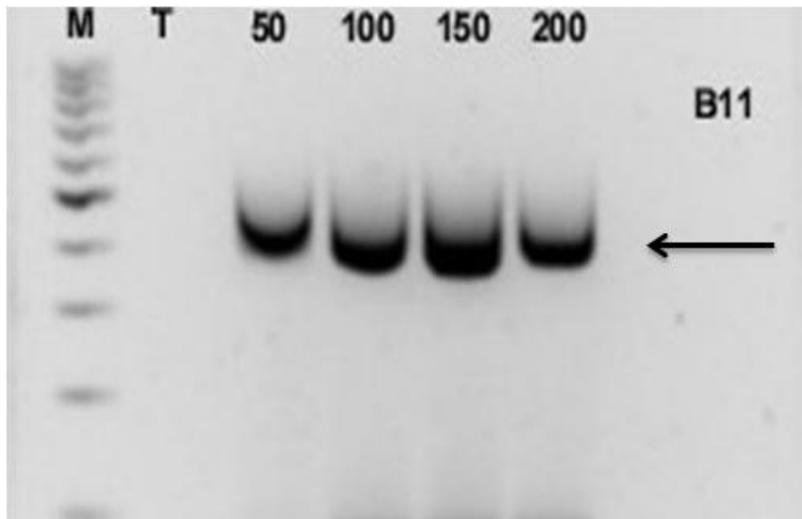


Figura 6. Curva de concentración de dNTPs. La curva se realizó amplificando el DNA del aislado B11, con 50, 100, 150 y 200 μM de cada dNTP. La flecha señala el amplicón de 500 bp. M: Marcador de tamaño molecular (100 bp). T: testigo negativo.

CURVA DE CONCENTRACIÓN DE MgCl₂

En la curva de MgCl₂, se probaron las concentraciones 1, 1.5, 1.7 y 2 mM. El amplicón de 500 bp se observó con 1, 1.5 y 1.7 mM de MgCl₂, de las cuales la concentración óptima fue 1.5 mM, ya que la banda se visualizó mejor (Figura 7), por lo que se seleccionó esta concentración de MgCl₂ para continuar la estandarización de la PCR.

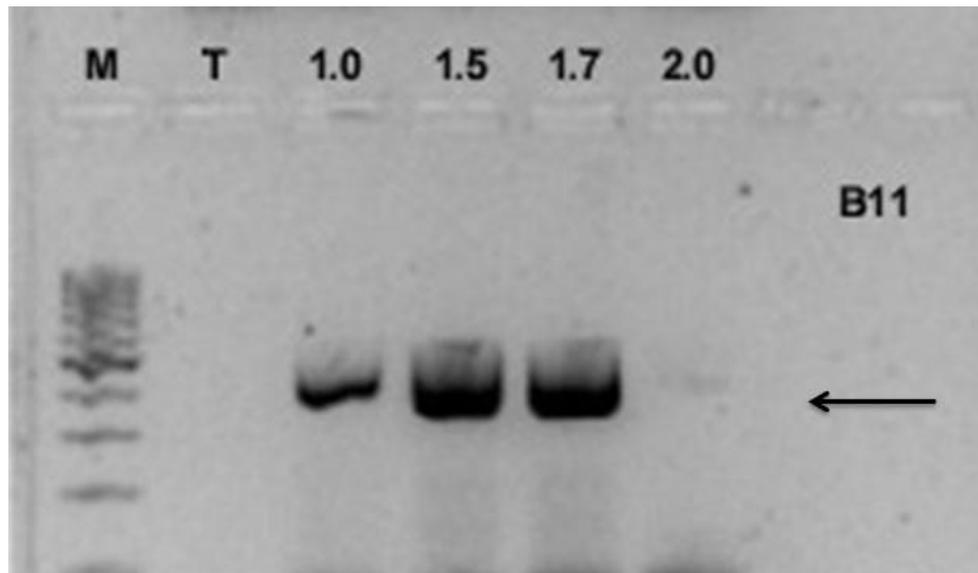


Figura 7. Curva de concentración de MgCl₂. La curva se realizó amplificando el DNA del aislado B11 con concentraciones de 1, 1.5, 1.7 y 2 mM de MgCl₂. La flecha señala el amplicón de 500 bp. M: Marcador de tamaño molecular (100 bp). T: testigo negativo.

CURVA DE CONCENTRACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para la curva de oligonucleótidos se utilizaron 10, 30, 50, 100 y 200 pmol/ μ L de cada uno. La amplificación del fragmento de 500 bp se observó con todas las concentraciones probadas; sin embargo, se eligió la de 30 pmol/ μ L, ya que a esta concentración se visualizó mejor el amplicón (Figura 8).

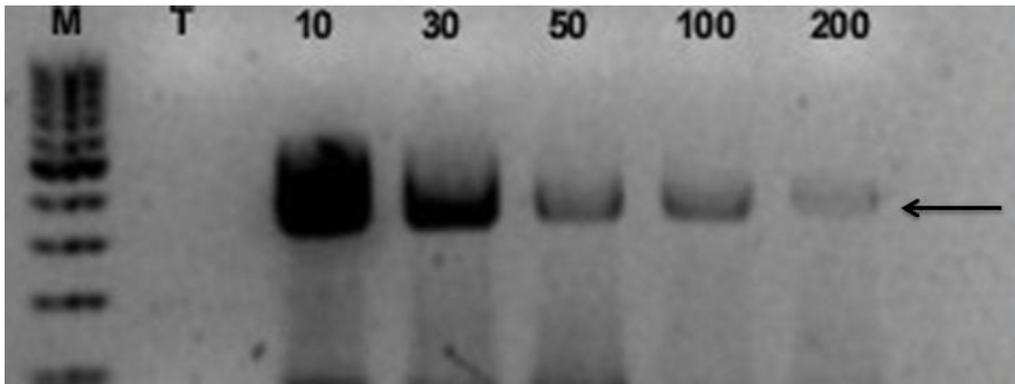


Figura 8. Curva de concentración de oligonucleótidos. La curva se realizó probando 10, 30, 50, 100 y 200 pmol/ μ L de cada oligonucleótido (Bt2a y Bt2b). La flecha señala amplicón de 500 bp. M: Marcador de tamaño molecular (100 bp). T: testigo negativo.

CURVA DE TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO

Finalmente, se realizaron ensayos de amplificación a 56°, 57°, 58° y 59°C como temperatura de alineamiento. La amplificación se hizo con dos DNAs obtenidos de diferentes aislados y se observó el amplicón de 500 bp con todas las temperaturas probadas (Figura 9); sin embargo, a 58°C los amplicones fueron más definidos y nítidos, por lo que la posterior amplificación de todos los aislados se realizó a esta temperatura de alineamiento.

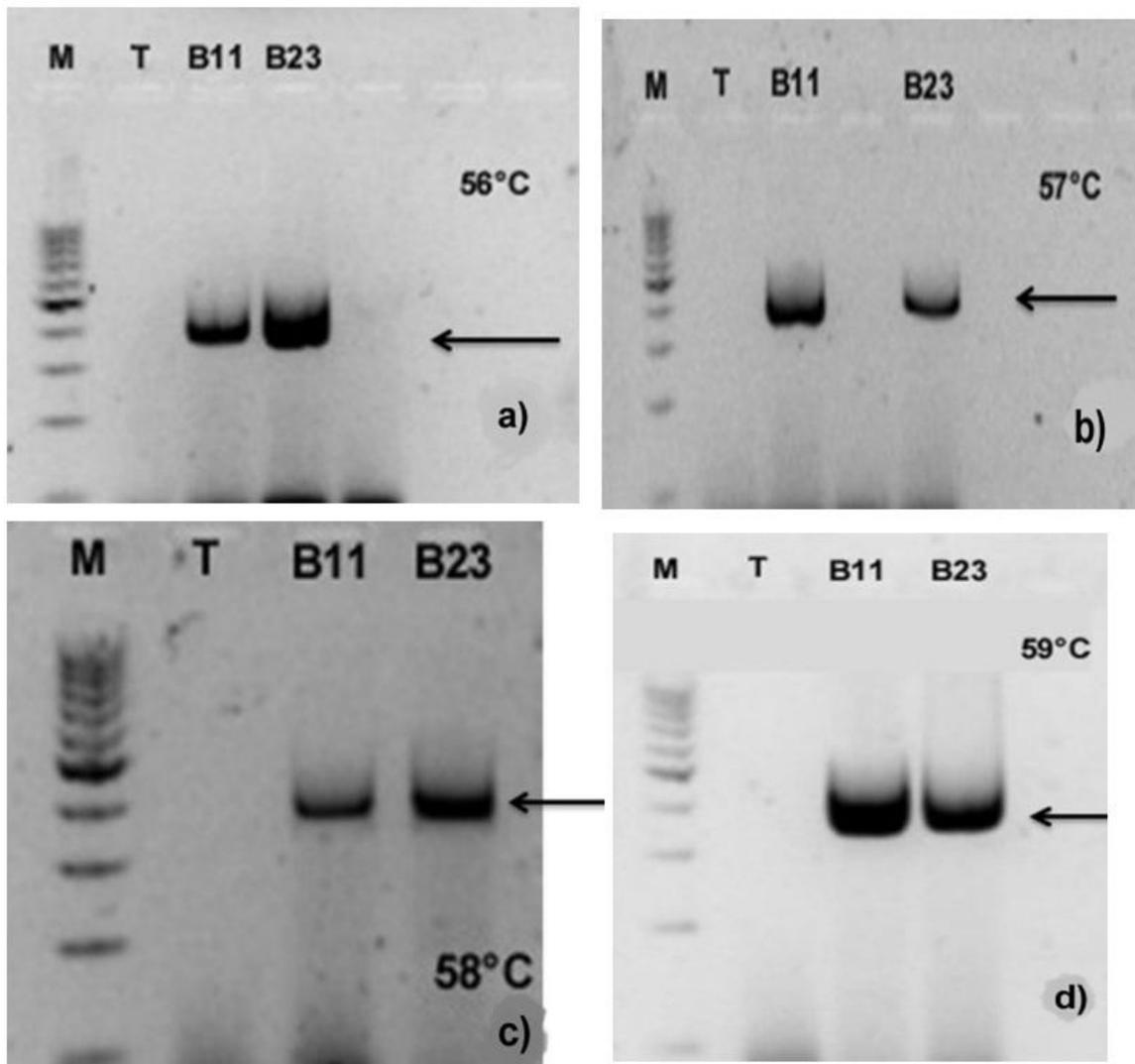


Figura 9. Curva de temperatura de alineamiento. Para la amplificación de la secuencia parcial del gen *benA*, las temperaturas probadas fueron: a) 56°C, b) 57°C, c) 58°C y d) 59°C. La flecha señala el amplicon de 500 bp. M: Marcador de tamaño molecular (100 bp). T: testigo negativo.

Con base en los resultados de las curvas de reactivos y temperatura de alineamiento, se determinaron las condiciones óptimas para la amplificación de la secuencia parcial del gen *benA*, estas fueron: DNA 10 ng/ μ L, dNTPs 200 μ M, MgCl₂ 1.5 mM, oligonucleótidos 30 pmol/ μ L de cada uno, en amortiguador 1X y 1U *Taq* polimerasa, en un volumen final de reacción de 25 μ L y una temperatura de alineamiento de 58°C. Con estas condiciones se logró la amplificación de todos los

DNAs de los aislados ambientales de *Aspergillus* spp., obteniendo el amplicón esperado de 500 bp (Figura 10).

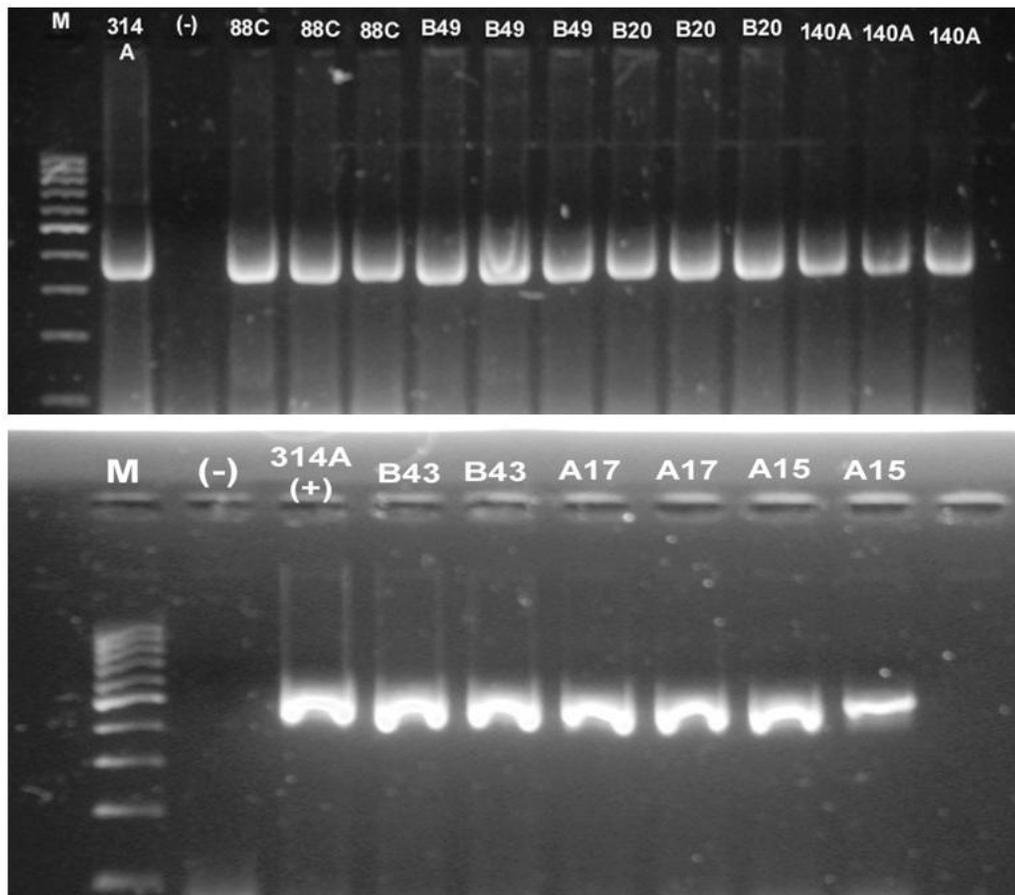


Figura 10. Amplificación de la secuencia parcial del gen *benA* con las condiciones óptimas de reacción. Utilizando DNAs obtenidos de aislados de *Aspergillus* spp. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed, a 100V.

7.4 PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DEL GEN *benA*

Después del proceso de purificación, los fragmentos de 500 bp se obtuvieron a una concentración de 10-100 ng/ μ L (Figura 11), la cual fue suficiente para la secuenciación.

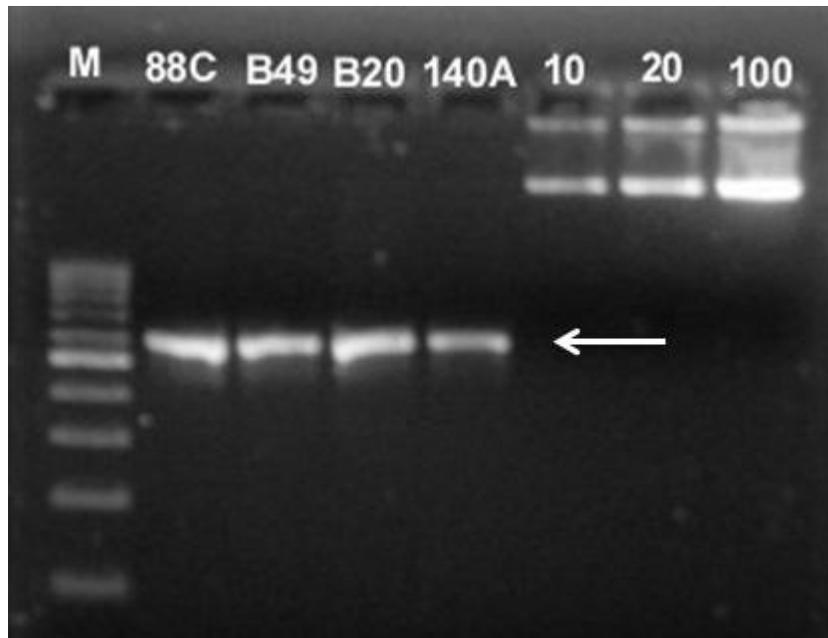


Figura 11. Purificación de los fragmentos amplificados del gen *benA*, obtenidos de los aislados de *Aspergillus* spp. Los fragmentos se cuantificaron comparando con diferentes concentraciones (10, 20 y 100 ng/ μ L) de fago λ . La flecha señala el amplicón esperado de 500 bp. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

7.5 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

La calidad de las secuencias obtenidas fue adecuada, ya que en los electroferogramas se observaron picos altos y bien definidos (Figura 12).

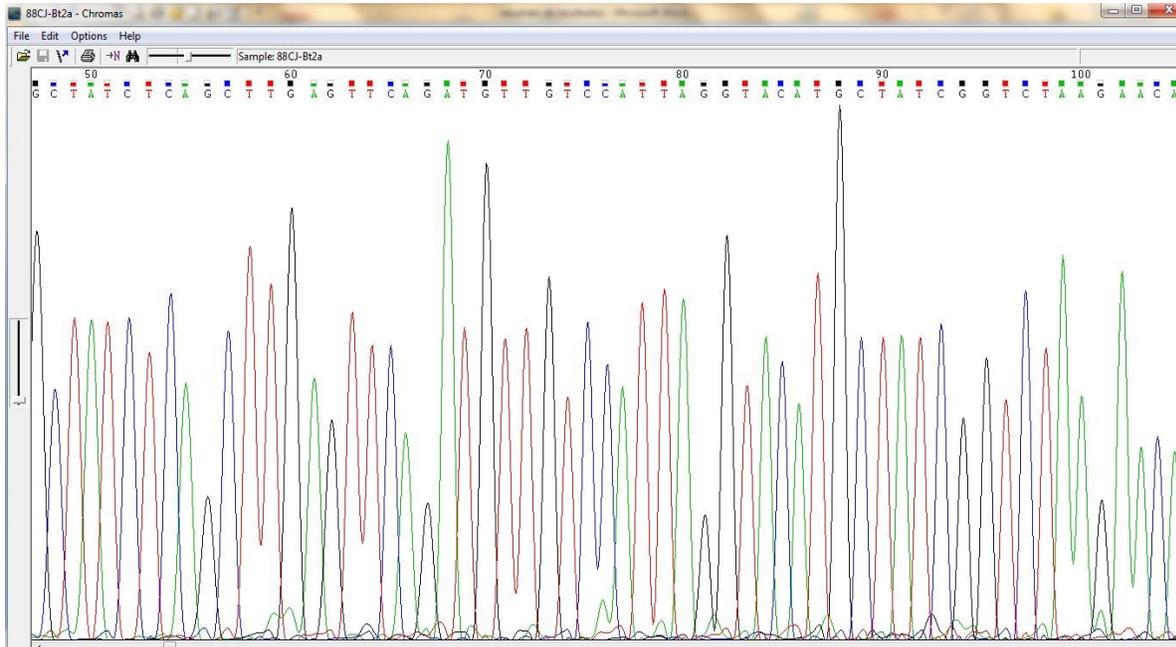


Figura 12. Electroferograma de la secuencia del fragmento del gen *benA*. Obtenida de un aislado de *Aspergillus* sp. La secuencia se obtuvo con el oligonucleótido Bt2a.

El alineamiento de las secuencias de los 71 aislados de *Aspergillus* spp. con las secuencias depositadas en el GenBank, mostró que todos los aislados presentaron similitud con secuencias del gen *benA* de diferentes especies de *Aspergillus* (Figura 13) (Tablas 5 y 6).

7.6 IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [You Tube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#)

803324 (538 letters)

RID [FTDY6UC8015](#) (Expires on 03-10 04:57 am)

Query ID [Id|Query_26417](#)

Description 803324

Molecule type nucleic acid

Query Length 538

Database Name nr

Description Nucleotide collection (nt)

Program BLASTN 2.2.31+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments

Color key for alignment scores

Score Range	Color
<40	Black
40-50	Blue
50-80	Green
80-200	Purple
>=200	Red

Query 1 100 200 300 400 500

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Aspergillus fumigatus strain RC2195 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	909	909	91%	0.0	100%	KM507484.1

Figura 13. Ejemplo del alineamiento de las secuencias incluidas en el estudio con las depositadas en el GenBank. En el alineamiento se observa la posición en la que coincide la secuencia problema con las secuencias de la base de datos, el número de acceso de éstas y el porcentaje de homología encontrado.

Tabla 5. Comparación de las secuencias de los aislados ambientales de *Aspergillus* spp. recuperados del Hospital Juárez de México con las secuencias depositadas en el GenBank.

Aislado HJM	Clasificación	% Similitud con secuencia de referencia (No. acceso GenBank)
392A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	95% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175506)
270B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175505)
312B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. fumigatus</i> (KM507484)
411A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175518)
100A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	87% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175515)
262A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	87% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175517)
394A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	96% con <i>A. neoellipticus</i> (KJ527269)
B21	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175518)
B18	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. fumigatus</i> (KM507484)
385B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175504)
B11	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	94% con <i>A. fumigatus</i> (KJ136109)
435A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	88% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175514)
373C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. neoellipticus</i> (KJ175515)
B4	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	91% con <i>A. fumigatus</i> (KM507484)
B20	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. fumigatus</i> (KM507484)
B39	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	94% con <i>A. tubingensis</i> (KF434117)
B27	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	93% con <i>A. tubingensis</i> (KF434112)
373A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	91% con <i>A. tubingensis</i> (KJ136082)
140A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	93% con <i>A. acidus</i> (KC433674)
412A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	89% con <i>A. tubingensis</i> (JX545086)
87B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	94% con <i>A. niger</i> (HQ632702)
360B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	77% con <i>A. niger</i> (DQ768450)
387A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	91% con <i>A. niger</i> (KJ136075)
B52	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	95% con <i>A. tubingensis</i> (KJ136086)
264A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	92% con <i>A. tubingensis</i> (HQ632719)
B49	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	90% con <i>A. niger</i> (JX545077)
B12	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	97% con <i>A. niger</i> (QH632680)
88C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	96% con <i>A. niger</i> (KF669408)
395A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	93% con <i>A. tubingensis</i> (JX545082)
323C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	90% con <i>A. flavus</i> (KJ482657)
55C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	93% con <i>A. flavus</i> (KJ136090)
370B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	92% con <i>A. flavus</i> (KF669492)

57B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	92% con <i>A. flavus</i> (KF434080)
B5	<i>Aspergillus</i> sección <i>Terrei</i>	91% con <i>A. terreus</i> (FJ491708)
444D	<i>Aspergillus</i> sección <i>Terrei</i>	91% con <i>A. ochraceus</i> (KJ767724)
369B	<i>Aspergillus</i> sp.	93% con <i>A. flavus</i> (HF570039)

Tabla 6. Comparación de las secuencias de los aislados ambientales de *Aspergillus* spp. obtenidos del Instituto de Oftalmología IAP Conde de Valenciana con las secuencias depositadas en el GenBank.

Aislado HCV	Clasificación	% Similitud con secuencia de referencia (No. acceso GenBank)
257C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	95% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175514)
235A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	91% con <i>A. fumigatus</i> (KM507484)
222A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	84% con <i>A. neoellipticus</i> (KJ527266)
9A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	87% con <i>A. neoellipticus</i> (KJ527269)
176A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	92% con <i>A. fumigatus</i> (KJ136108)
233A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	91% con <i>A. fumigatus</i> (KM507484)
A10	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	94% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175508)
A35	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. fumigatus</i> (HQ285501)
A36	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	93% con <i>A. fumigatus</i> (GQ376140)
A28	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	95% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175515)
24B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	90% con <i>A. fumigatus</i> (KJ175505)
A26	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	93% con <i>A. tubingensis</i> (JX545082)
284B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	93% con <i>A. tubingensis</i> (JX545082)
A13	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	91% con <i>A. tubingensis</i> (KJ136086)
31E	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	93% con <i>A. niger</i> (KC175288)
220A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	92% con <i>A. tubingensis</i> (JX545082)
217A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	93% con <i>A. tubingensis</i> (KJ136086)
243A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	91% con <i>A. tubingensis</i> (KJ136086)
381D	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	94% con <i>A. niger</i> (JX545078)
312A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	92% con <i>A. awamori</i> (KJ777804)
314B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	93% con <i>A. niger</i> (KJ136065)
A25	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	91% con <i>A. niger</i> (EF422213)
335B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	96% con <i>A. niger</i> (HQ632661)
87A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	91% con <i>A. flavus</i> (KJ136096)
A15	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	92% con <i>A. flavus</i> (KF434079)
A38	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	91% con <i>A. oryzae</i> (HQ285518)

A17	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	92% con <i>A.oryzae</i> (HQ285506)
202B	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	91% con <i>A. acidus</i> (KC433674)
A40	<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	92% con <i>A. flavus</i> (HQ285485)
A39	<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	93% con <i>A. niger</i> (KM189806)
237C	<i>Aspergillus</i> sección <i>Terrei</i>	92% con <i>A. ochraceus</i> (KJ767724)
202A	<i>Aspergillus</i> sección <i>Terrei</i>	92% con <i>Penicillium</i> (JQ965098)
237B	<i>Aspergillus</i> sp.	75% con <i>A. tubingensis</i> (KJ136088)
283A	<i>Aspergillus</i> sp.	90% con <i>A. calidoustus</i> (KJ868723)
343B	<i>Aspergillus</i> sp.	91% con <i>A. calidoustus</i> (HG931682)

Con base en estos resultados se utilizaron las secuencias de referencia enlistadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencias del gen *benA* tomadas del GenBank como referencia para el análisis filogenético.

Especie	Número de acceso GenBank	Especie	Número de acceso GenBank
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KJ175505.1	<i>Aspergillus acidus</i>	KC433674.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KJ175515.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	KJ136086.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KJ136108.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	KJ136088.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KJ175504.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	HQ632719.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KJ175506.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	KJ136082.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KJ136109.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	JX545086.1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	HQ285501.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	KF434112.1
<i>Aspergillus neoellipticus</i>	KJ527269.1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	KF434117.1
<i>Aspergillus neoellipticus</i>	KJ527266.1	<i>Aspergillus flavus</i>	KJ136090.1
<i>Aspergillus niger</i>	KC175288.1	<i>Aspergillus flavus</i>	KJ136096.1
<i>Aspergillus niger</i>	KF669408.1	<i>Aspergillus flavus</i>	KF434080.1
<i>Aspergillus niger</i>	KJ136065.1	<i>Aspergillus flavus</i>	HF570039.1
<i>Aspergillus niger</i>	KJ136075.1	<i>Aspergillus oryzae</i>	HQ285506.1
<i>Aspergillus niger</i>	HQ632661.1	<i>Aspergillus oryzae</i>	HQ285518.1
<i>Aspergillus niger</i>	HQ632680.1	<i>Aspergillus ochraceus</i>	KJ767724.1
<i>Aspergillus niger</i>	JX545077.1	<i>Aspergillus calidoustus</i>	KJ868723.1
<i>Aspergillus niger</i>	DQ768450.1	<i>Aspergillus terreus</i>	FJ491708.1
<i>Aspergillus awamori</i>	KJ777804.1		

7.7 RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA

Después de evaluar los cinco alineamientos múltiples, se eligió Clustal W como el mejor alineamiento. De acuerdo con el resultado del programa JMODELTEST, el mejor modelo evolutivo fue el HKY+G. Con este modelo, se construyeron tres dendrogramas con base en las secuencias parciales del gen *benA*, utilizando los métodos de: inferencia bayesiana, UPGMA y máxima verosimilitud. La estimación de la fiabilidad de los dendrogramas se hizo mediante un análisis de “bootstrap” con 1000 repeticiones, solo los valores mayores a 70% son mostrados en los nodos del dendrograma. En el dendrograma por inferencia bayesiana se observa la formación de 7 grupos (Figura 14): Los grupos 1 y 1a, con soporte de 100 y 90%, respectivamente, fueron integrados por las secuencias de los 26 aislados clasificados como *A. sección Fumigati*, así como las secuencias de referencia correspondientes a la sección *Fumigati* (*A. fumigatus* y *A. neoellipticus*), esta agrupación corroboró la identificación de los aislados para los grupos 1 y 1a, respectivamente. Además el aislado 394A se identificó como *A. neoellipticus*. Los grupos 2, 2a y 2b, con valores de bootstrap de 100%, incluyeron las secuencias de referencia de las especies *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. acidus* y *A. awamori* de la sección *Nigri*, las secuencias de los 28 aislados clasificados morfológicamente como *Aspergillus* sección *Nigri* y la de un aislado (237B) de *Aspergillus* sp. Esta agrupación corroboró la identidad de 6 aislados como *A. niger* (387A, B49, 31E, B12, A39 y 381D), mientras que 16 aislados (A26, 284B, A13, 243A, 314B, A25, 335B, B39, B27, 373A, 412A, 87B, B52, 264A, 88C y 395A) se definieron como *A. tubingensis*, un aislado fue definido como *A. awamori* (312A) y 6 aislados que sólo se ubicaron a nivel de sección (140A, 360B, 220A, 217A, 202B, y 237B). El grupo 3, correspondió a la sección *Circumdati*, en el que se agruparon con valor de bootstrap de 100%, la secuencia de referencia de *A. ochraceus* y la del aislado 237C que no había podido ser clasificado fenotípicamente. El grupo 4, muestra la sección *Usti*, con un soporte de 100%, integrado por la secuencia de referencia de *A. calidoustus* y un aislado (343B), que previamente no había podido ser clasificado con base en su macro y micromorfología. Los grupos 5, 5a y 5b, correspondieron a la sección *Flavi* con valores de bootstrap de 100, 70 y 100%,

respectivamente. En estos grupos se incluyeron las secuencias de referencia correspondientes a *A. flavus* y *A. oryzae*, así como las 9 secuencias de los aislados clasificados fenotípicamente como *Aspergillus* sección *Flavi*, la secuencia de un aislado no identificado (369B) y una secuencia de referencia de la sección *Terrei*. Con esta agrupación, la identidad de cuatro aislados (A15, A38, 55C, 57B) se corroboró como *A. flavus*, además un aislado (369B) que no había sido identificado se clasificó como *A. flavus*, dos aislados (323C y A17) fueron identificados como *A. oryzae* y tres aislados no pudieron ser identificados (87A, A40, y 370B). El grupo 6, con soporte de 100%, incluyó únicamente dos aislados (B5 y 444D), clasificados como *Aspergillus* sección *Terrei*. Finalmente, con un soporte de 100%, un aislado de *Aspergillus* sp. (283A), formó un grupo diferente, impidiendo su identificación. El aislado 202A, que había sido clasificado como *A.* sección *Terrei*, se agrupó con la secuencia de *P. flavigenum* (grupo externo), ubicándolo en el género *Penicillium* y no en *Aspergillus*.

Por el método de UPGMA se observa la formación de 7 grupos (Anexo 1): Los grupos 1, 1a y 1b con soporte de 100, 96 y 100%, respectivamente fueron integrados por las secuencias de los 26 aislados clasificados como *A.* sección *Fumigati*, así como las secuencias de referencia correspondientes a la sección *Fumigati* (*A. fumigatus* y *A. neoellipticus*). Los grupos 2, 2a, 2b, 2c, 2d y 2e con valores de bootstrap de 100 y 99% incluyeron las secuencias de referencia de las especies *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. acidus* y *A. awamori* de la sección *Nigri*, las secuencias de los 28 aislados clasificados morfológicamente como *Aspergillus* sección *Nigri* y la de un aislado (237B) de *Aspergillus* sp. Esta agrupación corroboró la identidad de 3 aislados como *A. niger* (B49, 381D y B27), mientras que 8 aislados (A26, 284B, A13, 243A, B39, 373A, 412A y 264A) se definieron como *A. tubingensis* y 17 aislados que sólo se ubicaron a nivel de sección (335B, 237B, 360B, A39, 31E, B12, 312A, 395A, B52, A25, 88C, 87B, 314B, 220A, 217A, 140A y 202B). El grupo 3, correspondió a la sección *Circumdati*, en el que se agruparon con valor de bootstrap de 100%, la secuencia de referencia de *A. ochraceus* y la del aislado 237C que no había podido ser clasificado fenotípicamente. El grupo 4, muestra la sección *Usti*, con un

soporte de 100%, integrado por la secuencia de referencia de *A. calidoustus* y un aislado (343B), que previamente no había podido ser clasificado con base en su macro y micromorfología. Los grupos 5, 5a, 5b y 5c correspondieron a la sección *Flavi* con valores de bootstrap de 99, 100, 100 y 70%, respectivamente. En estos grupos se incluyeron las secuencias de referencia correspondientes a *A. flavus* y *A. oryzae*, así como las 9 secuencias de los aislados clasificados fenotípicamente como *Aspergillus* sección *Flavi*, la secuencia de un aislado no identificado (369B) y una secuencia de referencia de la sección *Terrei*. Con esta agrupación, la identidad de cuatro aislados (A15, A38, 55C, 57B) se corroboró como *A. flavus*, además un aislado (369B) que no había sido identificado se clasificó como *A. flavus*, dos aislados (323C y A17) fueron identificados como *A. oryzae* y tres aislados no pudieron ser identificados (87A, A40, y 370B). El grupo 6, con soporte de 95%, incluyó únicamente dos aislados (B5 y 444D), clasificados como *Aspergillus* sección *Terrei*. Finalmente, un aislado de *Aspergillus* sp. (283A), formó un grupo diferente, impidiendo su identificación. El aislado 202A, que había sido clasificado como *A.* sección *Terrei*, se agrupó con la secuencia de *P. flavigenum* (grupo externo), ubicándolo en el género *Penicillium* y no en *Aspergillus*.

Por el método de máxima verosimilitud se observa la formación de 7 grupos (Anexo 1): Los grupos 1, 1a y 1b con soporte de 99, 100 y 97%, respectivamente fueron integrados por las secuencias de los 26 aislados clasificados como *A.* sección *Fumigati*, así como las secuencias de referencia correspondientes a la sección *Fumigati* (*A. fumigatus* y *A. neoellipticus*), el aislado 394A se identificó como *A. neoellipticus*. Los grupos 2, 2a, 2b, 2c y 2d con valores de bootstrap de 73, 88, 99, 99 y 88% respectivamente, incluyeron las secuencias de referencia de las especies *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. acidus* y *A. awamori* de la sección *Nigri*, las secuencias de los 28 aislados clasificados morfológicamente como *Aspergillus* sección *Nigri* y la de un aislado (237B) de *Aspergillus* sp. Esta agrupación corroboró la identidad de 6 aislados como *A. niger* (387A, B49, 381D, 373A, 395A y B52), mientras que 7 aislados (A13, 284B, 243A, 264A, A26, 412A, y B27) se definieron como *A. tubingensis* y 15 aislados que sólo se ubicaron a nivel de

sección (140A, 314B, 87B, 88C, A25, 202B, 217A, 220A, 312A, B12, 340B, 31E, A39, 335B y B39). El grupo 3, correspondió a la sección *Circumdati*, en el que se agruparon con valor de bootstrap de 100%, la secuencia de referencia de *A. ochraceus* y la del aislado 237C que no había podido ser clasificado fenotípicamente. El grupo 4, muestra la sección *Usti*, con un soporte de 100%, integrado por la secuencia de referencia de *A. calidoustus* y un aislado (343B), que previamente no había podido ser clasificado con base en su macro y micromorfología. Los grupos 5, 5a, 5b y 5c correspondieron a la sección *Flavi* con valores de bootstrap de 99, 100, 100 y 70%, respectivamente. En estos grupos se incluyeron las secuencias de referencia correspondientes a *A. flavus* y *A. oryzae*, así como las 9 secuencias de los aislados clasificados fenotípicamente como *Aspergillus* sección *Flavi*, la secuencia de un aislado no identificado (369B) y una secuencia de referencia de la sección *Terrei*. Con esta agrupación, la identidad de cuatro aislados (A15, A38, 55C, 57B) se corroboró como *A. flavus*, además un aislado (369B) que no había sido identificado se clasificó como *A. flavus*, dos aislados (323C y A17) fueron identificados como *A. oryzae* y tres aislados no pudieron ser identificados (87A, A40, y 370B). El grupo 6, con soporte de 95%, incluyó únicamente dos aislados (B5 y 444D), clasificados como *Aspergillus* sección *Terrei*. Finalmente, un aislado de *Aspergillus* sp. (283A), formó un grupo diferente, impidiendo su identificación. El aislado 202A, que había sido clasificado como *A.* sección *Terrei*, se agrupó con la secuencia de *P. flavigenum* (grupo externo), ubicándolo en el género *Penicillium* y no en *Aspergillus*.

La topología de los tres dendrogramas resultó similar (Figura 14, anexo 1); sin embargo, el que describe mejor la relación de las secuencias fue el obtenido por el método de inferencia bayesiana ya que describió mejor el estatus taxonómico de los aislados estudiados.

Figura 14. Dendrograma de la secuencia parcial del gen *benA* obtenido por el método de inferencia bayesiana. Los porcentajes $\geq 70\%$ de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados en cada nodo. El dendrograma se enraizó usando como grupo externo una secuencia de *Penicillium flavigenum*. Las secciones se resaltan en color amarillo (*Fumigati*), verde (*Nigri*), azul marino (*Flavi*), rosa (*Circumdati*), morado (*Usti*) y azul (*Terrei*).

8. Discusión

Durante las últimas décadas, las infecciones fúngicas han adquirido mayor importancia debido al incremento en la notificación de casos, particularmente de las formas invasoras, de las cuales la AI ocupa el segundo lugar después de la candidiasis (45). Actualmente, la existencia de casos de micosis invasoras de origen nosocomial, presentados en forma de brotes y ligados a la contaminación de determinadas zonas del medio hospitalario, afectando a los pacientes inmunocomprometidos, quienes son especialmente vulnerables a la infección por *Aspergillus* sp., con tasas de mortalidad significativas, por lo que resulta importante determinar cuáles son las especies de *Aspergillus* que prevalecen en el ambiente intrahospitalario en México, ya que éstas pueden ser en algún momento las causantes de infección, principalmente en pacientes neutropénicos, como lo demuestran algunos reportes sobre brotes de aspergilosis nosocomial (18, 23, 47). Actualmente, la identificación fenotípica *Aspergillus* spp. es insuficiente para discriminar entre especies, debido a que varias de éstas, presentan morfología similar, por lo que se ha considerado que los resultados de la examinación morfológica deben conjuntarse con otros métodos, como es el análisis de las secuencias parciales de algunos genes, como *CaM*, ITS, rodlet A, *Act*, citocromo b y *benA* (14, 30, 33, 51, 55). De estos genes, *benA* ha sido reportado como un marcador filogenéticamente informativo (20, 26, 33). Por lo que en este trabajo, se

analizaron las secuencias parciales del gen *benA* de 71 aislados ambientales de *Aspergillus* spp., obtenidos de dos hospitales de la Ciudad de México, con el fin de identificar los aislados. Inicialmente, las secuencias de los aislados se editaron y compararon con todas las secuencias depositadas en la base de datos Genbank para corroborar que correspondían a una región del gen *benA* de *Aspergillus*, considerando el porcentaje de similitud (Tablas 6 y 7). La identificación de los aislados se realizó mediante la construcción de árboles filogenéticos, utilizando las secuencias del gen *benA* y los métodos inferencia bayesiana, UPGMA y máxima verosimilitud e incluyendo secuencias de referencia correspondientes a diferentes especies dentro de las secciones *Fumigati*, *Nigri*, *Flavi*, *Terrei*, *Usti* y *Circumdati*. Dado que el género *Aspergillus* es muy diverso, sólo se incluyeron secuencias de las secciones que se habían detectado en la identificación fenotípica previa al presente trabajo y con base en la similitud de secuencias encontrada en el GenBank. La topología de los tres dendrogramas construidos fue similar, sin embargo el dendrograma obtenido por el método de inferencia bayesiana describió mejor el estatus taxonómico de los aislados estudiados. El dendrograma muestra que el marcador *benA* discrimina claramente las especies de la sección *Fumigati* del resto de las secciones y especies, con un buen soporte (90-100%), asimismo, define bien la sección *Usti*; sin embargo, es insuficientemente informativo para diferenciar entre especies de las secciones *Flavi*, *Nigri*, *Terrei* y *Circumdati*. La escasa resolución entre las secciones *Circumdati*, *Niger* y *Flavi*, puede deberse a que, de acuerdo con la clasificación de Gams (25), en la que el género fue dividido en 18 secciones y seis subgéneros, el subgénero *Circumdati* contiene las secciones *Circumdati*, *Candidi*, *Cremeri*, *Flavi*, *Nigri*, *Sparsi* y *Wentii*, de tal manera que son secciones tan estrechamente relacionadas que el análisis de la secuencia del gen *benA* no es suficientemente informativa para diferenciarlas, generando la formación de politomías. Este resultado es incongruente con lo reportado por Krimitzas (36), quienes con sólo el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *benA* lograron discriminar claramente entre las especies pertenecientes a las secciones *Candidi*, *Cervini*, *Circumdati*, *Clavati*, *Flavi*, *Fumigati*, *Nigri*, *Raperi* y *Terrei*.

Por otro lado, la escasa resolución, particularmente entre las secciones *Flavi* y *Nigri*, también puede deberse a que las secuencias de referencia utilizadas, tomadas de la base de datos del GenBank, fueron obtenidas de aislados de otros países y dada la variabilidad genética en *Aspergillus* asociada al origen geográfico, es posible que este factor influya en las agrupaciones ambiguas observadas. Además, otra posible explicación sería que dado que en dicha base de datos no existe garantía de que la calidad de las secuencias es confiable, puede ser que se hayan elegido unas no muy confiables.

Nuestros resultados muestran que la filogenia fúngica basada solo en criterios morfológicos o en el análisis de secuencias de un solo gen no siempre logra elucidar el estatus taxonómico de los organismos estudiados, sino que se requiere mayor número de marcadores (10, 41). Incluso se recomienda incluir análisis fenotípicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares para una identificación certera. En este estudio, considerando criterios morfológicos y genotípicos, además de la reconstrucción filogenética, hubo aislados que no se definieron, como es el caso de los grupos 6 y 7. Asimismo, los estudios con base en un solo gen no siempre representan fielmente la historia de todo el genoma y las comparaciones pueden ser erróneas acerca de la relación de un hongo con los miembros de la misma especie o incluso el mismo género. Una limitante del trabajo fue el número de secuencias de referencia incluidas, ya que no se consideraron las secuencias de todas las secciones y mucho menos de todas las especies de cada sección, lo que probablemente impidió la identificación de algunos aislados que tampoco pudieron ser clasificados fenotípicamente, como es el caso del aislado 283A. Con respecto a los aislados que sí estaban identificados fenotípicamente, la correlación con la identificación genotípica fue congruente a nivel de sección. Además, este estudio demostró que en el ambiente de los hospitales no sólo existe *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* y *A. terreus*, sino que también *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. calidoustus*. Es importante destacar que todas estas especies identificadas han sido reportadas como causantes de infección, incluso *A. tubingensis* se ha reportado en casos de queratomycosis (35) por lo que su presencia en el ambiente de áreas críticas en los hospitales es preocupante, ya

que en algunos de estos casos, la fuente de infección procede del desapego al adecuado el mantenimiento de los equipos e instalaciones de climatización. En estas circunstancias, y dado que los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en el aire, ya que las estructuras fúngicas entran a los edificios hospitalarios a través de conductos de ventilación con filtración inadecuada, y pueden ser inhaladas por los pacientes inmunocomprometidos, provocando cuadros, fundamentalmente respiratorios, con consecuencias fatales (43). Por ello es importante el muestreo del aire en los hospitales, conocer cuáles son las especies fúngicas que prevalecen en ese ambiente e implementar medidas para evitar la exposición de los pacientes a los propágulos de *Aspergillus* y prevenir infecciones nosocomiales (23).

9. Conclusiones

Con base en las secuencias del gen *benA*, se identificaron 60 aislados a nivel de especie, de los cuales 25 correspondieron a *A. fumigatus*, uno a *A. neoellipticus*, seis a *A. niger*, 16 a *A. tubingensis*, uno a *A. awamori*, cinco a *A. flavus*, dos a *A. oryzae*, dos a *A. terreus*, uno a *A. ochraceus* y uno a *A. calidoustus*. Nueve de los aislados sólo se lograron ubicar a nivel de sección, de los cuales, seis correspondieron a la sección *Nigri*, tres a *Flavi*, un aislado no se logró clasificar feno ni genotípicamente a nivel de sección ni de especie y finalmente un aislado se ubicó dentro del género *Penicillium*. Por lo que la secuencia del gen *benA* sólo es informativa para las secciones *Fumigati* y *Usti*, requiriendo analizar mayor número de genes para lograr discriminar las especies de las secciones *Nigri*, *Flavi*, *Circumdati* y *Terrei*.

10. Referencias

1. Abarca L. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol 2000;17:S79-S84.
2. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M,

- Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1244-51.
3. Almeida AL, Araujo R. Highlights on molecular identification of closely related species. *Infect Genet Evol.* 2012;13:67-75.
 4. Arnow PM, Sadigh M, Costas C, Weil D, Chudy R. Endemic and epidemic aspergillosis associated with inhospital replication of *Aspergillus* organisms. *J Infect Dis.* 1991;164:998-002.
 5. Aufauvre-Brown A, Cohen J, Holden DW. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2991-2993.
 6. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. Nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2005;4:625-32.
 7. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell.* 2006;5:1705-12.
 8. Balajee SA, Tay ST, Lasker BA, Hurst SF, Rooney AP. Characterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. *Eukaryot Cell.* 2007;6:1392-99.
 9. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol.* 2009;47:877-84.
 10. Berbee ML, Carmean DA, Winka K. Ribosomal DNA and resolution of branching order among the Ascomycota: how many nucleotides are enough? *Mol Phylogenet Evol.* 2000;17:337-44.
 11. Bodey GP, Vartivarian S. Aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989;8:413-37.

12. Bodey GP, Bueltmann B, Duguid W, Gibbs D, Hanak H, Hotchi M, et al. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11:99-109.
13. Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 1999;91:553-56.
14. Costa-Baquião A, Martins M, De Oliveira M, Alves T, Zorzete P, Diniz D, et al. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chem*. 2013;139:1127-32.
15. De Aguirre L, Hurst SF, Choi JS. Rapid differentiation of *Aspergillus* species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3495-04.
16. Denning DW. Invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis*. 1994;7:456-62.
17. Diba K, Mirhendi H, Kordbacheh P, Rezaie S. Development of RFLP-PCR method for the identification of medically important *Aspergillus* species using single restriction enzyme *MwoI*. *Braz J Microbiol*. 2014;45:503-7.
18. Díaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Gaztelurrutia L, Navarro JL, Rodríguez-Tudela JL. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2419-22.
19. Einax E, Voigt K. Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Org Divers Evol*. 2003;3:185-94.
20. Escribano P, Peláez, Recio S, Bouza E, Guinea J. Characterization of clinical strains of *Aspergillus terreus* complex: molecular identification and antifungal susceptibility to azoles and amphotericin B. *Clin Microbiol Infect*. 2011;18:E24-E26.
21. Falvey D, Streifel A. Ten-year air sample analysis of *Apergillus* prevalence in a university hospital. *J Hosp Infect*. 2007;67:35-41.

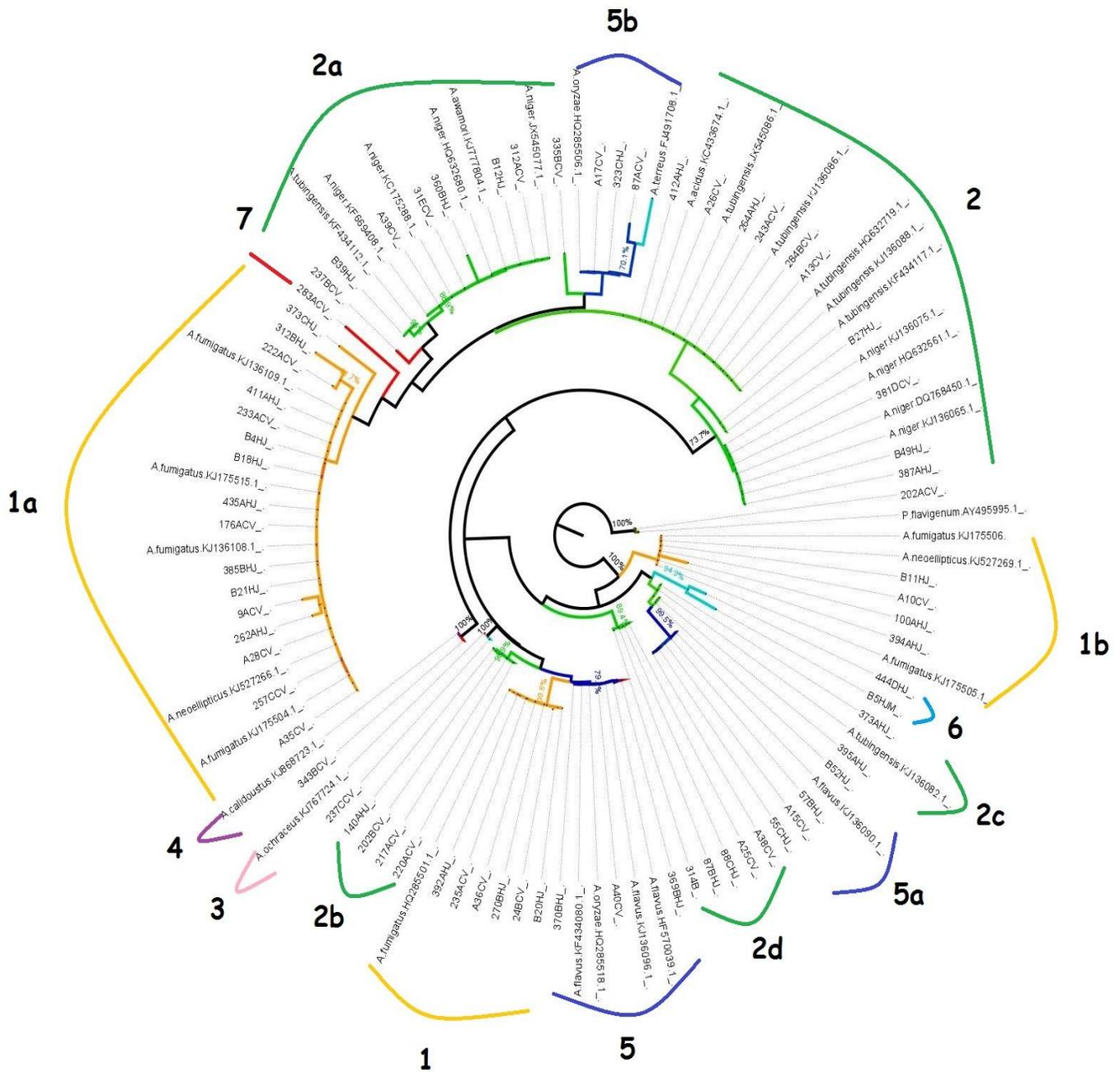
22. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:201-8.
23. Fernández M, Cattana M, Rojas F, Sosa MA, Aguirre C, Vergara M, et al. Especies de *Aspergillus* en ambientes hospitalarios con pacientes pediátricos en estado crítico. *Rev Iberoam Micol*. 2013;31:176-81.
24. Frisvad JC. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Front Microbiol*. 2015;5:773.
25. Gams W, Christensen M, Onions AHS, Pitt JI, Samson RA. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: Samson RA y JI Pitt (Eds.) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, New York, Plenum Press, 1985:55-64.
26. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol*. 2007;59:1-10.
27. Glass NL, Donaldson G. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:1323-30.
28. Guarro J, Kallas EG, Godoy P, Karenina A, Gene J, Stchigel A, et al. Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:989-91.
29. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:33-39.
30. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1510-15.
31. Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*. 2005;97:1316-29.
32. Jarv H, Lehtmaa J, Summerbell RC, Hoekstra ES, Samson RA, Naaber P. Isolation of *Neosartorya fischeri* from blood: first hint of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42:925-8.

33. Katz EM, Dougall MA, Weeks K, Cheetham FB. Multiple genetically distinct groups revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2005;43:551-55.
34. Klich MA, Pitt JI. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, CSIRO Division of Food Processing, 1988.
35. Kredics L, Varga J, Kocsubé S, Rajaraman R, Raghavan A, Dóczi I, et al. Infectious keratitis caused by *Aspergillus tubingensis*. Cornea. 2009;8:951-54.
36. Krimitzas A, Pyrri I, Kouvelis VN, Kapsanaki-Gotsi E, Typas MA. A phylogenetic analysis of Greek isolates of *Aspergillus* species based on morphology and nuclear and mitochondrial gene sequences. Biomed Res Int. 2013;2013:260395.
37. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 1999;12:310-50.
38. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. Biología Celular y Molecular. 5^a ed. Estados Unidos: Panamericana; 2005.
39. Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Invasive fungal infections in the ICU: How to approach, how to treat. Molecules. 2014;19:1085-119.
40. Pemán J, Salavert M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31:328-41.
41. Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia 2008;100:205-26.
42. Pitt JI, Samson RA, Frisvad JC. List of accepted species and their teleomorphs in the family *Trichocomaceae*. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus*. Samson RA, Pitt JI, eds. Amsterdam: Harwood Academic Publishers: 2000;9-47.
43. Pontón J, Cabañes FJ. *Aspergillus* y aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol. 2000;17:S77-S78.

44. Pryce TM, Palladino S, Price DM, Gardam DJ, Murray RJ. Rapid identification of fungal pathogens in BacT/Alert, BacTec and BBL MGIT media using polymerase chain reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. *J Diag Microbiol Infect.* 2006;54:289-97.
45. Quindós G. Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. *Rev Iberoam Micol* 2002;19:1-4.
46. Raper KB, Fennell DI. *The Genus Aspergillus*. New York, Williams and Wilkins, 1965.
47. Refojo N, Duarte-Escalante E, Dignani MC, Hevia AI, Abrantes RA, Davel G, Canteros C, et al. Tipificación de aislamientos clínicos de *Aspergillus flavus* y su relación con aislamientos ambientales de un centro oncohematológico. *Rev Iberoam Micol.* 2013;30:25-30.
48. Samson RA. List of names of *Trichocomaceae* published between 1992 and 1999. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus*. Samson RA, Pitt JI, eds. Amsterdam: Harwood Academic Publishers:2000;73-79.
49. Samson RA, Hong S-B, Frisvad JC. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Med Mycol.* 2006;44:S133-S148.
50. Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol.* 2007;59:147-03.
51. Samson RA, Varga J. What is a species in *Aspergillus*? *Med Mycol.* 2009;47:S13–S20.
52. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong JS, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014;78:141-73.
53. Stephen WP. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 2008;100:205-26.
54. Vonberg R, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect.* 2006;63:246-54.

55. Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Zhe W, Wang D. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol. 2001;39:2261-66.

Anexo 1. Dendrogramas de las secuencias parciales del gen *benA* construidos por los métodos de máxima verosimilitud y UPGMA



Dendrograma de la secuencia parcial del gen *benA* obtenido por el método de máxima verosimilitud. Los porcentajes $\geq 70\%$ de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados en cada nodo. El dendrograma se enraizó usando como grupo externo una secuencia de *Penicillium flavigenum*. Las secciones se resaltan en color amarillo (*Fumigati*), verde (*Nigri*), azul marino (*Flavi*), rosa (*Circumdati*), morado (*Usti*) y azul (*Terrei*).