UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División en Ciencias Biológicas y de la Salud
Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

Casa abierta al tiempo

Diversidad fúngica en ambientes hospitalarios: identificación fenotípica y genotípica de aislados de *Aspergillus* spp., estudio de la variabilidad de *A. fumigatus* y factores asociados con la aspergilosis invasiva

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

P R E S E N T A

M. en C. Erick Obed Martínez Herrera

Comité tutoral:

Co-directores:
Dr. Facundo Rivera Becerril

Dra. María del Rocío Reyes Montes

Asesora:

Dra. Concepción Toriello Nájera

14 DE JUNIO DE 2017

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y, además, cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por las divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó el M. en C. Erick Obed Martínez Herrera el día 14 de junio del año 2017.

Presidente: Dr. Facundo Rivera Becerril

Secretaria: Dra. María del Rocío Reyes Montes

Vocal: Dra. Concepción Toriello Nájera

Vocal: Dra. María Guadalupe Frías De León

Vocal: Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por la formación académica recibida a través del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

Al CONACyT por la beca (CVU/Becario-554689/300897) otorgada al M. en C. Erick Obed Martínez Herrera para llevar a cabo sus estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud

Al Laboratorio de Micología Molecular de la Unidad de Micología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el uso de sus instalaciones para llevar a cabo el proyecto doctoral denominado "Diversidad fúngica en ambientes hospitalarios: identificación fenotípica y genotípica de aislados de *Aspergillus* spp., estudio de la variabilidad de *A. fumigatus* y factores asociados con la aspergilosis invasiva"

Al PAPIIT (UNAM) por el financiamiento para la realización de este proyecto (PAPIIT-DGAPA-IN219212).

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por el financiamiento otorgado para cubrir aspectos varios relacionados con la tesis doctoral.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por el amor infinito y la oportunidad de poder cumplir mis sueños

A mis Padres, por todo lo enseñado en la vida y por ser un ejemplo a seguir

A mis Hermanos, por su apoyo y cariño

A la Dra. María del Rocío Reyes Montes, por su apoyo, enseñanzas, paciencia y esmero en mi preparación

Al Dr. Facundo Rivera Becerril y a la Dra. Concepción Toriello Nájera por todo su apoyo en el desarrollo del doctorado

A mis amigos y compañeros por su aprecio y apoyo

RESUMEN

Las micosis invasoras nosocomiales, particularmente las aspergilosis, son un problema creciente en pacientes inmunocomprometidos. Este trabajo evaluó la diversidad fúngica en los ambientes intrahospitalarios de dos instituciones de salud (1 y 2) y la presencia de *Aspergillus* spp. Durante un año (estación lluviosa y seca), se muestreó el aire de tres áreas en cada institución, utilizando un muestreador de partículas viables de un paso Thermo-Andersen. Los hongos aislados se identificaron por macro y micromorfología, se determinaron las CFU/m^3 de aire, la riqueza, abundancia y diversidad de especies. Particularmente, los aislados de *Aspergillus* spp. se caracterizaron por termotolerancia, tamaño de conidios y vesículas. Las UFC/m^3 de aire fueron similares en ambas instituciones durante las dos estaciones, pero diferentes entre las áreas muestreadas. En ambas instituciones, la diversidad fue de 15 especies, donde las más abundantes fueron *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. *Aspergillus* sección *Fumigati*, *Aspergillus* sección *Nigri*. La termotolerancia confirmó la identificación de *A. fumigatus* sección *Fumigati*. La mayor tasa de crecimiento correspondió a *Aspergillus* sección *Nigri*. Los tamaños de conidios y vesículas de las diferentes secciones de *Aspergillus* concordaron con lo descrito en la literatura.

Para la identificación de especies de *Aspergillus* se utilizaron secuencias parciales de los genes actina (*ActA)* y β-tubulina (*BenA)*, y fueron analizadas por Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. La identificación a nivel de especie, a través de las secuencias de genes, permitió identificar 24 aislados

como *A. fumigatus,* 24 aislados como *A. tubingensis,* 14 aislados como *A. niger*, 14 aislados como *A. flavus* y 1 aislado como *A. westerdijkiae.*

Además, se investigó la correlación entre la actividad de elastasa y el genotipo sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*) en 28 aislados ambientales de *A. fumigatus* sección *Fumigati*, a través de la determinación del índice de actividad de elastasa, *in vitro*, en medio de cultivo con elastina; la determinación del genotipo sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*) se realizó por PCR multiplex. El 86.2% de los aislados mostraron actividad de elastasa; el análisis estadístico indicó que la actividad de elastasa no depende del origen de los aislados, de manera que todos tienen el potencial de causar infección. El 67.3% de los aislados tuvieron un genotipo sexual *MAT1-1* mientras que el 32.7% fueron *MAT1-2.* El genotipo sexual no influyó en el índice de actividad de elasta en los aislados estudiados.

Por otro lado, la tipificación de aislados identificados como *A. fumigatus,* se realizó con el microsatélite *CSP* y los datos obtenidos se analizaron y se establecieron los diferentes tipos de *CSP.* Se identificaron 5 tipos de *CSP* en los aislados procedentes de México; se comparó la prevalencia de éstos con respecto a los reportados en otros países.

La determinación de la diversidad fúngica fue importante, debido a que todas las especies de hongos identificados tienen el potencial de ser patógenos, especialmente los de la sección *Fumigati*. La identificación de las especies de esta sección es significativa para tomar las medidas terapeúticas correctas en el manejo del paciente. La prevalencia del genotipo *MAT 1-1* sobre el *MAT 1-2,* nos orienta para tomar medidas preventivas en el manejo integral de los pacientes. Asimismo, de acuerdo con los valores obtenidos de índice de

actividad de elastasa, no hubo correlación con el genotipo *MAT1-1.* Finalmente, se observó gran variabilidad genotípica en aislados de *A. fumigatus,* esto puede dar como resultado el surgimiento de especies más virulentas o resistentes a determinados antifúngicos, entre otros.

ABSTRACT

Nosocomial invasive mycoses, particularly aspergillosis, are a growing problem in immunocompromised patients. This study assessed the fungal diversity in the hospital settings of two healthcare institutions (1 and 2) and the presence of *Aspergillus spp.* For a year (including the rainy and dry seasons), air was sampled from three areas within each institution, using a step of a viable Thermo-Andersen particle sampler. The isolated fungi were identified using macro and micromorphology, measuring air CFU/m^3, while also determining richness, abundance and species diversity. Particularly, the isolates of *Aspergillus spp.* were characterized by thermotolerance, size of conidia and vesicles. Air CFU/m^3 measured was similar at both institutions during the same seasons, but different among the sampled areas. In both institutions, the diversity was comprised by 15 species, where the most abundant were *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp. Aspergillus* section *Fumigati*, *Aspergillus* section *Nigri*. Thermotolerance confirmed the identification of *A. fumigatus* section *Fumigati*. The highest growth rate corresponded to the *Aspergillus Nigri* section. The sizes of conidia and vesicles of the different *Aspergillus* sections were in agreement with what was stated in the literature.

For the identification of *Aspergillus* species, partial sequences of the actin (*ActA*) and β-tubulin (*BenA*) genes were used, and analyzed using Maximum Likelihood and Bayesian Inference tests. The identification at the species level, through gene sequences, allowed for identifying 24 isolates as *A. fumigatus*, 24 isolates as *A. tubingensis*, 14 isolates as *A. niger*, 14 isolates as *A. flavus* and 1 isolate as *A. Westerdijkiae*.

In addition, the correlation between elastase activity and sexual genotype (MAT1-1 and MAT1-2) was studied in 28 environmental isolates of the *Fumigati* section *A. fumigatus*, by determining the rate of elastase activity, *in vitro*, in a culture medium with elastin. Sexual genotypes (*MAT1-1* and *MAT1-2*) were determined by multiplex PCR. 86.2% of the isolates showed elastase activity. The statistical analysis indicated that elastase activity does not depend on the origin of the isolates, so that all are potentially infectious. 67.3% of the isolates had a *MAT1-1* sexual genotype, while 32.7% were *MAT1-2*. The sex genotype did not influence the index of elastic activity in the isolates studied.

On the other hand, typing of isolates identified as *A. fumigatus* was performed with the CSP microsatellite and the data obtained were analyzed and the different types of CSP established. Five types of CSP were identified in isolates from Mexico. The prevalence of these was compared with those reported in other countries.

Determination of fungal diversity was important because all identified fungal species have the potential to be pathogens, especially those in the *Fumigati* section. The identification of the species in this section is significant for following the correct therapeutic measures in the management of the patient. The prevalence of *MAT 1-1* genotype on *MAT 1-2*, guides us to follow preventive measures in the integral management of patients. Also, according to the obtained values of the elastase activity index, there was no correlation with the *MAT1-1* genotype. Finally, genotypic variability was observed in isolates of *A. fumigatus*. This may result in the emergence of more virulent or resistant species to certain antifungals, among other treatments.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

2. ANTECEDENTES 2

2.1 Taxonomía del género *Aspergillus* 5

2.2 Características morfológicas 6

2.3 Especies patógenas dentro de las secciones de *Aspergillus* 8

2.4 Clasificación clínica 11

2.4.1 Aspergilosis primaria 12

2.4.2 Aspergilosis secundaria 12

2.5 Reproducción sexual 16

2.6 Patogenicidad 20

2.7 Elastasa 21

2.8 Variabilidad genética 23

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN **25**

4. HIPÓTESIS **26**

5. OBJETIVO **27**

5.1 Objetivo general 27

5.2 Objetivos particulares 27

6. MATERIALES Y MÉTODOS **27**

6.1 Áreas de muestreo 27

6.2 Procedimientos de muestreo de aire 28

6.3 Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) 28

6.4 Aislamiento e identificación de hongos 29

6.5 Identificación por macro y micromorfología 29

6.6 Diversidad fúngica 29

6.7 Análisis estadístico 30

6.8 Caracterización fenotípica de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* 30

6.8.1 Termotolerancia 30

6.8.2 Tamaño de conidios y vesículas 31

6.9 Caracterización genotípica 31

6.9.1 Extracción de DNA 31

6.9.2 Amplificación de la secuencia parcial del gen de la actina (*ActA)* 34

6.9.3 Amplificación de la secuencia parcial del gen de la β-tubulina (*BenA)* 34

6.9.4 Secuenciación de los fragmentos amplificados 35

6.9.5 Análisis de secuencias 35

6.9.6 Análisis filogenético 36

6.10 Determinación de la actividad de elastasa en aislados de *A. fumigatus* 37

6.10.1 Estandarización para determinar la actividad de elastasa 37

6.10.2 Determinación de la actividad de elastasa 39

6.10.3 Análisis de datos 39

6.11 Determinación del genotipo sexual 39

6.12 Tipificación de los aislados de *A. fumigatus* con el microsatélite *CSP* 40

6.12.1 Amplificación del microsatélite *CSP* 40

6.12.2 Análisis de las secuencias de microsatélite *CSP* 41

7. RESULTADOS 42

7.1 Cuantificación de UFC/m3 en las instituciones 1 y 2 42

7.2 Identificación por macro y micromorfología de los hongos 43

7.3 Diversidad fúngica 45

7.4 Caracterización fenotípica de los aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus*

47

7.4.1 Termotolerancia 47

7.4.2 Tamaño de conidios 47

7.4.3 Tamaño de vesículas 47

7.5 Caracterización genotípica de los aisaldos de las secciones de *Aspergillus* 48

7.5.1 Extracción de DNA 48

7.5.2 Amplificación de la secuencia parcial del gen *ActA* con los aislados de las secciones de *Aspergillus* 49

7.5.3 Amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* con los aislados de las secciones de *Aspergillus* 53

7.5.4 Análisis de las secuencias de los genes *ActA y BenA* 58

7.5.5 Construcción filogenética de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* con el gen *ActA* por métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana 58

7.5.6 Construcción filogenética de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* con el gen *BenA* por métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana 65

7.6 Determinación de la actividad de elastasa en aislados de *Aspergillus fumigatus* 71

7.6.1 Estandarización para determinar la actividad de elastasa 71

7.6.2 Determinación de la actividad de elastasa 78

7.7 Determinación de genotipo sexual 82

7.8 Tipificación de aislados de *A. fumigatus* con el microsatélite *CSP* 84

7.8.1 Amplificación del microsatélite 84

7.8.2 Tipificación de los aislados de *A. fumigatus* con el microsatélite CSP 86

8. DISCUSIÓN 91

9. CONCLUSIONES 104

10. IMPLICACIONES 106

11. APORTACIONES 108

12. REFERENCIAS 109

13. ARTÍCULO 130

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación del género *Aspergillus*	11
Cuadro 2	Clasificación de aspergillosis primarias	13
Cuadro 3	Clasificación de aspergillosis secundarias	14
Cuadro 4	Agentes etiológicos de las variedades clínicas de aspergilosis	15
Cuadro 5	Unidades formadoras de colonias (UFC) e cada área de muestreo de las instituciones 1 y 2	42
Cuadro 6	Índices de diversidad de hongos en diferentes áreas muestreadas en las instituciones 1 y 2	46
Cuadro 7	Aislados ambientales de *Aspergillus* spp.	46
Cuadro 8	Tasa de crecimiento de las secciones de *Aspergillus*	47
Cuadro 9	Diámetro de conidios y vesículas de las secciones de *Aspergillus*	48
Cuadro 10	Grupos y subgrupos de árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud, a partir de secuencias del gen *ActA*	61

Cuadro 11 Grupos y subgrupos de árbol filogenético por el método de Inferencia Bayesiana, a partir de secuencias del gen *ActA* 64

Cuadro 12 Grupos y subgrupos de árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud, a partir de secuencias del gen *BenA* 67

Cuadro 13 Grupos y subgrupos de árbol filogenético por el método de Inferencia Bayesiana, a partir de secuencias del gen *BenA* 70

Cuadro 14 Índices de actividad de elastasa (IAE) de *A. fumigatus* en medio de elastina con amortiguador de fosfatos 0.05 M Ph 7.6 75

Cuadro 15 Índices de actividad de elastasa (IAE) de *A. fumigatus* en medio de elastina con amortiguador de boratos 0.05 M Ph 7.6 76

Cuadro 16 Índices de actividad de elastasa (IAE) de *A. fumigatus* en medio de elastina en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.6. El inóculo utilizado fue de $1x10^7$ conidios /mL. 78

Cuadro 17 Índice de Actividad de Elastasa (IAE) de aislados ambientales

de *A. fumigatus* 80-82

Cuadro 18 Patrones de los repetidos en tándem (tipos *CSP*) de aislados de *A. fumigatus* recuperados del ambiente de dos Instituciones hospitalarias de la ciudad de México 88

Cuadro 19 Prevalencia de los tipos de *CSP* observados en diferentes regiones del mundo 90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Medios de cultivo sin inóculo: A) Sabouraud, B) Sabouraud con rosa de bengala y C) Medio con elastina 38

Figura 2 Riqueza y abundancia de hongos en áreas muestreadas en la Institución 1 44

Figura 3 Riqueza y abundancia de hongos en áreas muestreadas en la Institución 2 44

Figura 4 Cuantificación de DNA de aislados ambientales de *Aspergillus*. 49

Figura 5 Curva de DNA para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *ActA* 50

Figura 6 Curva de $MgCl_2$. Se utilizaron diferentes concentraciones de $MgCl_2$ 51

Figura 7 Curva de temperatura de alineamiento para la estandarización de la PCR de la secuencia parcial del gen *ActA* 52

Figura 8 Amplificación del gen *ActA* a partir de DNA´s de los aislados fúngicos de las diferentes secciones de *Aspergillus* 53

Figura 9 Curva de DNA para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* 54

Figura 10 Curva de dNTPs para estandarización de la PCR de la secuencia parcial del gen *BenA* 54

Figura 11 Curva de $MgCl_2$ para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* 55

Figura 12 Curva de oligonucleótidos para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* 56

Figura 13 Curva de temperatura de alineamiento para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* 56

Figura 14 Amplificación del gen *BenA* de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* 57

Figura 15 Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud, con las secuencias parciales del gen *ActA* 60

Figura 16 Árbol filogenético construido por el método de Inferencia Bayesiana, con las secuencias parciales del gen *ActA* 63

Figura 17 Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud, con las secuencias parciales del gen *BenA* 66

Figura 18 Árbol filogenético construido por el método de Inferencia Bayesiana con las secuencias parciales del gen *BenA* 69

Figura 19 Crecimiento al día 4 de $1x10^7$ conidios/mL de *A. fumigatus* (aislado 9A) en medio de cultivo: A) Sabouraud, B) Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y C) Medio con elastina. 71

Figura 20 Curvas de crecimiento de los aislados 9A (A) y A10 (B) de *A. fumigatus* 72

Figura 21 Curvas de crecimiento de los aislados B4 (A) y 411A (B) de *A. fumigatus* 73

Figura 22 Halo de lisis de elastina generado por el aislado de *A. fumigatus* en medio de Kothary et al. (1984) 74

Figura 23 Decoloración del medio de cultivo de elastina con amortiguador de boratos en presencia de *A. niger* 76

Figura 24 Crecimiento de A. niger en medio Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% a los días 3 (A) y 7 (B) 77

Figura 25 Ausencia de la actividad de elastasa en el aislado 392 A 79

Figura 26 Ausencia de la actividad de elastasa en el aislado B23 79

Figura 27 Productos de amplificación de la PCR para la determinación del genotipo sexual de los aislados de *A. fumigatus* 83

Figura 28 Curva de DNA para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP* 84

Figura 29 Curva de $MgCl_2$ para estandarización de la PCR para la amplificación de la secuencia parcial del gen CSP 85

Figura 30 Curva de oligonucleótidos para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen CSP 85

Figura 31 Amplificación de la secuencia parcial del gen CSP en diferentes aislados de *A. fumigatus* 86

Figura 32 Patrón de repeticiones en tándem de un aislado de *A. fumigatus* 89

1. INTRODUCCIÓN

Aspergillus fumigatus Fresenius es uno de los hongos filamentosos más ubicuos en el mundo, que desempeña un papel destacado en la descomposición de la materia orgánica en condiciones naturales. Este hongo es termofílico y esporula abundantemente, libera más de 10,000 conidios a la atmósfera por cada cabeza aspergilar.[1] Los conidios son relativamente pequeños (2-3 µm) y están presentes en el aire en concentraciones de 1-100 conidios/m^3.[2] Su inhalación por personas inmunocompetentes, rara vez tiene efectos adversos ya que los conidios son eliminados eficientemente por el sistema inmune. En consecuencia, *A. fumigatus* fue considerado como un patógeno oportunista de poca importancia médica, responsable de diferentes enfermedades, incluyendo la aspergilosis broncopulmonar alérgica y el aspergiloma. Sin embargo, debido al aumento en el número de pacientes inmunodeprimidos, *A. fumigatus* se considera hoy el hongo patógeno más prevalente en el aire, causante de infecciones invasoras usualmente mortales en este grupo vulnerable.[3] Los principales factores de riesgo para la aspergilosis invasiva (AI) son el trasplante de médula ósea, las neoplasias malignas hematológicas, los trasplantes de órganos sólidos, el SIDA y las enfermedades pulmonares.[4] Otros factores predisponentes incluyen granulocitopenia prolongada y enfermedad granulomatosa crónica, el uso de corticosteroides[1,5-7] y el desarrollo de enfermedad injerto contra huésped.[8] La tasa de mortalidad en la AI supera el 50% y puede alcanzar el 90% en los pacientes con trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas.[9-12] Aunque otras especies fúngicas tales como *A. terreus, A. niger* y *A. flavus*

también pueden causar infecciones invasoras,[1,13,14] en la actualidad *A. fumigatus* es responsable de más del 90% de los casos en seres humanos.[2]

2. ANTECEDENTES

La AI en los hospitales se ha convertido en una de las enfermedades más graves entre los pacientes inmunodeprimidos, particularmente en los que se encuentran en las unidades de trasplante de médula ósea;[15,16] la mayoría de estas infecciones se deben a *A. fumigatus.* La presencia de este hongo en la atmósfera se ha asociado con brotes de aspergilosis nosocomial con alta concentración de conidios, ocasionada por trabajos de construcción, por los sistemas deficientes de ventilación o por la contaminación del agua.[17-22] La aparición de esos brotes ha conducido al establecimiento de medidas profilácticas, como el uso de filtros de aire de alta eficiencia para la captura de partículas. Sin embargo, los filtros solamente han reducido el nivel de contaminación del aire del hospital y el riesgo de infección durante los trasplantes de médula ósea, pero no ha resuelto el problema de enfermedades tardías.[23] Además, muchos casos de AI han ocurrido incluso bajo condiciones de flujo laminar. Como resultado, la AI sigue siendo la principal causa de mortalidad entre los pacientes trasplantados en el ámbito hospitalario y la fuente de contaminación todavía no ha sido identificada claramente.[24,25] Esta falta de entendimiento del reservorio del inóculo de infección ha motivado la implementación de estudios epidemiológicos con datos de tipificación genómica para investigar la naturaleza de las infecciones nosocomiales por *Aspergillus* y para identificar la fuente del inóculo.[26] Estudios previos no han sido concluyentes, ya que siempre se han limitado a un corto periodo de tiempo y a

un escaso número de aislados clínicos; además, se han aplicado métodos moleculares de tipificación que no han resultado apropiados.[27-29] Cabe destacar que debido a la gran diversidad genética de *A. fumigatus* es necesario utilizar métodos de tipificación muy precisos para llevar a cabo estudios epidemiológicos.[30]

En hospitales y otros entornos se ha tratado de investigar la relación entre los pacientes y la exposición a hongos del ambiente y los resultados adversos a la salud, pero no hay informes que correlacionen la cantidad mínima de conidios y el riesgo de contraer una enfermedad tal como la AI.[1] Por tanto, el desarrollo de métodos adecuados de evaluación que detecten *A. fumigatus* es fundamental para la comprensión de la relación entre el ambiente y las infecciones nosocomiales. Actualmente, los métodos utilizados para estimar la exposición a los hongos presentes en el aire tienen limitaciones significativas y pueden explicar las variaciones en la comprensión de la relación entre el ambiente, la toma de muestras y las infecciones nosocomiales.[31] Habitualmente, el número y tipo de hongos en el aire son estimados mediante el examen microscópico directo de esporas colectadas o por el crecimiento de esporas en un medio de cultivo apropiado. La identificación a nivel de especie y/o género no siempre es posible a través del examen directo en un período de muestreo corto; se requieren intervalos más largos para evitar la sobrecarga de la muestra, lo que puede reducir el cálculo preciso de la misma. También los métodos de cultivo tienen sus limitaciones. Por estas razones se han implementado las técnicas moleculares como la PCR que han sido aplicadas con éxito para el muestreo ambiental de otros microorganismos en el agua, alimentos, suelo y aire, dado que la PCR no requiere del previo aislamiento del microorganismo, sin importar

el volumen de la muestra. Esta herramienta puede proporcionar una evaluación más representativa de exposiciones continuas, que permiten determinar una correlación estadística entre el número de conidios en el aire y los riesgos asociados con el desarrollo de la enfermedad, es decir, una relación exposición-respuesta.[1] Históricamente, la PCR convencional se utilizó sólo para la detección de ácidos nucleicos y no era de naturaleza cuantitativa; los avances recientes utilizan sondas fluorogénicas y detectores especializados que permiten un análisis cuantitativo en tiempo real para el monitoreo del hongo en el ambiente. La PCR cuantitativa ha sido utilizada por McDevitt et al.[32] para identificar y cuantificar *A. fumigatus* en el ambiente. Sin embargo, con el propósito de identificar las especies de las secciones de *Aspergillus*, Samson et al.[33] han sugerido emplear un enfoque polifásico como estándar de oro, es decir, considerar un conjunto de criterios, entre los que se incluyen la caracterización morfológica, pruebas fisiológicas, datos ecológicos, análisis de extrolitos y secuencias de DNA. Particularmente, en lo que se refiere a las secuencias de DNA, se ha sugerido la utilización de secuencias multilocus como β-tubulina (*BenA*), calmodulina (*CaM*), actina (*ActA*) o secuencias de los espaciadores internos transcritos (*ITS*). El análisis comparativo de secuencias de las regiones *ITS*, específicamente las regiones no codificantes, *ITS1* e *ITS2*, que flanquean el 5.8S del DNA ribosomal, permite identificar a *Aspergillus* a nivel de subgénero/sección. Mientras, la amplificación y secuenciación de algunos genes como *ActA*, *CaM* rodlet A, y/o *BenA*, permiten distinguir *A. fumigatus* de especies relacionadas dentro de la sección *Fumigati*.[34]

2.1 Taxonomía del género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece al orden Eurotiales (clase Eurotiomycetes), incluye más de 344 especies, y a más de 40 especies se les atribuyen infecciones oportunistas en el hombre, aunque algunas de ellas solo ocasionalmente.[35,36]

La clasificación de *Aspergillus* se realiza tradicionalmente con base en caracteres morfológicos como el tamaño y la disposición de las cabezas aspergilares, el color de los conidios, la tasa de crecimiento en diferentes medios y sus características fisiológicas. De acuerdo con estas características, Raper y Fennell dividieron el género *Aspergillus* en 18 grupos.[37] La clasificación en grupos no tenía ningún estatus en la nomenclatura y por lo tanto Gams et al.[38] introdujeron subgéneros y secciones en *Aspergillus*. Estos estudios mostraron que los grupos de Raper y Fennell, con base en las características fenotípicas, coinciden en gran parte con las clasificaciones actuales.[37] Peterson aceptó cinco subgéneros y 16 secciones en *Aspergillus*.[39] Por otro lado, Houbraken et al.,[40] propusieron cuatro subgéneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* y *Nidulantes*) y 20 secciones. Por otro lado, el género *Aspergillus* fue subdividido en 8 subgéneros y 22 secciones (Cuadro 1) con 620 especies, de acuerdo con el Index Fungorum (www.indexfungorum.org/), o 577 especies en MycoBank (www.mycobank.org/), donde los taxones anamórficos asexuales de este grupo de hongos comprenden 12 géneros sexuales o teleomórficos (Cuadro 1).[41] Esto significa, que muchas especies de *Aspergillus* tienen dos nombres, uno para el anamorfo y otro para el teleomorfo.[41]

Dentro de los hongos descritos como patógenos para el hombre, actualmente existen más de 40 especies de *Aspergillus* (divididos en 6 subgéneros y 12

secciones).[42] Sin embargo, el número de especies de hongos clínicamente relevantes ha ido en constante aumento en los últimos años y es probable que aumente aún más en el futuro.

2.2 Características morfológicas

Las colonias del género *Aspergillus* son usualmente de crecimiento rápido, de varios colores que van desde el blanco, amarillo, amarillo-café, café a negro o tonos de verde-grisáceo o verde-azulado. Se caracterizan por la producción de hifas especializadas denominadas conidióforos, que en algunos casos son significativamente diferentes.[33] El conidióforo, aunque es unicelular, posee tres segmentos bien diferenciados: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). La vesícula está cubierta parcialmente o en su totalidad por una empalizada de fiálides (uniseriada). En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas, las cuales soportan un pequeño número compacto de fiálides (biseriada). El conjunto forma lo que se llama cabeza aspergilar, que puede ser estrictamente uniseriada, biseriada o mixta. Los conidios son unicelulares, redondos, ovalados, elípticos, lisos o rugosos, hialinos o pigmentados, de paredes gruesas o finas, producidos en largas cadenas que pueden ser divergentes (radiadas) o agregadas en columnas compactas (columnares) o en columnas laxas (que tienden a abrirse). Pocas especies producen otros tipos de conidios además de las fiálides y métulas sobre la vesícula, éstos crecen directamente sobre las hifas vegetativas y son de aspecto redondo a ovoide llamados aleuroconidios. Algunas especies pueden producir células de Hülle solitarias o envolviendo los

cleistotecios de uno de los teleomorfos asociados. En los tipos de ascomata se presenta una gran variación morfológica, desde los rodeados por hifas laxas de apariencia lisa pseudoparenquimatosa a las estructuras esclerotiales compactas, así como en el tamaño, ornamentación y superficie de las ascosporas.[43]

La clasificación del género *Aspergillus* en subgéneros y secciones se realiza fundamentalmente con base en cuatro características: presencia de teleomorfo, presencia o ausencia de métulas; disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula, y coloración de las colonias.[44,45]

El subgénero *Fumigati* se caracteriza por cabezas conidiales uniseriadas. Hay tres géneros teleomórficos vinculados con este subgénero: *Neosartorya*, *Neocarpenteles* y *Dichotomomyces*. Además, el subgénero *Fumigati* comprende dos secciones con hongos clínicamente importantes: *Fumigati* y *Clavati*. También el subgénero *Circumdati* comprende tres secciones de hongos clínicamente importantes: *Circumdati, Flavi* y *Nigri* e incluye especies por lo general con cabezas aspergilares biseriadas, en tonos de amarillo-verde a marrón y esclerocios oscuros.[46] Las especies teleomórficas de esta sección se colocan en los géneros *Petromyces*, *Neopetromyces* y *Chaetosartorya*.

El subgénero *Terrei* consta de dos secciones estrechamente relacionadas, *Terrei* y *Flavipedes*. El subgénero *Terrei* se caracteriza por una columna biseriada, conidiogénesis radial y cultivos de color amarillo, naranja a canela marrón. Algunos autores sugieren que las secciones *Terrei* y *Flavipedes* deberían fusionarse,[47] mientras que otros colocan la sección *Terrei* dentro del subgénero *Nidulantes*.[48,49] De cualquier forma, los diferentes teleomorfos en los

subgéneros *Terrei* (*Fennellia*) y *Nidulantes* (*Emericella*) hacen hincapié en la diferenciación entre ambas.[50]

El subgénero *Nidulantes* comprende dos secciones con hongos patógenos facultativos: *Nidulantes* y *Usti* e incluye cerca de 80 especies.[39,51,52] Varias especies de este subgénero tienen un teleomorfo asignado a *Emericella*.[53] El subgénero *Aspergillus* consta de dos secciones: *Aspergillus* y *Restricti* e incluye especies xerofílicas. El género teleomorfo *Eurotium* está vinculado con el subgénero *Aspergillus* (Cuadro 1). Finalmente, el subgénero *Candidi* incluye solamente la sección *Candidi*.

Los hongos del género *Aspergillus* se multiplican rápidamente sobre materia vegetal almacenada o en descomposición de interés agroalimentario (cereales, frutas, semillas) y en un amplio intervalo de temperatura, humedad y aerobiosis, contaminando así muchos sustratos.[54,55] Algunas de sus especies son fitopatógenas, destacando *A. niger* que produce la antracnosis del algodonero y el carbón, entre otras enfermedades.[56]

2.3 Especies patógenas dentro de las secciones de *Aspergillus*

Algunas especies del género *Aspergillus* son capaces de producir diversas enfermedades de distribución universal en el ser humano y animales, conocidas como aspergilosis, las cuales han aumentado de manera importante en los últimos años.[13] En un sentido amplio, las aspergilosis se definen como el daño a los tejidos provocados por hongos del género *Aspergillus*.[57] De las 344 especies descritas de *Aspergillus*, solamente ocho son responsables de la mayoría de las infecciones en humanos. *A. fumigatus* es el patógeno más común, seguido por *A. niger, A. nidulans, A. terreus, A. clavatus, A. flavus, A.*

niveus y *A. ustus*.[58] Dentro de la sección *Fumigati* se encuentra *A. fumigatus,* la especie más importante del género, y quien presenta una fase sexual demostrada por O'Gorman et al.[59] quienes lograron reproducir en el laboratorio su ciclo sexual completo, con la producción de cleistotecios y ascosporas. Con base en sus relaciones filogenéticas y en la morfología de sus estructuras sexuales, el teleomorfo de *A. fumigatus* ha sido asignado al género *Neosartorya,* Phylum Ascomycota, Orden Eurotiales, Familia Trichocomaceae[60] y denominado como *N. fumigata*.[59] Sin embargo, cabe destacar que se trata de una especie heterotálica y que una sola cepa no es capaz de desarrollar en cultivo los cuerpos fructíferos correspondientes al teleomorfo; más bien, deben ser enfrentadas dos cepas compatibles durante largo tiempo para que los formen. Por el contrario, existen otras especies patógenas del mismo género que usualmente desarrollan su estado sexual en cultivo a partir de un solo aislado, tales como *N. hiratsukae*, *N. pseudofischerii* y *N. udagawae.* Ésta última ha sido considerada como una especie emergente en los últimos años, produce infecciones invasivas con características diferenciales de las ocasionadas por *A. fumigatus*.[61] *A. lentulus* es otra especie descrita dentro de la misma sección, también morfológicamente parecida a *A. fumigatus*, que se distingue básicamente por su lenta esporulación en cultivo y por presentar un patrón de resistencia diferente a los antifúngicos. *A. lentulus* es más resistente *in vitro* a la anfotericina B.[62,63] *A. terreus* (sección *Terrei*) es otro complejo de especies de creciente interés clínico que presenta también una sensibilidad disminuida a la anfotericina B. Por otro lado, estudios de secuenciación multilocus han demostrado que otra especie nueva, *A. alabamensis,* dentro de

este complejo, puede colonizar sujetos inmunocompetentes y presentar una sensibilidad disminuida a la anfotericina B.[48]

Dentro de la sección *Usti*, la especie *A. ustus* ha sido tradicionalmente considerada como un patógeno humano, aunque poco frecuente. Sin embargo, recientemente se han investigado algunos aislados clínicos pertenecientes a dicha especie, demostrando mediante análisis de secuencias de DNA, que en realidad pertenecen a una nueva especie, *A. calidoustus,* misma que presenta una sensibilidad reducida a los triazoles.[64] Además de las anteriormente citadas, un amplio número de especies de *Aspergillus*, tales como *A. tamarii, A. nomius, A. pseudonomius, A. granulosus, A. deflectus* y *Emericella quadrilineata*, entre otras, han causado infecciones humanas en los últimos años.[65,66] Los síntomas de las aspergilosis engloban manifestaciones de cuatro tipos: micotoxicosis, enfermedades alérgicas, colonizaciones saprófitas o crónicas y enfermedades invasoras o sistémicas.[13] La gravedad de la aspergilosis depende de varios factores, aunque uno de los más determinantes es el estado del sistema inmune del enfermo.[67] Así, se comportan como patógenos oportunistas en pacientes inmunocomprometidos (VIH, trasplantados, pacientes oncológicos).

Cuadro 1. Clasificación del género *Aspergillus*

Género	Subgénero	Sección	
		Anamorfo	**Teleomorfo**
Aspergillus	*Aspergillus*	*Aspergillus*	*Eurotium*
		Restrict	*Eurotium*
	Fumigati	*Fumigati*	*Neosartorya*
		Cervini	-
		Clavati	*Neocarpenteles, Dichotomomyces*
	Ornati	*Ornati*	*Sclerocleista*
	Nidulantes	*Nidulantes*	*Emericella*
		Silvati	-
		Raperi	-
		Usti	*Emericella*
		Bispori	-
		Sparsi	-
		Ochraceorosei	-
	Terrei	*Terrei*	-
		Flavipedes	*Fennellia*
	Circumdati	*Circumdati*	*Neopetromyces*
		Flavi	*Petromyces*
		Nigri	-
		Cremei	*Chaetosartorya*
	Warcupi	*Warcupi*	
	Warcupiella	*Zonati*	*Penicilliopsis*
	Candidi	*Candidi*	-

Samson y Varga, 2010[4]

2.4 Clasificación clínica

Históricamente se consideraba que la causa del 90% de las aspergilosis era *A. fumigatus,* pero en la actualidad esto ha cambiado, ya que una gran variedad de especies del género puede causar aspergilosis. Recientemente se ha reportado que *A. fumigatus* sólo representa el 56% del total de las aspergilosis, seguido por otras especies como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. versicolor.* Sin embargo, hay que tomar en cuenta que las técnicas moleculares han contribuido con una mejor identificación de las especies incluidas dentro de las diferentes secciones de *Aspergillus*, por lo que el número de especies patógenas en humanos ha aumentado, y se incluyen: *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. chevalieri*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. clavatus*, *A. fisheri*, *A. glaucus*, *A. granulosus*, *A. oryzae*, *A. quadrilineatus*, *A. restrictus*, *A.*

sydowi, *A. ustus*, *A. wentii, A. uvarum, A. awamori, A. acidus, A. tubingiensis*.[68-74] En la actualidad las aspergilosis son clasificadas, de acuerdo con su importancia clínica, en primarias y secundarias (Cuadros 2 y 3), las que a su vez generan tanto enfermedades de tipo localizado como sistémicas y pueden ser causadas por diferentes especies (Cudaro 4).

2.4.1 Aspergilosis primaria. Incluye infecciones del tracto respiratorio (pulmonar), infecciones de tipo subcútaneo, infecciones invasivas, ulceraciones y fungemias que son causadas por varios agentes del género *Aspergillus*[71-74] (Cuadro 4).

2.4.2 Aspergilosis secundaria. Son todas aquellas que resultan de una infección primaria y pueden infectar al sistema nervioso central, piel y otros órganos,[71,74] causadas por diferentes especies del género *Aspergillus* (Cuadro 4).

Cuadro 2. Clasificación de aspergilosis primarias

Tipo de aspergilosis	Características clínicas	Factores predisponentes	Referencias
Alergia	Aumento de linfocitos Th2, sistema inmune relacionado localmente, exagerada respuesta inflamatoria, forma extrema del asma, afecciones de senos paranasales, bronquiectasis o fibrosis quística	Historial de atopía, exposición ocupacional	13, 71, 73
Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica	Forma extrema del asma, fiebre, hemoptisis, bronquiectasias, destrucción de las vías respiratorias, fibrosis	Pacientes atópicos, factor ocupacional	71, 74, 75, 76
Neumónica (Invasiva)	Se presenta en individuos con enfermedad pulmonar crónica obstructiva agudizada, tos, dolor de pecho, con o sin hemoptisis, disnea, frote pleural y fiebre	Uso de corticosteroides, neoplasias hematológicas, trasplantes y antecedentes de absceso amebiano	77, 78
Aspergiloma	Bola fúngica, se ubica en senos paranasales, preexiste en lóbulos superiores, fatiga, dolor de cabeza, pérdida de peso, tos productiva, hemoptisis y disnea	Cavidades por tuberculosis	89, 73
Micetoma	Infección granulomatosa crónica de piel y tejidos subcutáneos, afecta tejido óseo y principalmente extremidades, prurito, dolor, fiebre y adenopatías	Ocupación y género (hombre: mujer 4:1)	80, 81
Ulceración Necrótica Postraumática	Inflamación progresiva con necrosis de área afectada, como piel, tejido celular subcutáneo, facscia y ocasionalmente músculo, edema, ampollas, ausencia de linfadenitis	Terapia esteroidea, diabetes, alcoholismo, enfermedad vascular	74, 82, 83
Otomicosis	Colonización del canal auditivo por masas de colonias fúngicas, afección unilateral del conducto auditivo externo, prurito, eritema y descamación	Natación, uso de audífonos, falta de higiene, uso prolongado de gotas con antibióticos y esteroides	73, 74
Queratomicosis	Invasión del epitelio corneal por su abrasión o rotura que causa fotofobia, dolor o inflamación ocular súbita, úlcera corneal indolora y se reduce la agudeza visual	Traumatismo ocular, tratamiento con inmunosupresores, uso indiscriminado de glucocorticoides y antibióticos	73, 74, 84
Endocarditis y trombosis	Fatiga, disnea, fiebre, hipertensión	Pacientes inmunocomprometidos, prótesis valvulares cardíacas, catéteres venosos centrales	74, 85

Cuadro 3. Clasificación de aspergilosis secundaria

Tipo de aspergilosis	Características clínicas	Factores predisponentes	Referencias
Sistema Nerviso Central	Principalmente pacientes de edad avanzada, postrasplante y malignidad hematológica, necrosis hemorrágica masiva, meningitis purulenta focal, aneurismas micóticos, infartos o abscesos, parálisis de los nervios craneales, alteración de la conciencia, convulsiones	Diabetes mellitus, neutropenia, uso de corticosteroides, VIH, quemaduras	86, 87, 88, 89, 90
Onicomicosis	Distrofia, traumatismo, paroniquia, onicolisis, melanoniquia, mal olor	Manicure, uso de uñas, artificiales, edad avanzada, enfermedades vasculares periféricas	74, 91, 92, 93, 94
Piel	Pueden ser primarias (traumatismos) o secundarias (diseminación hematógena), pápulas eritematosas, ampollas hematológicas, abscesos, nódulos rojizos, ulceraciones	Inoculación traumática, vendajes oclusivos, quemaduras, intervención quirúrgica, antibióticos de amplio espectro, esteroides	74, 95, 96
Otros órganos	Se presenta como una aspergilosis invasiva, diseminación vascular, trombosis y embolia que disemina al hongo hacia diferentes órganos, reacciones granulomatosas, diferentes manifestaciones dependiendo de los órganos afectados	Pacientes neutrópenicos, enfermedades hematológicas, trasplantes, enfermedad granulomatosa crónica	74, 97

Cuadro 4. Agentes etiológicos de las variedades clínicas de aspergilosis

Variedad clínica	Agente etiológico
	PRIMARIA
Pulmonar	*A. flavus, A. glaucus, A. oryzae, A. fumigatus, A. terreus, A. ustus, A. ochraceus, A. unguis*
Aspergiloma	*A. glaucus, A. fumigatus, A. flavus, A. niger, A. terreus, A. restrictus, A. sydowii, A. lentulus*
Neumónica (invasiva)	*A. chevalieri, A. candidus, A. fisheri, A. glaucus, A. quadrilineatus, A. restrictus, A. lentulus, A. fumigatus, A. niger, A. flavus, A. terreus*
Micetomas	*A. nidulans, A. flavus, A. fumigatus*
Ulceración Necrótica Postraumática	*A. glaucus, A. ochraceus*
Otomicosis	*A. tubingensis, A. niger, A. sclerotiorum, A. fumigatus, A. candidus, A. wentii*
Queratomicosis	*A. fisheri, A. ustus*
Endocarditis y trombosis	*A. fisheri, A. restrictus, A. ustus*
	SECUNDARIA
Sistema Nervioso Central	*A. candidus, A. clavatus, A. glaucus, A. granulosus, A. ustus, A. fumigatus*
Piel	*A. chevalieri, A. fisheri, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, A. ustus, A. flavus, A glaucus, A. tamarii*
Onicomicosis	*A. sydowii, A. welwitschiae, A. terreus, A. flavus, A. tubingensis, A. unguis, A. niger, A. uvarum, A. nomius, A. tamarii, A. melleus, A. pseudonomius*
Otros órganos	*A. avenaceus, A. protuberans, A. carneus, A. clavatus, A. fisheri, A. fumigatus, A. flavus, A. glaucus, A. nidulans, A. niger, A. granulosus, A. quadrilineatus, A. ustus, A. lentulus, A. westerdijkiae, A. ochraceus, A. tanneri, A. alabamensis, A. pseudonomius, A. fumigatiaffinis, A. fumisynnematus, A. parasiticus, A. novoparasiticus, A. hortai, N. hiratsukae, N. pseudofischerii, N. udagawae, A. deflectus*

2.5 Reproducción sexual

Hasta hace poco tiempo, *A. fumigatus* formaba parte del grupo de hongos considerados exclusivamente asexuales; empero, diversas evidencias llevaron a cuestionar su asexualidad, sugiriendo que podría existir algún estadio sexual aún por descubrir o algún otro mecanismo para promover la recombinación sexual. Estos hallazgos preliminares se referían tan solo a la potencialidad de *A. fumigatus* para llevar a cabo la reproducción sexual y no a una situación real comprobada experimentalmente. Para explicar la asexualidad de *A. fumigatus* se llegó a contemplar la posibilidad de que la especie hubiese perdido en el curso de su evolución parte de la maquinaria genética necesaria para la reproducción sexual.[13,98] Sin embargo, la demostración definitiva de que *A. fumigatus* tiene una fase sexual que fue realizada por O'Gorman et al.[59] quienes lograron reproducir en el laboratorio el ciclo sexual completo, observando la producción de cleistotecios y ascosporas. Con base en sus relaciones filogenéticas y en la morfología de sus estructuras sexuales, el teleomorfo de *A. fumigatus* ha sido asignado al género *Neosartorya* [*Phylum* Ascomycota, Orden Eurotiales, Familia Trichocomaceae y denominado como *N. fumigata*.[59,60] El proceso de apareamiento en este hongo se rige por genes de entrecruzamiento constituídos por dos alelos que están localizados en un solo locus,[99] donde se localiza un idiomorfo (*MAT1-2*) que contiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una proteína reguladora con un dominio de unión al DNA de tipo de alta movilidad (HMG), mientras que el otro ideomorfo (*MAT1-1*) contiene una ORF que codifica una proteína con un motivo llamado caja alfa. En *A. fumigatus* se han descrito ocho cromosomas conteniendo 9926 genes estimados.[100]

El descubrimiento de la fase sexual de este hongo abre la posibilidad de inducir en el laboratorio la ocurrencia de un ciclo sexual completo en *A. fumigatus,* lo que podría facilitar de manera considerable el análisis de la herencia de muchos de los caracteres relacionados con su patogenicidad. Considerando las ventajas y desventajas atribuibles a la reproducción sexual, cabe preguntarse ¿por qué *A. fumigatus* y muchos otros patógenos fúngicos limitan al mínimo la aparición de sus estados teleomorfos? Aunque todavía no existe una respuesta clara a esta pregunta, se sugiere que la limitación de la reproducción sexual podría ser una estrategia de virulencia.[101] Según esta hipótesis, muchos agentes patógenos se reproducen asexualmente, pero al mismo tiempo, mantienen la capacidad para reproducirse sexualmente en respuesta a cambios extremos en las condiciones ambientales o dentro del huésped.[101-103] De este modo, la reproducción sexual permitiría a estos organismos expandir su intervalo ambiental, infectar nuevos huéspedes, evadir el sistema inmune o hacer frente a la terapia antimicrobiana.[103]

Aunque son muchos los autores que han discutido las posibles implicaciones de la reproducción sexual sobre la patogenicidad fúngica, actualmente existen pocas evidencias experimentales que sirvan para confirmar o refutar las hipótesis planteadas. Entre las especies fúngicas de importancia clínica para las que se dispone de un mayor conocimiento sobre el ciclo sexual y su posible relación con la patogenicidad, destaca *Cryptococcus neoformans*.[104] En el caso de *A. fumigatus*, aún no se han llevado a cabo trabajos experimentales que permitan relacionar la ocurrencia de un ciclo sexual con la patogenicidad. Tampoco se tienen datos sobre las posibles diferencias entre los tipos *MAT1-1* y *MAT1-2*, y su relación con la patogenicidad o resistencia a los agentes antifúngicos. De hecho, hasta hace poco

la distribución de tipos sexuales en aislamientos ambientales y clínicos revelaba una relación 1:1,[59,105] o una prevalencia superior del tipo *MAT1-2*.[106] Esta distribución de tipos sexuales, menos desequilibrada que la observada en otros patógenos fúngicos, no parece sugerir una diferencia entre los tipos sexuales de *A. fumigatus* y su virulencia. Sin embargo, los resultados de un trabajo llevado a cabo recientemente por Álvarez-Pérez et al.[107] quienes caracterizaron 102 cepas de *A. fumigatus* de diferente origen (tanto ambiental, como de pacientes con aspergiloma o con AI), constataron que el tipo sexual *MAT1-1* no solo fue el más prevalente entre los aislados clínicos, sino que, además, mostró una asociación estadísticamente significativa con la IA.[107] Por otro lado, también se observó que el tipo sexual *MAT1-1* parece estar relacionado con la actividad elastasa, siendo más prevalente entre los aislados que presentan una mayor habilidad para degradar este sustrato.[108] Esta última observación debe ubicarse en el contexto de otros trabajos llevados a cabo anteriormente, que sugieren la importancia de la actividad elastasa como posible factor implicado en la patogenicidad de *A. fumigatus*.[109,110] Pese al interés de los resultados experimentales, debe reconocerse que la asociación existente entre el tipo sexual de *A. fumigatus* y sus posibles factores de virulencia es aún especulativa, pues no se ha encontrado hasta ahora prueba alguna de que el locus *MAT* esté ligado a algún otro locus relacionado con su patogenicidad. Además, la posible asociación entre el tipo sexual y la patogenicidad de *A. fumigatus* debería ser confirmada en modelos animales. Esta aproximación experimental, que permitiría identificar cualquier posible ventaja de uno de los dos tipos sexuales de *A. fumigatus* en la colonización e infección del huésped, requeriría la construcción de cepas isogénicas que se diferencien tan solo

en el locus *MAT.* Por otro lado, resulta interesante el hecho de que diferentes aislamientos de *A. fumigatus* procedentes de un mismo paciente puedan pertenecer a diferente tipo sexual, tal y como lo han descrito Paoletti et al.[105] y Álvarez-Pérez et al.[108] Esta observación puede considerarse indicativa de la ocurrencia de infecciones policlonales de este hongo oportunista, ya que los aislados de diferente tipo sexual han de ser necesariamente distintos, independientemente de los resultados de tipificación molecular. La coexistencia de cepas de *A. fumigatus* sexualmente compatibles en el interior de un huésped también sugiere la posibilidad de que los dos tipos sexuales tengan predilección por diseminarse en distintos tejidos y órganos, o incluso, que pudieran llegar a aparearse dentro del huésped. Esta última posibilidad, en caso de demostrarse, sería ciertamente preocupante, ya que la aparición de nuevas variantes genéticas del hongo durante el curso de una colonización o infección podría llegar a comprometer la eficacia de los tratamientos. Sin embargo, parece poco probable que la reproducción sexual entre cepas compatibles de *A. fumigatus* se lleve a cabo a 30 ºC. Además, todavía no se ha demostrado la expresión de los genes relacionados con el ciclo sexual de *A. fumigatus* bajo condiciones diferentes al cultivo en el laboratorio, como puede ser la infección experimental de cultivos celulares o en modelos animales de aspergilosis. Finalmente, el carácter multifactorial de la patogenicidad de *A. fumigatus*puede complicar el análisis de la relación entre el tipo sexual y la virulencia. [1,111-113] Por ejemplo, podría ocurrir que el tipo sexual estuviera relacionado con ciertos factores de patogenicidad, pero no con otros, de manera que dos cepas de distinto tipo sexual que se diferencien en cuanto a sus factores de virulencia, considerados de manera individual, muestren la

misma patogenicidad. Además, podría ocurrir que el fondo genético de cada cepa de *A. fumigatus* juegue algún papel en la determinación del efecto del tipo sexual sobre la virulencia, como se ha demostrado en el caso de *C. neoformans* serotipo D36.[114]

2.6 Patogenicidad

Las infecciones oportunistas, como la AI se relacionan directamente con factores de predisposición asociados al huésped; sin embargo, los agentes infecciosos también tienen un papel crucial para que la enfermedad se establezca. Diversos estudios han demostrado que la virulencia de las especies de *Aspergillus* es multifactorial; dado que *A. fumigatus* es el patógeno oportunista causante del 90% de las aspergilosis invasivas con un 50–95% de mortalidad, los estudios se han enfocado en determinar los factores relevantes en el desarrollo de la infección.[115] Dentro de los numerosos factores que se han descrito hasta el momento se encuentran los sistemas de adherencia, las toxinas y las enzimas extracelulares.[116]

La adherencia de *A. fumigatus* es un paso crucial para el establecimiento de la aspergilosis. El hongo posee la habilidad de adherirse específicamente a los tejidos del húesped a través de adhesinas, proteínas presentes en la superficie de los conidios que brindan un carácter hidrofóbico y que les permite unirse a otras proteínas del epitelio pulmonar como el fibrinógeno, laminina, albúmina y colágeno, entre otras.[2,117]

Asimismo, *A. fumigatus* produce metabolitos secundarios (toxinas) o extrolitos que secreta en el medio donde se desarrolla; entre las sustancias que sintetiza se encuentran la fumigalina, el ácido helvólico y la gliotoxina, los que ejercen un efecto

inmunosupresor al inhibir la fagocitosis y la expresión de citocinas por los macrófagos.[36,113]

Un mecanismo asociado a la patogenicidad de *Aspergillus* es la producción de melanina, que constituye también un mecanismo de evasión del sistema inmune. La melanina es un pigmento verde azulado de carácter hidrofóbico presente en los conidios que protege el patógeno contra especies reactivas de oxígeno y la fagocitosis.[118,119]

Por otro lado, *Aspergillus* se caracteriza por la producción de una gran variedad de enzimas extracelulares como nucleasas, fosfatasas, peptidasas y proteasas que pueden degradar macromoléculas complejas con el fin de proveerle nutrimentos. Uno de los factores necesarios para que *A. fumigatus* se disemine en los tejidos es la degradación del sustrato donde se encuentra; dado que las membranas celulares del huésped están compuestas por lípidos y proteínas, principalmente colágeno y elastina en los pulmones, ha sido de gran interés el estudio de proteasas en especies de *Aspergillus* como posibles factores de virulencia.[115,117]

2.7 Elastasa

La elastasa es una enzima proteolítica presente tanto en los humanos (gránulos azurófilos de los neutrófilos) como en algunos microorganismos. Esta proteasa cuenta con una amplia especificidad de sustrato y es una de las pocas enzimas que son capaces de degradar la elastina, proteína de la matriz extracelular del pulmón.[120,121]

Se ha demostrado que las elastasas están involucradas en infecciones pulmonares ocasionadas por microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides*

nodosus y *Staphylococcus epidermidis*.[116,122] Por lo anterior, se ha abordado el estudio de esta enzima en *A. fumigatus* y su papel en el desarrollo de la aspergilosis invasiva. Kothary et al.[122] estudiaron la patogenicidad de cepas productoras y no productoras de elastasa en aislados ambientales de *A. fumigatus* en un modelo de infección en ratones. Los aislados de *A. fumigatus* se obtuvieron de muestras del aire, cerca de una planta de tratamiento de aguas residuales y monitorearon la producción de elastasa; posteriormente compararon las cepas productoras y no productoras de esta enzima con su capacidad para producir aspergilosis invasiva en ratones inmunocomprometidos con acetato de cortisona. Todos los ratones expuestos a las cepas productoras de elastasa murieron dentro de 48-96 h y presentaron gran cantidad de hifas en los pulmones y necrosis de los alveolos; en contraste, dos tercios de los ratones infectados por cepas fúngicas no productoras de elastasa sobrevivieron. De esta forma, la actividad elastasa estuvo implicada en la invasión fúngica y patogenicidad.[122] En otro estudio se investigó la producción de elastasa en aislados clínicos de *Aspergillus*; los aislados involucrados en procesos invasivos produjeron elastasa, pero no todos los aislados que mostraron actividad de la enzima estuvieron asociados con enfermedades invasivas. Por su parte, Blanco et al.[109] evaluaron la actividad de elastasa *in vitro* de cepas ambientales y clínicas de *A. fumigatus* en un medio con elastina y rosa de bengala. Además, calcularon el índice de actividad elastasa al dividir el diámetro del halo de lisis de la elastina entre el diámetro de la colonia. Mediante este índice determinaron un punto de corte a 0.9, el cual mostró una sensibilidad del 97% y una especificidad del 83.3%, lo que permitió la predicción de la AI en cepas patógenas o no patógenas.

Con base en estos estudios, el interés por demostrar una correlación entre la actividad elastasa y el desarrollo de la AI ha ido en aumento; sin embargo, hay autores que también se han enfocado en el estudio de otras enzimas que posiblemente estén involucradas en esta infección, tales como las fosfolipasas o las proteasas ácidas.[117,123]

2.8 Variabilidad genética

Dentro de las técnicas que se han aplicado para evaluar la diversidad genética en *Aspergillus* están el RFLP (restriction fragment length polymorphism), el AFLP (amplified fragment length polymorphism) y el RAPD (random amplification of polymorphic DNA).[1,124,125] Duarte-Escalante et al.[126] evaluaron la diversidad genética de aislados de *A. fumigatus* de diferente origen geográfico (México, Argentina, Francia y Perú). Sus resultados mostraron una mayor variabilidad génetica en los aislados clínicos que en los ambientales, mientras que el modo de reproducción de los aislados clínicos y ambientales fue recombinante. Asimismo, una red de haplotipos mostró que la mayoría de los aislados se agrupó de acuerdo con su origen geográfico. Posteriormente, Frías De León et al.[127] llevaron a cabo el análisis de la variabilidad fenotípica de los mismos aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati* utilizados por Duarte-Escalante et al.[126] y estimaron la relación entre la variabilidad fenotípica, el origen geográfico y las características genotípicas. Los aislados de Perú mostraron características fenotípicas específicas que claramente los diferenciaron del resto, además de que correlacionaron con los datos genotípicos, mostrando una asociación estadísticamente significativa. Otro método que se ha utilizado para tipificar aislados de *A. fumigatus* es el MLST

(multilocus sequence typing), en el que se incluyen siete fragmentos de secuencias de genes; sin embargo, presenta un bajo nivel de discriminación entre cepas, dando como resultado una baja diversidad genética debido a que los marcadores que se utilizan son regiones que codifican para proteínas conservadas, lo que resulta en una baja eficiencia para diferenciar cepas.[106,128] Debido a la extrema diversidad genética de *A. fumigatus*,[30] un método muy preciso de tipificación debe ser aplicado para realizar estudios epidemiológicos de infecciones con el fin de determinar la presencia de brotes infecciosos, la fuente de la infección hospitalaria y la presencia de características moleculares que confieran resistencia a los antifúngicos, entre otros aspectos.[129] Por tanto, se han propuesto otros marcadores moleculares como los microsatélites de 12-mer, que se encuentran en la región que codifica una proteína putativa de superficie celular (AFUA_3G08990). Este método se utilizó para tipificar aislados de *A. fumigatus* obtenidos de seis brotes nosocomiales de AI, y se identificó clonalidad y genotipos distintos entre aislados del hongo, además de que fue concordante con el método *Afut1*-RFLP que tiene alto poder discriminatorio.[130,131] Con base en lo anterior, la tipificación con el marcador microsatélite *CSP* (celular surface protein) es una alternativa para distinguir aislados de *A. fumigatus;* la diversidad de secuencias dentro de la región repetida del gen *CSP* es mucho mayor que la observada con los marcadores previamente reportados. Tomando en consideración las características de este marcador, Klaassen et al.[132] subtipificaron una colección de aislados clínicos de *A. fumigatus* recuperados de varios hospitales e identificaron linajes *CSP* de tipos relacionados estrechamente dentro de los aislados estudiados. Además, propusieron una nomenclatura para repetidos individuales, así como para los tipos

CSP, para normalizar la presencia de tipos *CSP* distribuidos en el mundo. Posteriormente, Kidd et al.[133] y Gao et al.[134] aplicaron la misma estrategia propuesta por Klaassen et al.[132] para tipificar aislados clínicos y ambientales procedentes de Australia y China e identificar diferencias filogeográficas de los aislados procedentes de Europa y Norte América. Sin embargo, la mayoría de las variantes *CSP* son compartidas, reportando nuevas variantes para cada región geográfica estudiada.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Los estudios epidemiológicos acerca de *A. fumigatus* en México son escasos; sin embargo, nuestro grupo de trabajo ha mostrado que la diversidad genética entre aislados clínicos de *A. fumigatus* de diferente fuente y origen geográfico (México, Argentina, Francia y Perú) poseen una mayor variabilidad genética que los ambientales, mientras que el modo de reproducción de los aislados clínicos y ambientales es recombinante. Asimismo, Duarte-Escalante et al.[126] evidenciaron a través una red de haplotipos, que aislados de *A. fumigatus* de México, Argentina, Francia y Perú, se agruparon de acuerdo con su origen geográfico. Posteriormente, Frías De León et al.[126] llevaron a cabo el análisis de la variabilidad fenotípica de los mismos aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati,* utilizados por Duarte-Escalante et al.[126] y estimaron la relación entre la variabilidad, el origen geográfico y las características genotípicas. Los aislados de Perú mostraron características fenotípicas particulares que claramente los diferenciaron del resto, además de que correlacionaron con los datos genotípicos, mostrando una asociación estadísticamente significativa. Estos trabajos constituyen la base para continuar

con el estudio de diferentes aspectos biológicos del hongo, entre otros, obtener una colección de aislados de *Aspergillus* ya que no existen en el país bancos de información reglamentaria y consistente, ni centros de referencia sobre los aislados. A pesar de la escasa información existente y de los datos no oficiales, se sugiere que la frecuencia de esta micosis ha ido en aumento.

Las preguntas centrales de investigación en que está basado este trabajo son ¿Cuál es la diversidad fúngica en ambientes hospitalarios de México? ¿Cuál es la frecuencia y la variabilidad genética de *A. fumigatus* en esos ambientes hospitalarios, y su relación con el riesgo de contraer la aspergilosis? ¿Qué factores específicos de *A. fumigatus* están asociados con el desarrollo de la aspergilosis invasiva? La comprensión de las relaciones entre los diferentes aspectos involucrados en el presente estudio, permitirá entender mejor la enfermedad, determinar factores de riesgo y evaluar el potencial de las rutas de dispersión del patógeno. Lo anterior permitirá desarrollar mejores lineamientos para el manejo de pacientes y determinar la existencia y frecuencia del patógeno para incidir en las estrategias de prevención ante la expansión de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Existen especies de *Aspergillus* no reportadas y una alta frecuencia y diversidad genética en aislados de *A. fumigatus* de ambientes hospitalarios, en los que predomina el tipo sexual *MAT1-1* asociado con la producción de elastasa.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Determinar la diversidad fúngica, así como la frecuencia y variabilidad genética de *A. fumigatus* en ambientes de hospitales de la Ciudad de México para evaluar el riesgo de contraer la aspergilosis, y establecer factores asociados con la AI.

5.2 Objetivos particulares

- Aislar hongos ambientales en diferentes áreas de dos hospitales, ubicados en el centro y norte de la Ciudad de México.
- Identificar y caracterizar *Aspergillus* spp. por métodos fenotípicos (termotolerancia, tamaño de conidios y vesículas) y moleculares (genes *BenA* y *ActA*).
- Determinar la actividad elastasa e identificar los genotipos *MAT1-1* y *MAT1-2* de los aislados obtenidos de *A. fumigatus* para establecer su relación con la AI.
- Estudiar la variabilidad genotípica de aislados ambientales de *A. fumigatus*, a través del microsatélite *CSP*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Áreas de muestreo. El muestreo se llevó a cabo de mayo a octubre de 2012 (temporada de lluvias) y de noviembre de 2012 a abril de 2013 (estación seca) en dos instituciones de salud ubicadas en la Ciudad de México: un hospital de especialidad de nivel III (ubicado al norte de la ciudad) con casi 1,400 pacientes por

mes y un Instituto de Oftalmología (ubicado en el centro de la ciudad) con capacidad para 100 pacientes. Las instituciones fueron designadas como hospital 1 y 2, respectivamente. Las áreas seleccionadas en el hospital 1 fueron hematología, unidad de cuidados intensivos para adultos y unidad de cuidados intensivos pediátricos. Las áreas de la sala de operaciones, sala de recuperación y sala de pacientes ambulatorios fueron muestreadas en el hospital 2. El muestreo de aire en las diferentes áreas se realizó siempre los mismos días y en el mismo horario.

6.2 Procedimiento de muestreo de aire. Las muestras de aire se obtuvieron con un muestreador de partículas viables Termo-Andersen de una sola etapa (Thermo Electron Corporation, MA, USA) que contenía una placa Petri con medio agar Sabouraud (Bioxón, Becton Dickinson, CDMX, MX). El muestreador se colocó a una altura de 1.5 m en cada área y en el centro de cada habitación de muestreo. La muestra fue captada con un flujo de vacío de 28.3 L/min durante 15 min. El muestreo se realizó por triplicado.

6.3 Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC). De cada área de muestreo se calculó el número promedio de todas las colonias cultivadas en las tres placas de agar Sabouraud (Bioxón) y se determinó el número de UFC/m^3 de aire, según las instrucciones descritas en el protocolo del muestreador Termo-Andersen. Además, las UFC/m^3 de aire se calcularon por separado para cada colonia diferente observada en las placas.

6.4 Aislamiento e identificación de hongos. Después de tres días de incubación a 28 °C se examinaron todas las placas y se contaron las colonias. Todas las colonias morfológicamente diferentes fueron identificadas por su macro y micromorfología.

6.5 Identificación por macro y micromorfología. Los aislados cultivados en agar Sabouraud a 28 °C durante 4-7 días se observaron para identificar la morfología típica de cada hongo como el color y la textura colonial. Las características micromorfológicas de todos los aislados se analizaron según el método de microcultivo de Riddell (1950),[135] que consistió en cortar asépticamente bloques de 1 cm^3 de medio agar Sabouraud, cada bloque se colocó sobre un portaobjetos estéril y se inoculó con el aislado correspondiente, en las cuatro aristas superiores del medio de cultivo, sobre el bloque se colocó un cubreobjetos estéril y se incubó dentro de una caja de Petri a 37 °C durante 4 días. Para evitar la deshidratación del agar durante la incubación, se colocó un algodón humedecido con agua estéril dentro de las cajas de Petri. Posteriormente, se separó cuidadosamente el cubreobjetos del agar y se depositó sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se observó al microscopio (Olympus América Inc., Melvilla, NY), con el fin de analizar las características morfológicas de los conidios (tamaño y forma) y el tamaño y forma de las vesículas de cada uno de los aislados. Las características microscópicas de los aislados se registraron a través de una cámara digital.[135]

6.6 Diversidad fúngica. La riqueza y abundancia de organismos se determinó en cada área de muestreo en los dos hospitales. La riqueza se obtuvo con base en el

número de especies aisladas en cada área de muestreo. La abundancia fue determinada por el número de ocurrencias de cada microorganismo en cada área dividido por el total de UFC de cada área y multiplicado por 100. La diversidad fúngica se calculó para cada institución con base en la construcción de una matriz de presencia y abundancia de la especie. La diversidad se calculó usando los índices Shannon-Wiener (H) y Simpson con el software PAST versión 1.89 (//folk.uio.no/ohammer/past).[136]

6.7 Análisis estadístico. La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para determinar diferencias estadísticamente significativas en la concentración de conidios en el ambiente (UFC/m^3), entre las estaciones seca y fría de cada área de muestreo, y entre cada hospital. Para los datos con y sin distribución normal, se realizó el análisis de ANOVA. Todas las pruebas se llevaron a cabo con un nivel de significancia del 5% utilizando el paquete NCSS 7.0 (www.ncss.com).

6.8 Caracterización fenotípica de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus*

6.8.1 Termotolerancia. Se llevó a cabo con los aislados identificados como *Aspergillus* spp. (Tabla 8), de acuerdo con lo descrito por Frías-De-León et al.[127] y Mesa-Arango et al.[137] de la siguiente manera: a partir del crecimiento de cada aislado durante 4 días en agar Sabouraud a 37 °C, se preparó una suspensión de 5 x 10^3 conidios/mL con solución salina isotónica amortiguadora de fosfatos con Tween 20 utilizando una cámara de Neubauer y se inocularon por triplicado, para cada temperatura (28 y 50 °C). Se monitoreó el crecimiento de las mismas por 7

días (168 horas). En cada observación se midió el diámetro de las colonias y posteriormente se realizó el cálculo de tasa de crecimiento (TC) y porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) utilizando las siguientes fórmulas de acuerdo con el modelo de Baranyi y Roberts.[138] **TC = C/D (TC** = tasa de crecimiento, C = diámetro de la colonia/D = días de incubación), **%IC = E – F/E X 100 (%IC =** porcentaje de inhibición del crecimiento, E = diámetro de la colonia a 28 ºC - F=diámetro de la colonia a 50 ºC/E = diámetro de la colonia a 28 ºC).

6.8.2 Tamaño de conidios y vesículas. Se midió el diámetro de 30 conidios y 10 vesículas de cada aislado de *Aspergillus* sección *Fumigati* cultivado en agar Sabouraud a 28 °C durante 4 d, con un micrómetro ocular calibrado (Olympus).

6.9 Caracterización genotípica

6.9.1 Extracción de DNA. A partir de cada cultivo monospórico de las secciones de *Aspergillus* identificadas previamente por métodos fenotípicos, y sembrados en PDA (papa-dextrosa-agar), se obtuvo una suspensión de conidios de la siguiente manera: se agregó a cada tubo 1 mL de amortiguador de fosfatos (Solución A (NaH_2PO_4 0,2 M): disolver 27.6 g de NaH_2PO_4. H2O en agua destilada, completando un litro. Solución B (Na_2HPO_4 0,2 M): 53.65 g de Na2HPO4. 7 H2O se disuelven en agua destilada, llevando el volumen final a 1 litro. Para obtener el pH de 7.5, mezclar 80 ml de solución A con 20 ml de la solución B) adicionado con tween 80 y se resuspendió por agitación en vórtex-Genie 2 (Daigger Scientific Industries. Inc, Bohemia, NY, USA) a 5,000 rpm; posteriormente, se sembró en 50 mL de medio líquido ELPD (extracto de levadura-peptona-dextrosa) (papa sin pelar

200 g, dextrosa 10 g, agar 18 g y agua destilada 1 litro), se incubó a 37 °C en agitación durante 2 días o hasta observar crecimiento micelial. Se cosechó individualmente la biomasa micelial de cada aislado por filtración con jeringas de 20 mL con filtros swinex, utilizando papel filtro Whatman No. 1. Enseguida se lavó el micelio con agua Milli Q estéril y se secó con papel filtro. Posteriormente, la extracción del DNA se llevó a cabo con el Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, Austin, TX, USA), de la siguiente manera: se tomaron 100 mg de masa micelial húmeda y se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 mL conteniendo 0.2 g de perlas de vidrio previamente estériles (400-455 µm de diámetro, lavadas con HCl) y el amortiguador de extracción AP1 del Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). Los tubos fueron colocados en un equipo FastPrep (Thermo Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) y el método para el rompimiento de la pared del hongo, fue el propuesto por Williams et al.,[139] y Calderón et al.,[140]. El ensayo para obtener la mayor cantidad de micelio roto inició con las condiciones reportadas por Calderón et al.[140] es decir, 6 periodos de 40 s a 6 m/s con 2 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Se analizaron las suspensiones de micelio resultantes bajo el microscopio, para determinar el tiempo y la velocidad óptima para obtener el mayor porcentaje de micelio roto y su contenido liberado dentro de la suspensión. Posteriormente, se modificaron las condiciones a 4 periodos de 40 s a 4 m/s con 5 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Después de este procedimiento, se adicionaron 4 µL de RNAsa a 100 mg/mL, se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó la mezcla por 10 min a 65 ºC, mezclando 2 ó 3 veces, por inversión. Enseguida, se adicionaron 130 µL del amortiguador AP2 y se incubó por 5 min en hielo, se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm. Se transfirió el volumen total del sobrenadante a la columna lila

QIAshredder mini spin, sostenida en un tubo colector de 2 mL para centrifugar a 14,000 rpm por 2 min. El sobrenadante obtenido en el tubo colector se transfirió a un nuevo tubo, se adicionaron 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E y se mezcló rápidamente con una micropipeta. Se transfirieron 650 µL de la mezcla anterior a la columna DNeasy mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó 1 min a 9000 rpm; se desechó el sobrenadante y se repitió este paso hasta acabar el volumen. Posteriormente, se cambió el tubo colector y se realizaron dos lavados con 500 µL del amortiguador AW; el primero se centrifugó por 1 min a 8,000 rpm y el segundo 2 min a 14,000 rpm. Por último, la columna se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL, y se adicionaron 50 µL de agua Milli Q, se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8,000 rpm para eluir el DNA. La concentración y pureza del DNA (cociente de absorción 260/280 =1.8-2.0) se determinó en un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Wilmington, DE, USA) y por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, teñido con GelRed (10000X, Biotium, Fremont, CA, USA), en una cámara de electroforesis, comparando con diferentes concentraciones del fago Lambda (GIBCO BRL®, Waltham, MA, USA) de 10, 20 y 50 ng, con un tiempo de migración aproximado de 45 min a 100 V y se observó el gel en un fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Posteriormente, la concentración del DNA de cada uno de los aislados de las secciones de *Aspergillus* identificadas, fue ajustada a una concentración de 5 ng/ µL para su utilización en ensayos posteriores.

6.9.2 Amplificación de la secuencia parcial del gen de la actina (*ActA*). Se utilizó el método descrito por Carbone y Konh[141], el cual utiliza los oligonucleótidos Act-783R (5´TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3´) y Act-512F (5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3') que delimitan una región de 300 pb. Se emplearon las siguientes condiciones iniciales: en un volumen de reacción de 25 µL, contenía amortiguador 1X (Tris-HCl pH 8.8 100 mM, KCl 500 mM, Nonidet P40 (v/v 0.8%), 200 µM de dNTPs (Applied Biosystems Inc. Foster, CA, USA), 2 mM de $MgCl_2$, 0.5 U de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems Inc.) y 0.5 pM de cada oligonucleótido, 10 ng/µL de DNA, con las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C por 8 min, seguido por 35 ciclos a 95 °C por 15 s, 55 °C por 20 s, y 72 °C por 60 s, con una extensión final a 72 °C por 5 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Esco Swift®Maxi™ThermalCycler Block (Esco Healthcare Pte. Ltd., Singapore). Los productos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed (10000X, Biotium Inc.), en amortiguador 0.5 X TBE (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM), a 100 V por un tiempo aproximado de 60 min. Se utilizó el marcador de tamaño molecular de DNA Ladder de 100 bp (Invitrogen, CA, USA). El gel fue visualizado en un sistema de fotodocumentación Gel Doc™ XR (Bio-Rad). Para obtener las condiciones óptimas para la PCR, se realizaron curvas de concentración de DNA y de $MgCl_2$ y se probaron diferentes temperaturas de alineamiento.[141]

6.9.3 Amplificación de la secuencia parcial del gen de la β-tubulina (*BenA*). Se llevó a cabo el procedimiento reportado por Glass y Donaldson.[142] Inicialmente, en un volumen final de 25 µL de reacción, se emplearon 10 ng de DNA genómico, 2.0

mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs (Applied Biosystems Inc.), 1 U *Taq* polimerasa (Applied Biosystems Inc.) y 30 pmoles de cada oligonucleótido Bt2a (5`-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3´) y Bt2b (5´-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3´). La amplificación se realizó en un termociclador (ESCO, Swift Maxi) con las condiciones: 95 °C por 8 min, 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 55 °C por 20 s y 72 °C por 1 min, y un ciclo de 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con 0.8 µL/100 mL de GelRed (10000X, Biotium Inc.). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TBE 0.5 X. Se utilizó el marcador de tamaño molecular de DNA Ladder de 100 bp (Invitrogen). Las imágenes de los geles se capturaron en un Fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad). Para obtener las condiciones óptimas para la PCR, en este estudio se realizaron curvas de concentración de DNA, dNTPs, $MgCl_2$, oligonucleótidos y se probaron diferentes temperaturas de alineamiento.[142]

6.9.4 Secuenciación de los fragmentos amplificados. Los fragmentos amplificados de los genes *ActA* y *BenA* de los 77 aislados de las secciones de *Aspergillus* spp. se enviaron a secuenciar en ambos sentidos a Macrogen USA (Rockville, MD, USA).

6.9.5 Análisis de secuencias. Las secuencias obtenidas de los aislados fueron editadas con el programa BioEdit ver. 7.1.9. (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Inicialmente se revisó la secuencia para identificar bases degeneradas; esos sitios fueron comparados con el

electroferograma respectivo y se corrigieron las bases editando la secuencia. Posteriormente, fueron analizadas con el algoritmo Blast (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) para verificar la identidad (coincidencia total entre dos secuencias), similitud (grado de coincidencia entre dos secuencias), y e-valor (estimación del número de alineamientos que se espera para una puntuación X [o superior] en la búsqueda que se está realizando si la base de datos fuese una colección de letras al azar; para que sea real el valor "e" debe ser cercano a cero). Enseguida, el alineamiento de las secuencias se llevó a cabo con el programa MAFFT (//mafft.cbrc.jp/alignment/server/).[143] Finalmente, se eligió el mejor modelo evolutivo aplicado a este alineamiento con el programa JModelTest 2 (www.github.com/ddarriba/jmodeltest2).[144]

6.9.6 Análisis filogenético. Con el propósito de tipificar las especies de *Aspergillus* spp., se utilizaron los métodos estadísticos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. En el primer caso se utilizó una prueba de filogenia que incluye el método de bootstrap con 1,000 réplicas y el modelo evolutivo GTR G+I; se aplicó el método heurístico NNI (Nearest-Neighbor-Interchange) y el análisis se llevó a cabo con el programa MEGA7 (www.megasoftware.net/).[145] Para el método de Inferencia Bayesiana se aplicaron los siguientes ajustes: una longitud de cadena de 1,100,000, frecuencia de submuestreo de 200, cadenas calientes 4, temperatura de las cadenas 0.2, el modelo evolutivo fue GTR G+I y el análisis se realizó con el programa MrBayes 3.2.2 (//mrbayes.sourceforge.net/download.php).[146]

6.10 Determinación de la actividad de elastasa en aislados de *A. fumigatus.*

Se utilizaron los aislados identificados previamente como *A. fumigatus*, con base en características fenotípicas y genotípicas. Los aislados se sembraron en tubos estériles de 15 mL conteniendo agar Sabouraud (Bioxón) y se incubaron a 37°C durante tres días, o hasta observar crecimiento.

6.10.1 Estandarización para determinar la actividad de elastasa. La actividad elastasa se evaluó en el medio de elastina,[122] que contiene 0.05% de elastina, 0.05% de base de carbono para levaduras, 0.01% de rosa de bengala y 1.5% de agar, en amortiguador de boratos 0.05 M pH 7.6 (ácido bórico 3.09 g, NaCl 75 mM 2.19 g, tetraborato de sodio 4.77 g disolver en 500 mL de agua destilada). Durante la preparación del medio de cultivo, para evitar la desnaturalización de la elastina primero se añadieron todos los demás componentes en el amortiguador, y se esterilizó en autoclave; una vez estéril se dejó enfriar y posteriormente se añadió la elastina disuelta en agua estéril. El índice de actividad de elastasa (IAE) se reportó de acuerdo con Blanco et al.[109] usando la siguiente fórmula: IAE= diámetro del halo de degradación de elastina (DE)/diámetro de crecimiento (DC).[109]

Inicialmente, tomando en cuenta que *A. fumigatus* se caracteriza por tener una rápida velocidad de crecimiento, se realizaron curvas de crecimiento para verificar que el rosa de bengala retardara el mismo, así como para seleccionar el inóculo adecuado que permitiera realizar las mediciones durante 15 días.[109] Para el experimento se seleccionaron cuatro aislados de *A. fumigatus* (9A, A10, B4 y 411A) y un aislado de *A. niger* como testigo negativo. A partir de cada aislado se preparó una suspensión de conidios en 1 mL de solución salina isotónica-tween 20 al

0.05% (NaCl 0.85% 99.95 mL, tween 20 0.05 ml); los conidios fueron cuantificados en una cámara de Neubauer y se ajustaron a $1x10^5$, $1x10^6$ y $1x10^7$ conidios/mL. Se inocularon 10 µL de cada suspensión en tres medios de cultivo: agar Sabouraud, agar Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y medio de elastina (Figura 1).[122] Dado que a nivel fisiológico la concentración de sales es de fosfatos y no de boratos, los ensayos se realizaron utilizando medios con elastina preparados con amortiguador de boratos y con amortiguador de fosfatos.[122] Las suspensiones de conidios se inocularon sobre un disco de papel filtro colocado en el centro de cada medio de cultivo. Los cultivos se incubaron a 37 °C y la lectura de su crecimiento y del halo de lisis se realizó a los 7, 10 y 15 días.

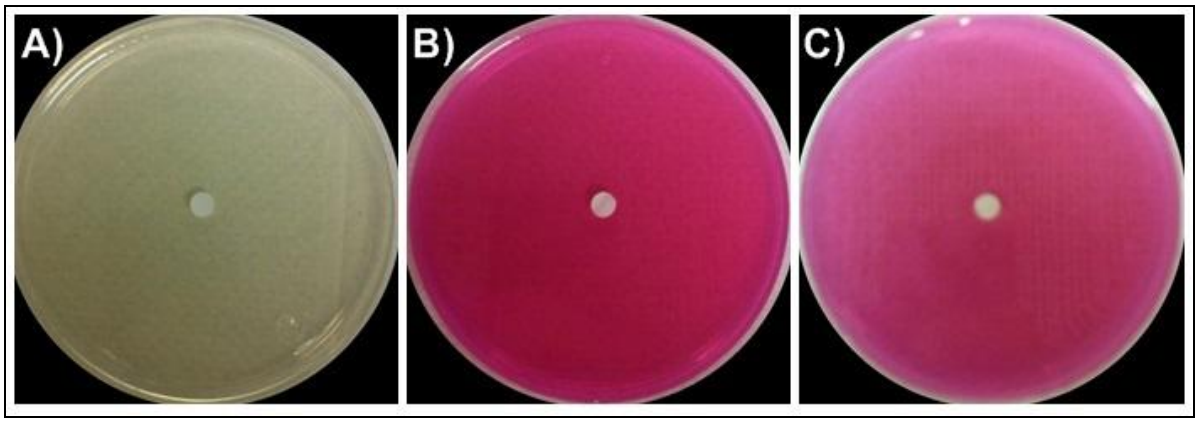

Figura 1. Medios de cultivo sin inóculo: A) Sabouraud, B) Sabouraud con rosa de bengala y C) Medio con elastina

Para determinar que el testigo negativo no ocasionara falsos positivos, se repitió el experimento anterior. Se probaron tres muestras ambientales (9A, A10 y B4) para ver si el halo de lisis de elastina era mayor. De cada una de las muestras se prepararon inóculos de $1x10^7$ conidios/mL y de aquí se inocularon 7 µL sobre un círculo de papel filtro colocado en el centro de los diferentes medios de cultivo: Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% (testigo positivo de crecimiento), medio

de Kothary et al.[122] con amortiguador de fosfatos y medio de Kothary et al.[122] con amortiguador de boratos.

6.10.2 Determinación de la actividad de elastasa. Con base en las condiciones estandarizadas, se determinó el IAE de todos los aislados de *A. fumigatus.* El IAE se calculó con la fórmula previamente mencionada.[109] El experimento se realizó por triplicado.

6.10.3 Análisis de datos. El análisis estadístico de los datos generados se realizó con base en el modelo del test Chi-cuadrada.

6.11 Determinación del genotipo sexual

Se utilizó la técnica de PCR múltiple para identificar los genotipos *MAT1-1* y *MAT1-2,* de acuerdo con las condiciones reportadas por Paoletti et al.[105].Se utilizaron los oligonucleótidos *MAT1-1*, *AFM1* (5´-CCTTGACGCGATGGGGTGG-3´), y *MAT1-2*, *AFM2* (5´-CGCTCCTCATCAGAACAACTCG- 3´), junto con un oligonucleótido común, *AFM3* (5´-CGGAAATCTGATGTCGCCACG-3´), que amplifican un fragmento de 834 pb en el genotipo *MAT1-1* y otro de 438 pb en el genotipo *MAT1-2*. La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, conteniendo: 20 ng de DNA, 200 µM dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, amortiguador 1X (Tris-HCl pH 8.8 100 mM, KCl 500 mM, Nonidet P40 (v/v 0.8%), 1 U de *Taq* polimerasa, 50 pmoles de los oligonucleótidos *AFM1* y *AFM2*, y 100 pmoles del oligonucleótido *AFM3*. La amplificación se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-

Rad) con las siguientes condiciones: 5 min a 95 ºC, 35 ciclos de 30 s a 95 ºC, 30 s a 60 ºC, 1 min a 72 ºC, con una extensión final de 5 min a 72 ºC.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5X teñido con GelRed™ (10000X, Biotium Inc.). El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 100 V en una cámara de electroforesis Sub-cell® GT y mini-sub® cell GT (Bio-Rad). El marcador de tamaño molecular fue 100 bp DNA Ladder (Applied Biosystems Inc.). Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad).

6.12 Tipificación de los aislados de *A. fumigatus* con el microstélite *CSP*

6.12.1 Amplificación de microsatélite *CSP.* La amplificación de las secuencias parciales del gen *CSP* de los aislados de *A. fumigatus* se realizó bajo las condiciones reportadas por Balaje et al.[147] con los oligonucleótidos CSP-F (5´-TTGGGTGGCATTGTGCCAA-3´) y CSP-R (5´-GGAGGAACAGTGCTGTTGGTGA-3´) (Sigma-Aldrich Corp., CA, USA) que amplifican un fragmento de ~ 550 a 700 pb. Con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de amplificación, se realizaron curvas de concentración de reactivos (DNA, oligonucleótidos y $MgCl_2$). Inicialmente, se llevó a cabo la curva de DNA utilizando 10, 20, 25 y 30 ng. La mezcla de reacción (25 μL) consistió en dNTPs 200 μM (Applied Biosystems Inc.), $MgCl_2$ 1.2 mM (Applied Biosystems Inc.), 100 pmol de cada oligonucleótido CSP-F y CSP-R (Sigma-Aldrich) y *Taq* polimerasa 1 U (Applied Biosystems Inc.) en amortiguador 1X (Tris-HCl pH 8.8 100 mM, KCl 500 mM, Nonidet P40 (v/v 0.8%) (Applied Biosystems Inc.). Las condiciones fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94 ºC, seguido de 35 ciclos de 15 s a 94 ºC, 30 s a 62 ºC, 30 s a 68 ºC, 1 ciclo de

extensión final de 2 min a 68 ºC en un termociclador ESCO-Switf (ESCO). Una vez determinada la cantidad adecuada de DNA, se realizaron las curvas de oligonucleótidos (10, 25, 50, 100, 200 pmol) y $MgCl_2$ (1.2, 1.5, 2.0, 2.5 mM). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en una cámara Sub-cell® GT y mini-sub® cell GT (Bio-Rad) en gel de agarosa al 1.5%, teñido con 0.8 μL de GelRed (10000 X), el corrimiento se realizó a 90 V en amortiguador TBE 0.5X. El marcador de tamaño molecular empleado fue 100 bp DNA Ladder (Applied Biosystems Inc.). Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad).

6.12.2 Análisis de las secuencias del microsatélite *CSP*. Para este análisis se utilizó el programa GeneDoc ver. 2.7 (www.psc.edu/biomed/genedoc), el cual busca los repetidos en tándem y le asigna un color a cada repetido.[148] Posteriormente se analizó el tipo de *CSP* como sigue: en la secuencia del gen *CSP*, se localiza cada secuencia de repetición distinta y se le asigna un número arbitrario. Además, a cada combinación única de repeticiones *CSP* se le asigna un tipo *CSP*. Esto lleva al reconocimiento de diferentes tipos de *CSP*, cada uno con prevalencias muy diferentes. Además del análisis de la secuencia de DNA de la región de repetición, se examinan las variaciones de la secuencia de DNA río arriba y río abajo. Las variaciones en la secuencia de DNA se encuentran en las posiciones de codones - 1, - 14, - 15.[132-134]

7. RESULTADOS

De acuerdo con el primer objetivo que fue: "aislar hongos ambientales en diferentes áreas de dos hospitales, ubicados en el centro y norte de la Ciudad de México", se obtuvieron los siguientes resultados.

7.1 Cuantificación de UFC/m^3 en las instituciones 1 y 2. Se analizaron un total de 144 muestras del aire obtenidas en las dos instituciones. En ambas estaciones (lluviosa y seca), la abundancia de propágulos fúngicos en el aire fue similar y no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de hongos (UFC/m^3) ($p > 0.05$) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Unidades formadoras de colonias (UFC) en cada área de muestreo de las Instituciones 1 y 2

Hospital	Área de muestreo	Estación lluviosa UFC / m^3 ± DE	Estación seca UFC / m^3 ± DE
1	Hematología	85.98 ± 13.87	97.09 ± 8.55
1	Sala de cuidados intensivos adultos	43.51 ± 9.37	40.22 ± 10.03
1	Sala de cuidados intensivos de pediatría	41.24 ± 8.09	43.75 ± 6.99
2	Sala de consulta externa	56.30 ± 14.77	53.79 ± 10.24
2	Sala de recuperación	50.57 ± 13.99	53.59 ± 6.66
2	Quirófano	8.53 ± 2.06	8.95 ± 2.69

DE = Desviación estándar

En la Institución 1 la concentración más alta de propágulos en el aire (UFC/m^3) fue registrada como sigue en orden decreciente: hematología, sala de cuidados intensivos de pediatría y sala de cuidados intensivos de adultos. Las diferencias en las UFC/m^3 entre las tres áreas muestreadas en la institución 1 fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En la Institución 2, la más alta concentración de UFC/m^3 en el aire fue registrada como sigue en orden decreciente: sala de consulta externa, sala de recuperación y quirófano; también se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres áreas ($p < 0.05$) (Cuadro 5).

7.2 Identificación por macro y micromorfología de los hongos. En la Institución 1 los hongos identificados fueron: *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus* sección *Flavi*, *Aspergillus* sección *Fumigati*, *Aspergillus* sección *Nigri*, *Aspergillus* sección *Terrei, Cladophialophora bantiana*, *Cladosporium* sp., *Fusarium proliferatum, Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *R. stolonifer* y *Trichoderma* sp. (Figura 2). En la Institución 2, los hongos identificados fueron: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus* sección *Flavi*, *Aspergillus* sección *Fumigati*, *Aspergillus* sección *Nigri*, *Aspergillus* sección *Terrei*, *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *P. griseofulvum*, *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp. y *R. stolonifer* (Figura 3).

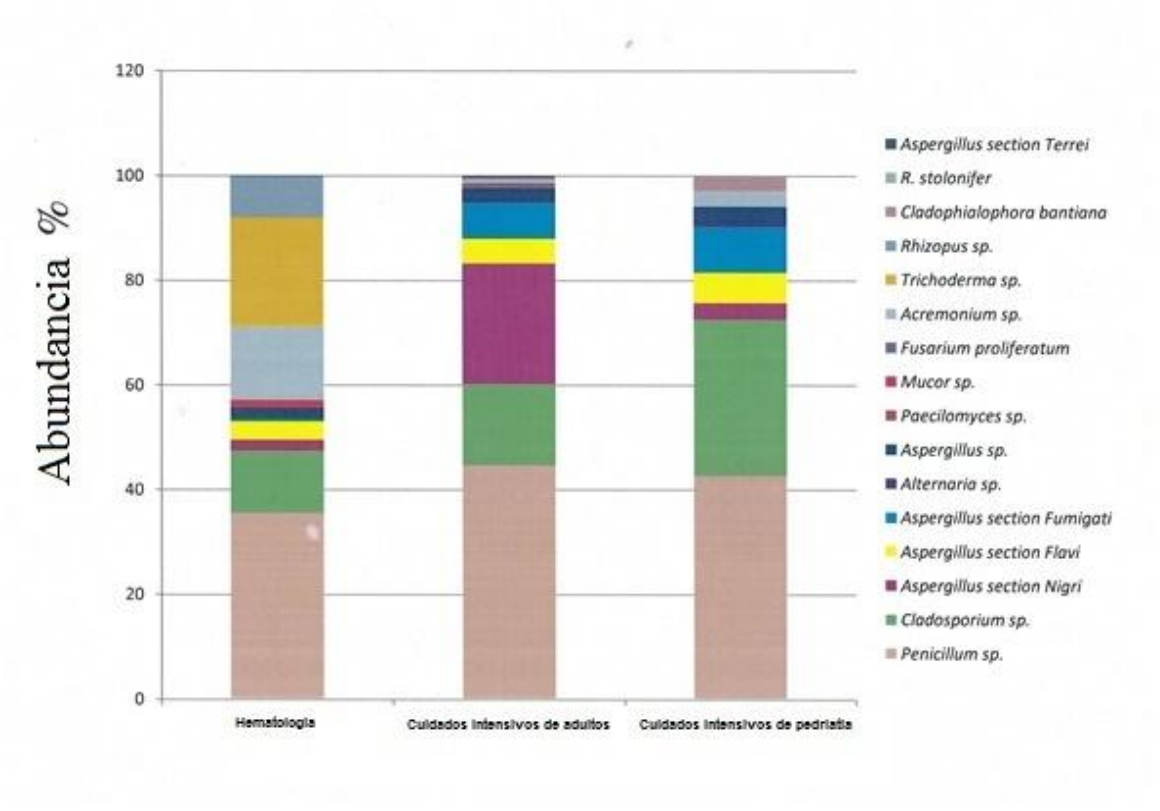

Figura 2. Riqueza y abundancia de hongos en áreas muestreadas en la Institución 1

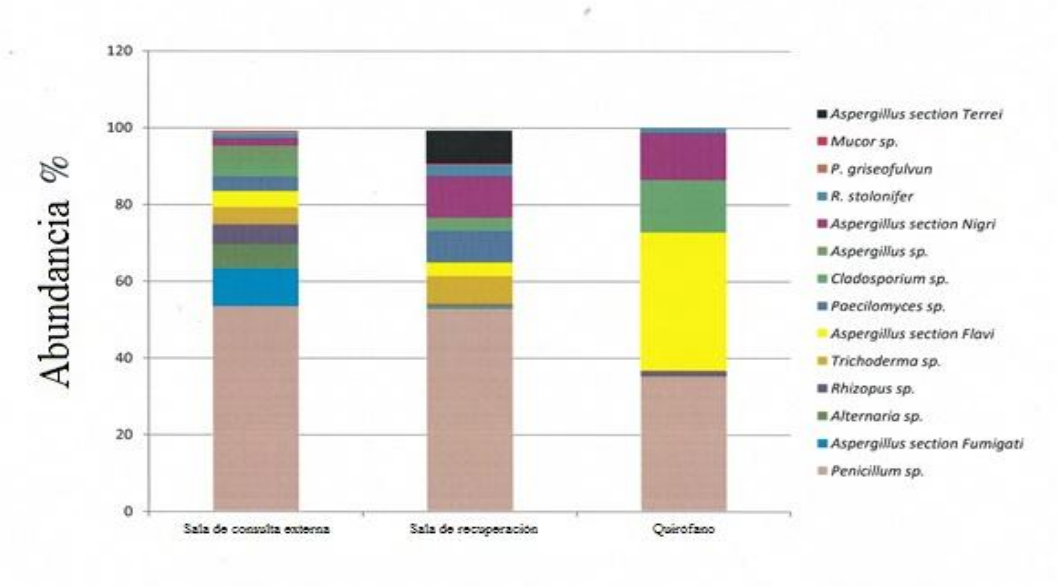

Figura 3. Riqueza y abundancia de hongos en áreas muestreadas en la Institución 2

7.3 Diversidad fúngica. La diversidad fúngica en la Institución 1 mostró una riqueza fúngica distribuida como sigue: 7 géneros y 6 especies estuvieron presentes en la unidad de cuidados intensivos de adultos, 6 géneros y 5 especies en la unidad de cuidados intensivos de pediatría y 7 géneros y 5 especies en la unidad de hematología. En la Institución 2 fue como sigue: 8 géneros y 6 especies identificados en la sala de consulta externa, 8 géneros y 5 especies en la sala de recuperación, y 4 géneros y 3 especies en quirófano (Figuras 2 y 3).

Los hongos más abundantes en cada área en la Institución 1 fueron: *A.* sección *Flavi*, *A.* sección *Fumigati*, *A.* sección *Nigri*, *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp. en la unidad de cuidados intensivos de pediatría; *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. y *Trichoderma* sp. en hematología; *A.* sección *Flavi, A.* sección *Fumigati, A.* sección *Nigri*, *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp. en la unidad de cuidados intensivos de adultos (Figura 2). Mientras, los hongos más abundantes en cada área de la Institución 2 fueron: *Alternaria* sp., *A.* sección *Flavi*, *A.* sección *Fumigati*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., y *Trichoderma* sp. en sala de consulta externa; *A.* sección *Nigri*, *A.* sección *Terrei*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. en la sala de recuperación; *A.* sección *Flavi*, *A.* sección *Nigri, Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp. en quirófano (Figura 3). Los valores de diversidad estimados tanto con el índice de Shannon-Wiener como con el de Simpson fueron más altos en la Institución 1 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Índices de diversidad de hongos en diferentes áreas muestreadas en las Instituciones 1 y 2

Institución	Área de muestreo	Índice de Simpson	Índice de Shannon-Wiener
1	Sala de cuidados intensivos adultos	0.7784	1.822
1	Hematología	0.7822	1.942
1	Sala de cuidados intensivos de pediatría	0.7915	1.879
2	Sala de consulta externa	0.6593	1.668
2	Sala de recuperación	0.6494	1.677
2	Quirófano	0.6172	1.204

De acuerdo con el segundo objetivo que fue: "identificar y caracterizar *Aspergillus* spp. por métodos fenotípicos (termotolerancia, tamaño de conidios y vesículas) y moleculares (genes *BenA* y *ActA*), se obtuvieron los siguientes resultados.

Dentro de la diversidad fúngica se identificaron por macro y micromorfología 97 aislados de Aspergillus spp. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Aislados ambientales de *Aspergillus* spp.

Aislado	**Institución 1**	**Institución 2**	**Total**
Aspergillus sección *Fumigati*	18	11	29
Aspergillus sección *Terri*	3	2	5
Aspergillus sección *Nigri*	21	21	42
Aspergillus sección *Flavi*	7	10	17
Aspergillus spp.	1	3	4
Total	**50**	**47**	**97**

7.4 Caracterización fenotípica de los aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus*

7.4.1 Termotolerancia. Todos los aislados del género *Aspergillus* obtenidos en ambas instituciones crecieron a 28 °C, mientras a 50 °C sólo crecieron los aislados identificados como *Aspergillus* sección *Fumigati*, y de acuerdo a esto se presentan sus tasas de crecimiento (TC) (Cuadro 8), mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 8. Tasa de crecimiento de las secciones de *Aspergillus*

Institución	Sección	Tasa de crecimiento (mm/día) ± DE	
		28°C	50°C
1	*Fumigati*	16.95 ± 1.63	6.53 + 5.13
1	*Nigri*	22.95 ± 1.92	NC
1	*Flavi*	17.07 ± 1.19	NC
1	*Terrei*	8.54 ± 0.35	NC
2	*Fumigati*	17.94 + 2.16	12.61 + 7.13
2	*Nigri*	23.04 ± 1.39	NC
2	*Flavi*	18.34 ± 2.72	NC
2	*Terrei*	9.38 ± 0.26	NC

DE = Desviación estándar; NC = No creció

7.4.2 Tamaño de conidios. Todos los aislados del género *Aspergillus* obtenidos en ambas instituciones presentaron diferencias en sus diámetros de conidios de acuerdo a cada sección (Cuadro 9).

7.4.3 Tamaño de vesículas. Todos los aislados del género *Aspergillus* obtenidos en ambas instituciones presentaron diferencias en sus diámetros de conidios de

acuerdo a cada sección (Cuadro 9). Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas en el tamaño de las vesículas entre los aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las vesículas de los aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* entre las dos Instituciones ($p > 0.05$).

Cuadro 9. Diámetro de conidos y vesículas de las secciones de *Aspergillus*

Institución	Sección	Diámetro conidios (µm)	Diámetro vesículas (µm)
1	*Fumigati*	1.24 – 4.50	15.64 – 23.84
1	*Nigri*	2.29 – 4.43	24.36 – 64.36
1	*Flavi*	3.02 – 4.98	27.95 – 42.56
1	*Terrei*	1.13 – 2.13	15.64 – 32.56
2	*Fumigati*	1.58 – 3.27	14.87 – 23.59
2	*Nigri*	2.20 – 4.23	30.77 – 59.99
2	*Flavi*	2.78 – 5.05	22.56 – 50.51
2	*Terrei*	2.20 – 2.90	23.84 – 26.15

7.5 Caracterizacion genotípica de los aislados de las secciones de *Aspergillus*

7.5.1 Extracción de DNA. De acuerdo con el análisis espectrofotométrico y electroforético, la cantidad e integridad de los DNAs obtenidos de los aislados ambientales de las secciones de *Aspergillus* fue adecuada para los ensayos de PCR. Las lecturas realizadas en espectrofotómetro mostraron concentraciones entre 9.8 y 365 ng/µL, con una pureza adecuada, según los valores de la relación 260/280 nm (1.7-1.9); además, en la electroforesis se observó una sola banda

(Figura 4), lo que corroboró una buena calidad de los DNAs. Asimismo, las concentraciones de DNA determinadas por comparación con diferentes concentraciones del fago λ concordaron con las determinadas por espectrofotometría. Los DNAs obtenidos de cada uno de los aislados de *Aspergillus* spp. se ajustaron a una concentración final de 10 ng/µL (Figura 4).

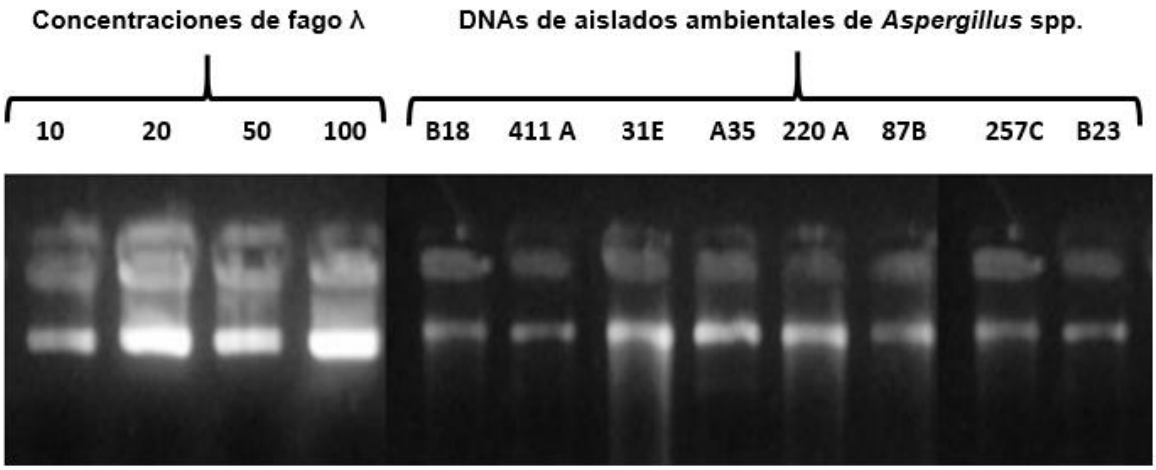

Figura 4. Cuantificación de DNA de aislados ambientales de *Aspergillus*. Las concentraciones de DNA fueron ajustadas a 10 ng/µL. La cuantificación se llevó a cabo por comparación con diferentes concentraciones de DNA del fago λ (10, 20, 50, y 100 ng/µL). La electroforesis se realizó a 90 V en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed.

7.5.2 Amplificación de la secuencia parcial del gen *ActA* con los aislados de las secciones de *Aspergillus*. Para la amplificación de la secuencia parcial del gene *ActA* se estandarizaron las condiciones de reacción mediante la realización de curvas de concentración de DNA, dNTPs, $MgCl_2$, oligonucleótidos y se probaron diferentes temperaturas de alineamiento.

Curva de DNA. La estandarización para la amplificación de la secuencia parcial del gen *ActA* se inició con una curva de DNA, en donde se probaron las concentraciones 5, 10, 15, 20, 25, 30 ng/µL de DNA. Como se observa en la figura

5, la amplificación del fragmento de 300 bp se observó con las seis concentraciones de DNA; sin embargo, con 10 ng/µL el amplicón se visualizó muy bien, por lo que se seleccionó esta concentración para continuar los ensayos de estandarización de la PCR.

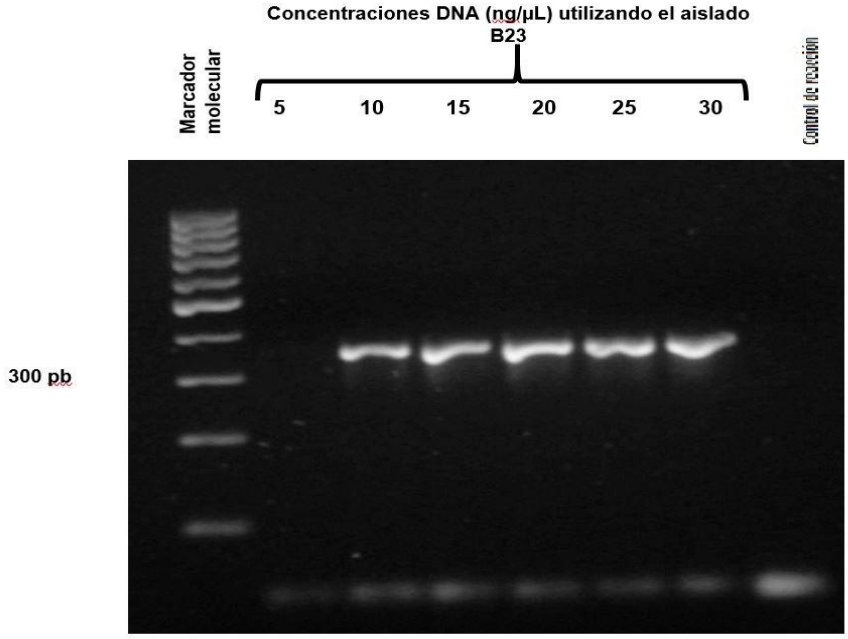

Figura 5. Curva de DNA para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *ActA* del aislado ambiental B23 utilizando concentraciones de 5, 10 15, 20 25 y 30 ng/µL de DNA. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Curva de $MgCl_2$. Se realizó la amplificación con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5 mM). La amplificación del fragmento de 300 bp se observó sólo con 1.0, 2.0 y 2.5 mM de $MgCl_2$ (Figura 6), de las cuales la concentración óptima de $MgCl_2$ fue 1.0 mM.

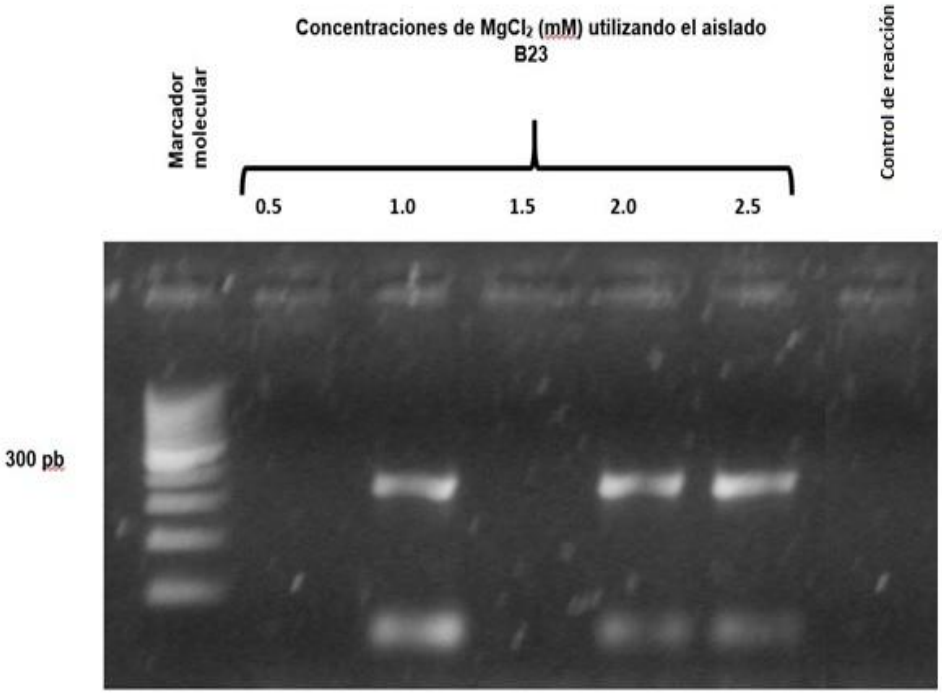

Figura 6. Curva de $MgCl_2$. Se utilizaron diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM). En gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Temperatura de alineamiento. Se probaron temperaturas de alineamiento que fueron de 55°, 56°, 57° y 58 °C. La amplificación se observó en algunas de ellas (Figura 7); sin embargo, las bandas mejor definidas se obtuvieron con la temperatura de 58 °C, por lo que la amplificación de todos los aislados se realizó a esta temperatura.

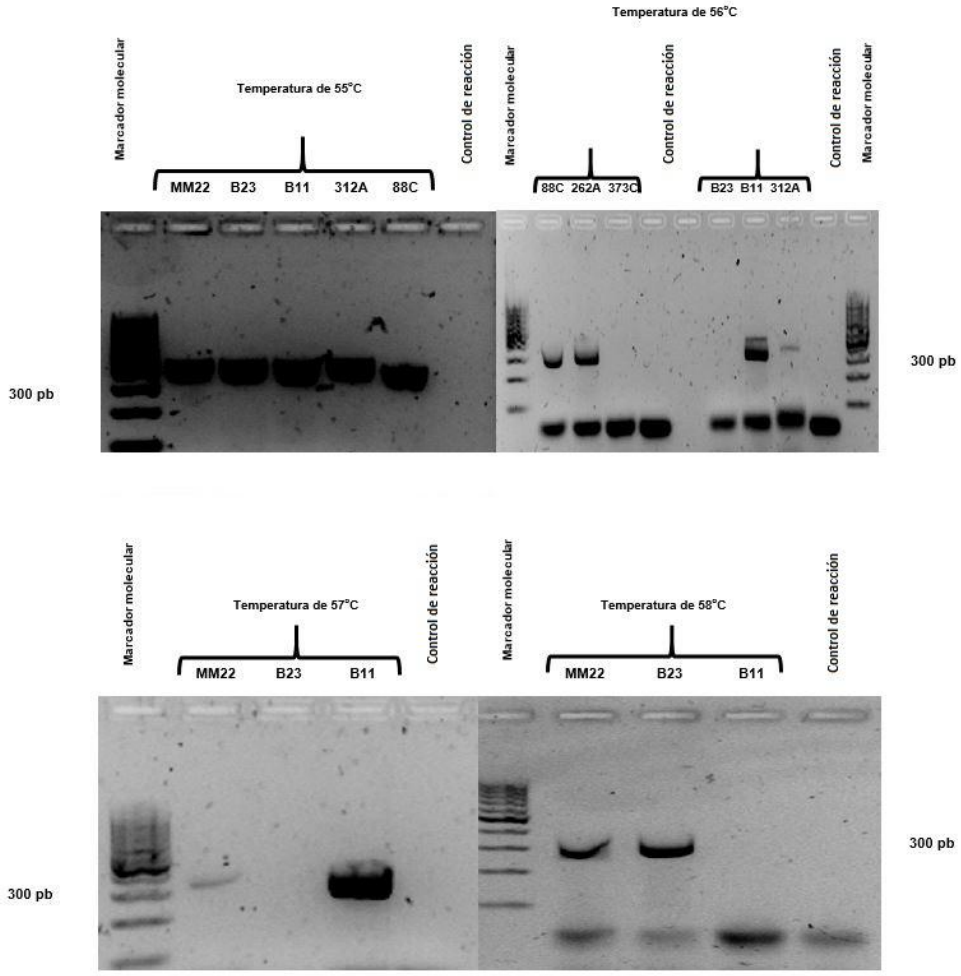

Figura 7. Curva de temperatura de alineamiento para la estandarización de la PCR de la secuencia parcial del gen *ActA* con las temperaturas de 55 °C, 56 °C, 57 °C y 58 °C. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Con base en los resultados de la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *ActA,* las condiciones óptimas fueron: DNA 10 ng/µL, amortiguador 1X, dNTPs 200 µM, $MgCl_2$ 1.0 mM, 10 pmol de cada oligonucleótido, *Taq* polimerasa 1 U/µL, el volumen final de cada reacción fue de 25 µL y la temperatura de alineamiento de 58 ºC. Con estas condiciones se amplificó el gen en todos los DNAs de los aislados ambientales de las secciones de *Aspergillus* (Figura 8).

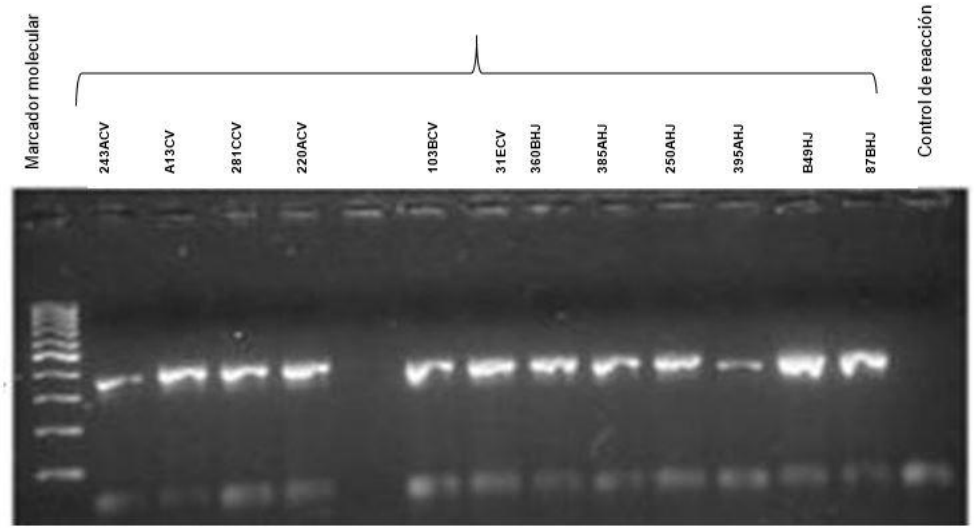

Figura 8. Amplificación del gen *ActA* a partir de DNA´s de los aislados fúngicos de las diferentes secciones de *Aspergillus*. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

7.5.3 Amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* con los aislados de las secciones de *Aspergillus*

Curva de DNA. La estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* se inició con una curva de DNA, en donde se probaron las concentraciones de 1, 5, 10 y 20 ng/µL de DNA. En la figura 9 se observa la amplificación del fragmento de 420 bp con las cuatro concentraciones de DNA probadas; sin embargo, con 10 ng/µL el amplicón fue más definido. Esta curva se realizó con dos muestras de DNAs, de los aislados B11 y B23, obteniendo los mismos resultados. Se seleccionaron 10 ng/µL para continuar los ensayos de estandarización de la PCR.

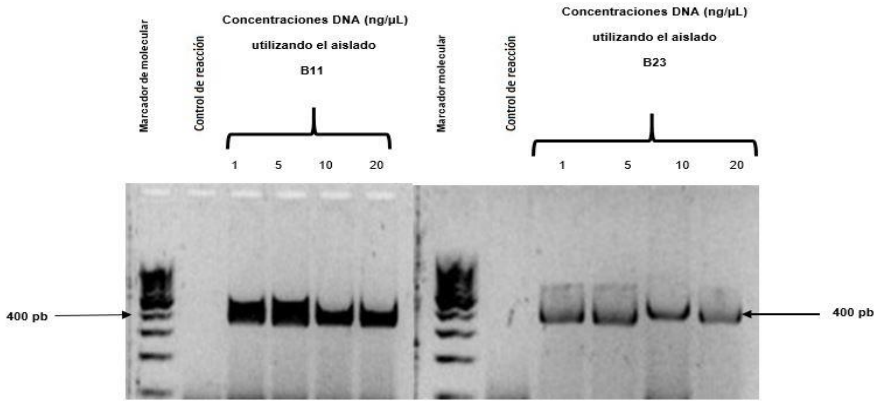

Figura 9. Curva de DNA para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* de los aislados ambientales B11 y B23 utilizando concentraciones de 1, 5, 10 y 20 ng/µL de DNA. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Curva de dNTPs. La curva se realizó con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 µM de dNTPs. La amplificación esperada se observó con las cuatro concentraciones probadas (Figura 10); sin embargo, se eligió la concentración de 200 µM, reportada por Glass y Donaldson,[142] para continuar los ensayos de estandarización de la PCR.

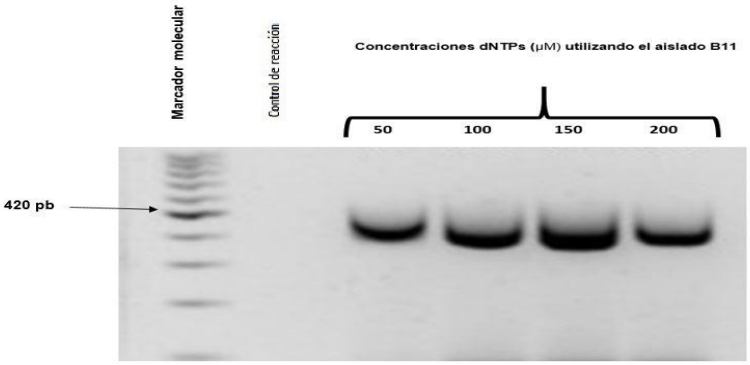

Figura 10. Curva de dNTPs para estandarización de la PCR de la secuencia parcial del gen *BenA* utilizando el aislado B11. Se utilizaron las concentraciones de 50, 100, 150 y 200 µM. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Curva de $MgCl_2$. Se realizó la amplificación con una curva de $MgCl_2$, en donde se probaron concentraciones de 1, 1.5, 1.7 y 2 mM. La amplificación del fragmento de 420 pb se observó solo con 1, 1.5 y 1.7 mM de $MgCl_2$ (Figura 11), de las cuales se eligió la concentración de 1.5 mM para continuar los ensayos de estandarización de la PCR, ya que la banda se visualizó mejor.

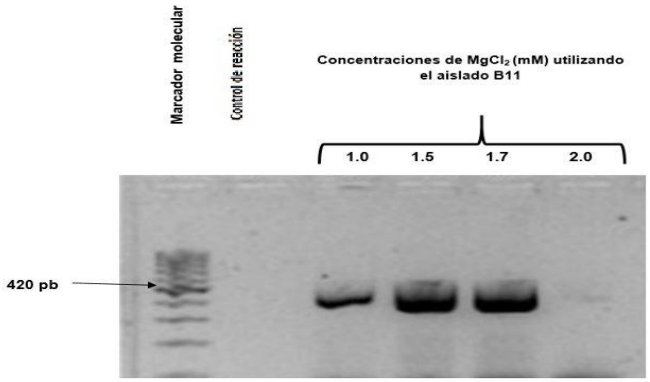

Figura 11. Curva de $MgCl_2$ para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA.* Se amplificó el aislado B11, con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1, 1.5, 1.7 y 2.0 mM). Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Curva de oligonucleótidos. La curva de oligonucleótidos para la amplificación del gen *BenA* por PCR se realizó con las concentraciones de 10, 30, 50, 100 y 200 pmol/µL. La amplificación del fragmento se observó con todas las concentraciones probadas (Figura 12); sin embargo, la banda se visualizó mejor con 30 pmol/µL, por lo que se seleccionó esta concentración para continuar los ensayos de estandarización de la PCR.

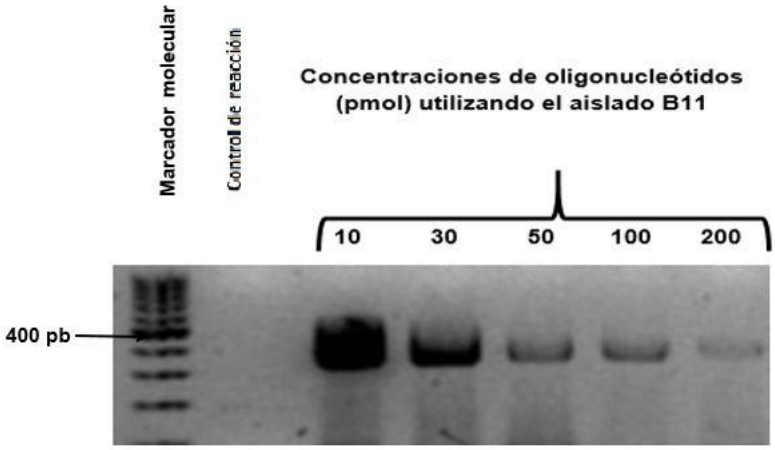

Figura 12. Curva de oligonucleótidos para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA*, utilizando las concentraciones de 10, 30, 50, 100 y 200 pmol. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Temperatura de alineamiento. Se probaron temperaturas de alineamiento de 56°, 57°, 58° y 59 °C; la amplificación se observó con todas ellas (Figura 13); sin embargo, las bandas con mejor definición se visualizaron a 58 °C, por lo que la amplificación de todos los aislados se realizó a esta temperatura.

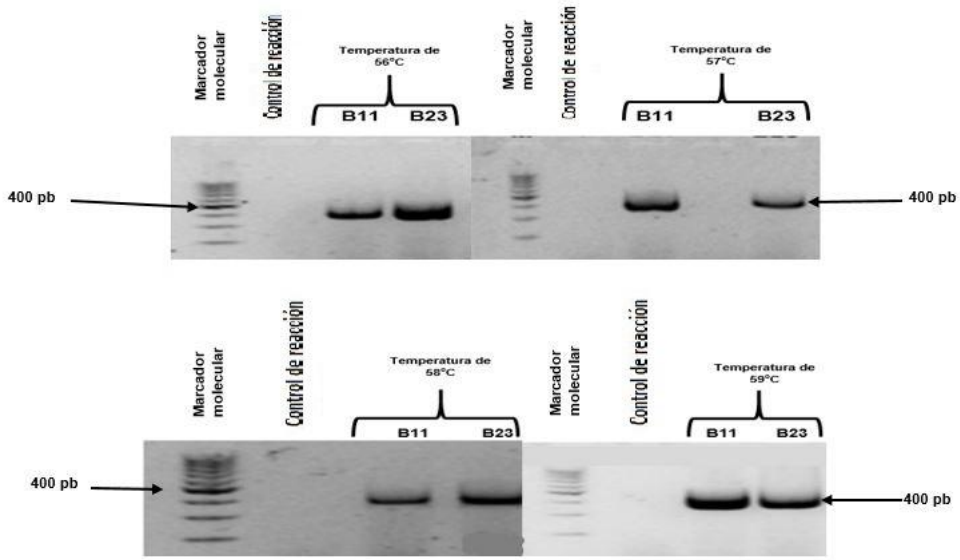

Figura 13. Curva de temperatura de alineamiento para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* con las temperaturas de 56 °C, 57 °C, 58 °C y 59 °C. Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Con base en los resultados de la estandarización de las condiciones para la amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA,* las condiciones óptimas fueron: DNA 10 ng/µL, amortiguador 1X, dNTPs 200 µM, $MgCl_2$ 1.5 mM, oligonucleótidos 30 pmol, *Taq* polimerasa 1 U/µL, el volumen final de cada reacción fue de 25 µL y una temperatura de alineamiento de 58 °C.

Con estas condiciones se amplificó la secuencia parcial del gen en todos los DNAs de los aislados ambientales de *Aspergillus* spp. (Figura 14).

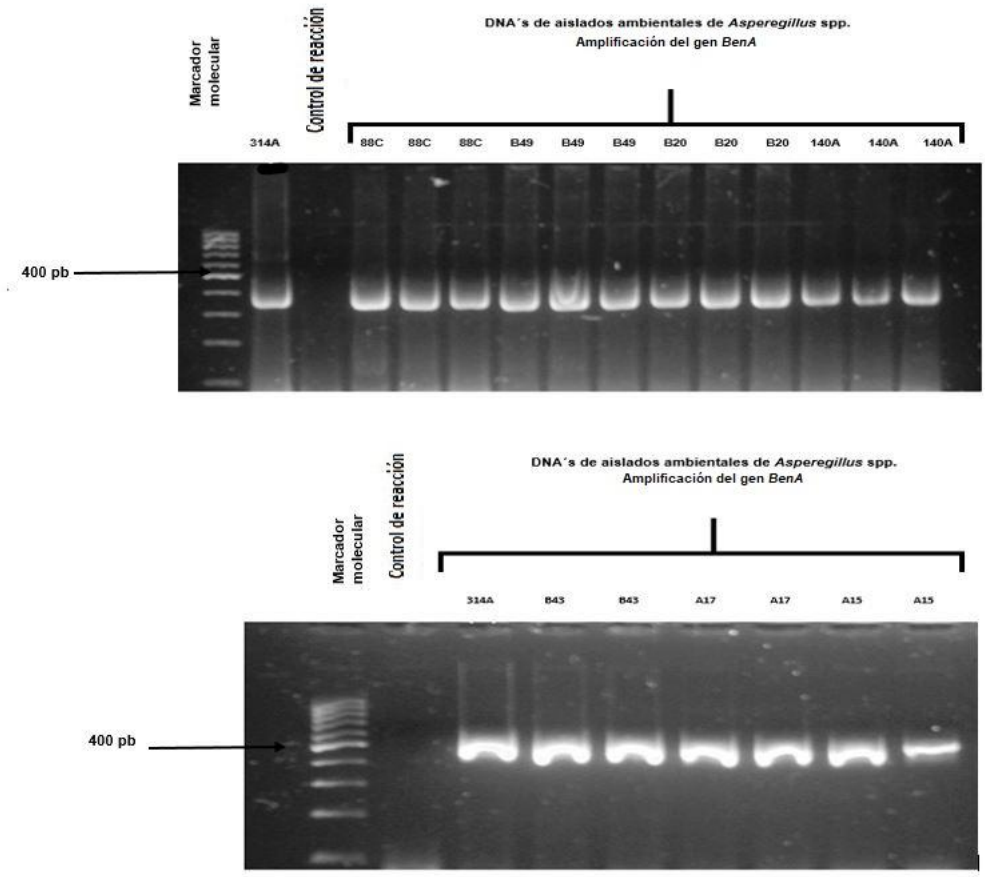

Figura 14. Amplificación del gen *BenA* de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus.* Se utilizó gel de agarosa al 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

7.5.4 Análisis de las secuencias de los genes *ActA* y *BenA*. Con las secuencias obtenidas, una vez editadas y alineadas se eligió el mejor modelo evolutivo. Para el caso de Máxima Verosimilitud se consideró el valor de información de AKAIKE (AIC), y para la Inferencia Bayesina se consideró el criterio de información Bayesiana (BIC). El mejor modelo evolutivo para las secuencias de los dos genes fue GTR+G+I. Al usar un método de reconstrucciòn con base en un modelo de evolución como es MV e IB se requiere seleccionar el modelo que mejor se ajuste a la matriz de datos a analizar. Se eligio modelo GTR (Modelo General de Tiempo Reversible) que de acuerdo al sofwore Jmodeltest considera la frecuencia de bases, la tasa de sustituciòn y la distribuciòn gamma como los parámetros que mejor se ajustan a los datos analizados.

7.5.5 Construcción filogenética de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* con el gen de la *ActA* por métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana

El conjunto de datos que se obtuvo con el alineamiento de las secuencias amplificadas del gen de la *ActA,* incluyó 398 caracteres, de los cuales 133 sitios fueron conservados, 232 variables y 198 de información parsimosiosa, con 279 de cobertura.

Con el propósito de llevar a cabo la ubicación filogenética de los aislados estudiados se utilizaron secuencias tipo de especies de las diferentes secciones de *Aspergillus*, las que se obtuvieron del Gen Bank. (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)

Máxima verosimilitud con el gen *ActA.* Con el propósito de determinar la posición filogenética de los aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* se construyó un árbol con Máxima Verosimilitud utilizando como grupo externo *A. clavatus* con número de acceso AB489853.1 (Figura 15). Este árbol formó cuatro grupos; el grupo I incluyó 6 secuencias de referencia de la sección *Fumigati* (*A. fumisynnematus* número de acceso AB894615.1, *A. unilateralis* número de acceso HE974402.1, *A. lentulus* número de acceso *AB894620.1*, *A. brevipes* número de acceso DQ094848.1, *A. novofumigatus* número de acceso DQ094868.1 y *A. fumigatiaffinis* número de acceso DQ094865.1) con un bootstrap de 83%; el grupo II incluyó los aislados identificados previamente dentro de la sección *Fumigati*, los cuales se agruparon con la secuencia de referencia de *A. fumigatus* número de acceso DQ534108.1, con un bootstrap de 99%; el grupo III incluyó aislados identificados previamente dentro de la sección *Nigri* y formó 3 subgrupos, donde el subgrupo IIIa se formó con 1 aislado con un bootstrap de 100%, el IIIb incluyó 14 aislados que se asociaron con la secuencia de referencia de *A. niger* con número de acceso de AY704271.1, con un bootstrap de 97% y el subgrupo IIIc incluyó 23 aislados, con un bootstrap de 97%. Finalmente, el grupo IV se formó con dos subgrupos, el IVa incluyó 1 aislado con un bootstrap de 100% y el IVb incluyó 14 aislados identificados previamente dentro de la Sección *Flavi* con un bootstrap de 93% (Cuadro 10). El soporte de todos los grupos, calculado por la Máxima Verosimilitud y bootstrap estuvo en un intervalo de 70-100%.

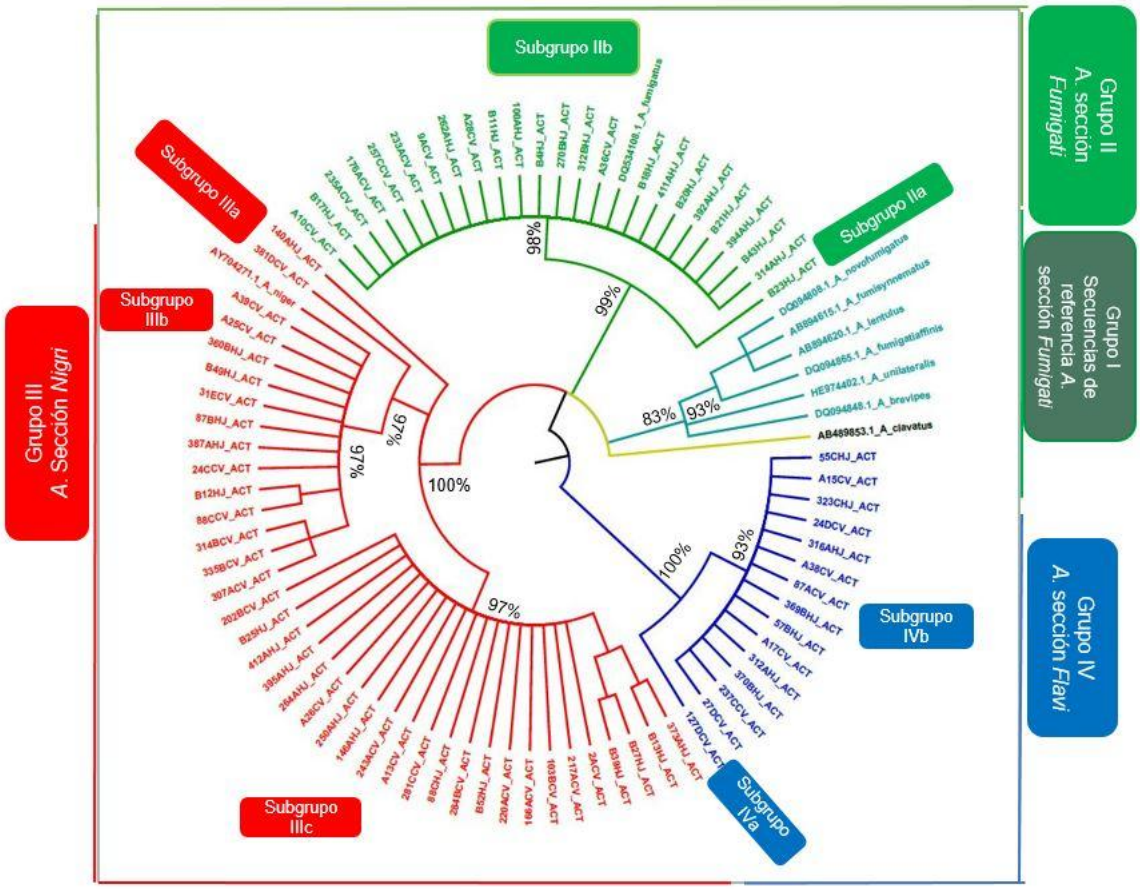

Figura 15. Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud,con las secuencias parciales del gen *ActA* amplificadas del DNA de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* de ambientes intrahospitalarios. Se utilizó el programa MEGA7.

Cuadro 10. Grupos y subgrupos de árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud, a partir de secuencias del gen *ActA*

GRUPO	AISLADO	SECCIÓN
I	*A. fumisynnematus* AB894615.1	*Fumigati*
Sec. de referencia	*A. unilateralis* HE974492.1	
	A. lentulus AB894620.1	
	A. brevipes DQ094848.1	
	A. novofumigatus DQ094808.1	
	A. fumigatiaffinis DQ094865.1	
II		
Subgrupo IIa	B23HJ	*Fumigati*
Subgrupo IIb	314AHJ, B23HJ, 394AHJ, B21HJ, 392AHJ, B20HJ, 411AHJ, B18HJ, A36CV, 312BHJ, 270BHJ, B4HJ, 100AHJ, B11HJ, A28CV, 262AHJ, 9ACV, 233ACV, 257CCV, 176ACV, 235ACV, B17HJ, A10CV,	
	A. fumigatus DQ534108.1	
III		*Nigri*
Subgrupo IIIa	140AHJ, 381DCV,	
Subgrupo IIIb	A39CV, A25CV, 360BHJ, B49HJ, 31ECV, 87BHJ, 387AHJ, 24CCV, B12HJ, 88CCV, 314BCV, 335BCV, 307ACV,	
Subgrupo IIIc	202BCV, B25HJ, 412AHJ, 395AHJ, 264AHJ, A26CV, 250AHJ, 146AHJ, 243ACV, A13CV, 281CCV, 88CHJ 264BCV, B52HJ, 220ACV, 166ACV, 103BCV, 217ACV, 2ACV, B39HJ, B27HJ, B13HJ, 373AHJ,	
	A. niger AY704271.1	
IV		*Flavi*
Subgrupo IVa	127DCV	
Subgrupo IVb	27DCV, 237CCV, 370BHJ, 312AHJ, A17CV, 57BHJ, 369BHJ, 87ACV, A38CV, 316AHJ, 24DCV, 323CHJ, A15CV, 55CHJ	
Grupo Externo	*A. clavatus* AB 489853.1	

Inferencia Bayesiana con el gen *ActA*. Con el propósito de determinar la posición filogenética de los aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus,* así como de compararlo con el método filogenético de Máxima Verosimilitud, se construyó un árbol con el método de Inferencia Bayesiana, utilizando como grupo externo *A. clavatus* con número de acceso AB489853.1 (Figura 16). Este árbol formó tres grupos; el grupo I incluyó 15 aislados identificados previamente dentro de la Sección *Flavi*, con una probabilidad posterior de 1.0; el grupo II incluyó 6 secuencias de referencia de la sección *Fumigati* (*A. fumisynnematus* número de acceso AB894615.1, *A. unilateralis* número de acceso HE974402.1, *A. lentulus* número de acceso *AB894620.1*, *A. brevipes* número de acceso DQ094848.1, *A. novofumigatus* número de acceso DQ094868.1 y *A. fumigatiaffinis* número de acceso DQ094865.1) y los aislados identificados previamente dentro de la sección *Fumigati*, los cuales se agruparon con la secuencia de referencia de *A. fumigatus* número de acceso DQ534108.1, con una probabilidad posterior de 0.97; el grupo III incluyó aislados identificados previamente dentro de la sección *Nigri* y formó 3 subgrupos, donde el IIIa se formó con 1 aislado con una probabilidad posterior de 1.0, el IIIb incluyó 13 aislados que se asociaron con la secuencia de referencia de *A. niger* con número de acceso de AY704271.1, con una probabilidad posterior de 1.0 y el subgrupo IIIc incluyó 24 aislados, con una probabilidad posterior de 0.89 (Cuadro 11). El soporte de todos los grupos se dio por la Inferencia Bayesiana y probabilidad posterior (con un intervalo de 0.7-1.0).

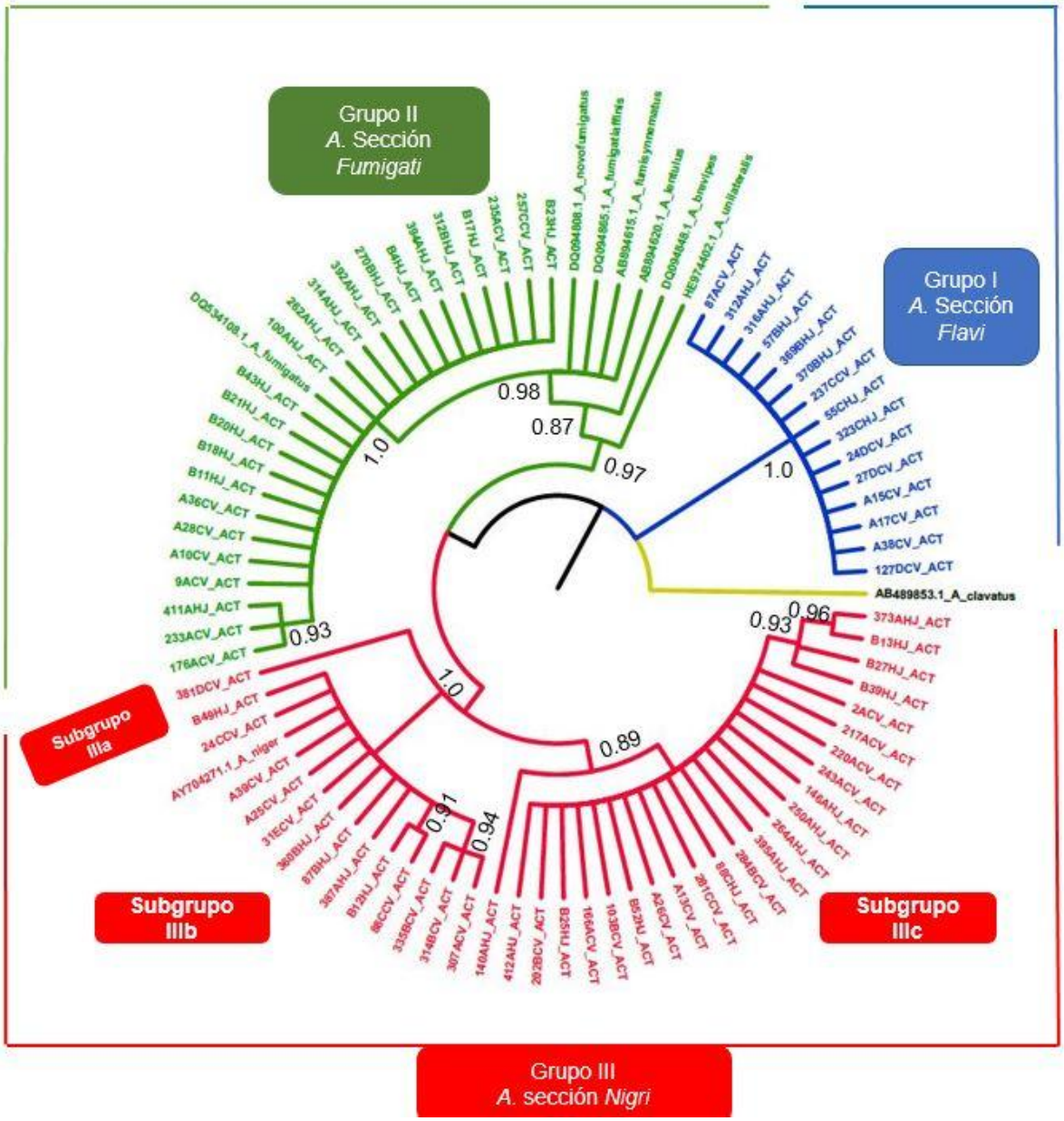

Figura 16. Árbol filogenético construido por el método de Inferencia Bayesiana, con las secuencias parciales del gen *ActA* amplificadas del DNA de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* de ambientes intrahospitalarios. Se utilizó el programa MrBayes 3.2.2.

Cuadro 11. Grupos y subgrupos de árbol filogenético por el método de Inferencia Bayesiana, a partir de secuencias del gen *ActA*

GRUPO	AISLADO	SECCIÓN
I	127DCV, 27DCV, 237CCV, 370BHJ, 312AHJ, A17CV, 57BHJ, 369BHJ, 87ACV, A38CV, 316AHJ, 24DCV, 323CHJ, A15CV, 55CHJ	*Flavi*
II	*A. unilateralis* HE974492.1 *A. lentulus* AB894620.1 *A. brevipes* DQ094848.1 *A. novofumigatus* DQ094808.1 *A. fumigatiaffinis* DQ094865.1 *A. fumisynnematus* AB894615.1 B23HJ, 314AHJ, B23HJ, 394AHJ, B21HJ, 392AHJ, B20HJ, 411AHJ, B18HJ, A36CV, 312BHJ, 270BHJ, B4HJ,100AHJ, B11HJ, A28CV, 262AHJ, 9ACV, 233ACV, 257CCV, 176ACV, 235ACV, B17HJ, A10CV, *A. fumigatus* DQ534108.1	*Fumigati*
III		*Nigri*
Subgrupo IIIa	381DCV,	
Subgrupo IIIb	B49HJ, 24CCV, A39CV, A25CV, 31ECV, 360BHJ, 87BHJ, 387AHJ B12HJ, 88CCV, 335BCV, 314BCV 307ACV	
Subgrupo IIIc	140AHJ, 202BCV, B25HJ, 412AHJ, 395AHJ, 264AHJ, A26CV, 250AHJ, 146AHJ, 243ACV, A13CV, 281CCV, 88CHJ, 264BCV, B52HJ, 220ACV, 166ACV, 103BCV, 217ACV, 2ACV, B39HJ, B27HJ, B13HJ, 373AHJ, *A. niger* AY704271.1	
Grupo Externo	*A. clavatus* AB 489853.1	

7.5.6 Construcción filogenética de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* con el gen *BenA* por métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

El conjunto de datos que se obtuvo con el alineamiento de las secuencias amplificadas del gen *BenA,* incluyó 584 caracteres, de los cuales 210 sitios fueron conservados, 349 variables y 263 de información parsimosiosa, con 357 de cobertura.

Máxima verosimilitud con el gen *BenA*. Con el propósito de determinar la posición filogenética de los aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* se construyó un árbol con Máxima Verosimilitud utilizando como grupo externo *A. clavatus* con número de acceso EF669802.1 (Figura 17). Este árbol formó cuatro grupos; el grupo I incluyó a los aislados identificados previamente dentro de la sección *Fumigati*, y formó dos subgrupos, el subgrupo Ia incluyó 1 aislado, el subgrupo Ib incluyó 23 aislados que se agruparon con la secuencia de referencia de *A. fumigatus* con número de acceso EF669791.1, con un bootstrap de 97%. El grupo II lo integraron los aislados identificados previamente dentro de la sección *Nigri*, y formó dos sugrupos, el IIa integrado por 14 aislados que se asociaron con la secuencia de referencia de *A. niger* con número de acceso EF661089.1 con un bootstrap del 100%, el IIb incluyó 24 aislados que se asociaron con las secuencias de referencia de *A. tubingensis* con números de acceso EF661086.1 y LC168474.1 con un bootstrap del 98%. El grupo III incluyó 1 aislado identificado previamente dentro de la sección *Flavi*, sin embargo, el análisis filogenético lo asoció con la

secuencia de referencia de *A. westerdijkiae* (sección *Circundati*) número de acceso EF661329.1 con un bootstrap del 100%. El grupo IV incluyó a los aislados identificados previamente dentro de la sección *Flavi* los cuales se agruparon con la secuencia de referencia de *A. flavus* con número de acceso EF661485.1 con un bootstrap de 99% (Cuadro 12). El soporte de todos los grupos se dio por la Máxima Verosimilitud y bootstrap (con un intervalo de 70-100%).

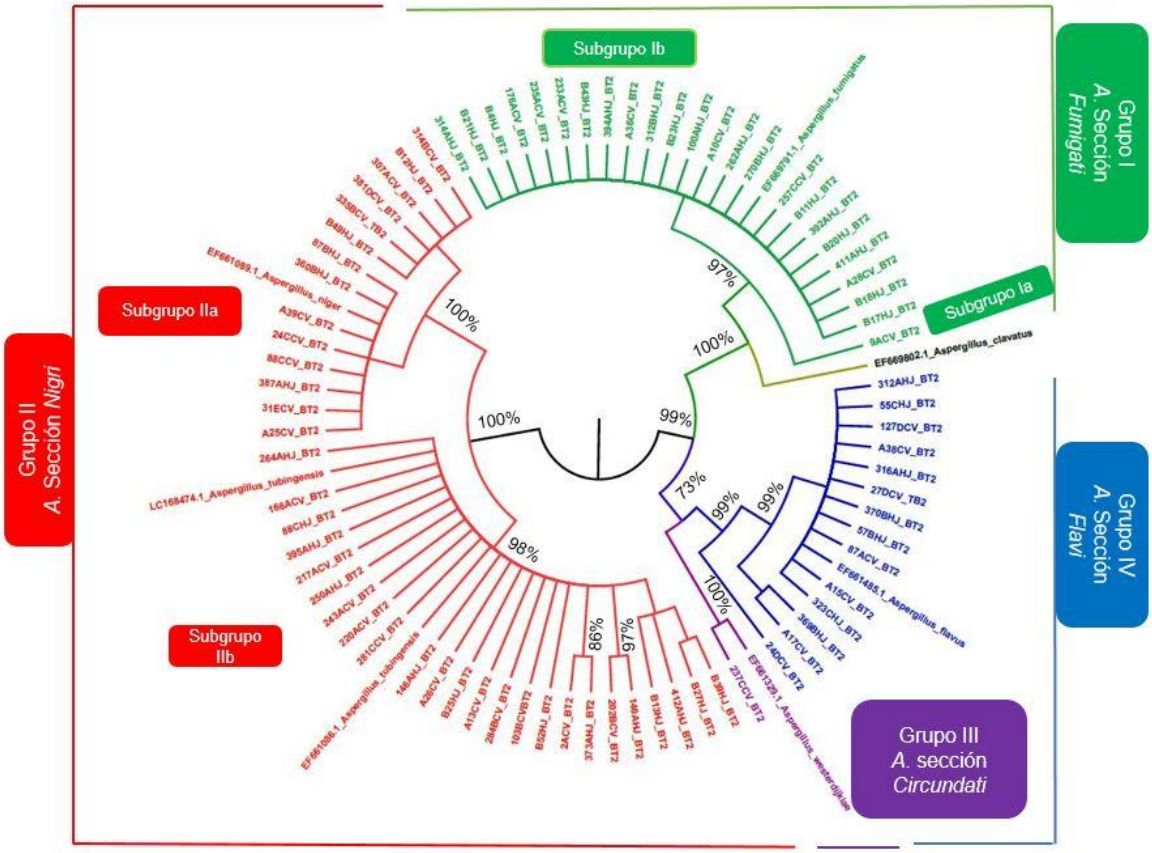

Figura 17. Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud, con las secuencias parciales del gen *BenA* amplificado del DNA de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* de ambientes intrahospitalarios. Se utilizó el programa MEGA7.

Cuadro 12. Grupos y subgrupos de árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud, a partir de secuencias del gen *BenA*

GRUPO	AISLADO	SECCIÓN
I		*Fumigati*
Subgrupo Ia	9ACV	
Subgrupo Ib	314AHJ, B23HJ, 394AHJ, B21HJ, 392AHJ, B20HJ, 411AHJ, B18HJ, A36CV, 312BHJ, 270BHJ, B4HJ, 100AHJ, B11HJ, A28CV, 262AHJ, 233ACV, 257CCV, 176ACV, 235ACV, B17HJ, A10CV, B23HJ *A. fumigatus* EF669791.1	
II		*Nigri*
Subgrupo IIa	A39CV, A25CV, 360BHJ, B49HJ, 31ECV, 87BHJ, 387AHJ, 24CCV, B12HJ, 88CCV, 314BCV, 335BCV, 307ACV, 381DCV, A. niger EF661089.1	
Subgrupo IIb	202BCV, B25HJ, 412AHJ, 395AHJ, 264AHJ, A26CV, 250AHJ, 146AHJ, 243ACV, A13CV, 281CCV, 88CHJ 264BCV, B52HJ, 220ACV, 166ACV, 103BCV, 217ACV, 2ACV, B39HJ, B27HJ, B13HJ, 373AHJ, 140AHJ *A. tubingensis* LC168474.1, *A. tubingensis* EF661086.1	
III	237CCV, *A. westerdijkiae*	*Circundati*
IV	127DCV, 27DCV, 370BHJ, 312AHJ, A17CV, 57BHJ, 369BHJ, 87ACV, A38CV, 316AHJ, 24DCV, 323CHJ, A15CV, 55CHJ, *A. flavus* EF661485.1	*Flavi*
Grupo Externo	*A. clavatus* EF669802.1	

Inferencia Bayesiana con el gen *BenA*. Con el propósito de determinar la posición filogenética de los aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus,* así como de compararlo con el método filogenético de Máxima Verosimilitud, se construyó un árbol con el método de Inferencia Bayesiana utilizando como grupo externo *A. clavatus* con número de acceso AB489853.1 (Figura 18). Este árbol formó cuatro grupos; el grupo I incluyó los 24 aislados identificados previamente dentro de la sección *Fumigati*, que se agruparon con la secuencia de referencia de *A. fumigatus* con número de acceso EF669791.1, con una probabilidad posterior de 1.0. El grupo II incluyó 1 aislado identificado previamente dentro de la sección *Flavi*, sin embargo, el análisis filogenético lo asoció con la secuencia de referencia de *A. westerdijkiae* (*A.* sección *Circundati*) número de acceso EF661329.1 con una probabilidad posterior de 1.0. El grupo III incluyó a los aislados identificados previamente dentro de la sección *Flavi* los cuales se agruparon con la secuencia de referencia de *A. flavus* con número de acceso EF661485.1 con una probabilidad posterior de 1.0. El grupo IV lo integraron los aislados identificados previamente dentro de la sección *Nigri,* con una probabilidad posterior de 1.0, y formó dos sugrupos, el IVa integrado por 14 aislados que se asociaron con la secuencia de referencia de *A. niger* con número de acceso EF661089.1 con una probabilidad posterior de 1.0, el IVb incluyó 24 aislados que se asociaron con las secuencias de referencia de *A. tubingensis* con números de acceso EF661086.1 y LC168474.1 con una probabilidad posterior de 0.84 (Cuadro 13). El soporte de todos los grupos se dio por la Inferencia Bayesiana y la probabilidad posterior (con un intervalo de 0.7-1.0).

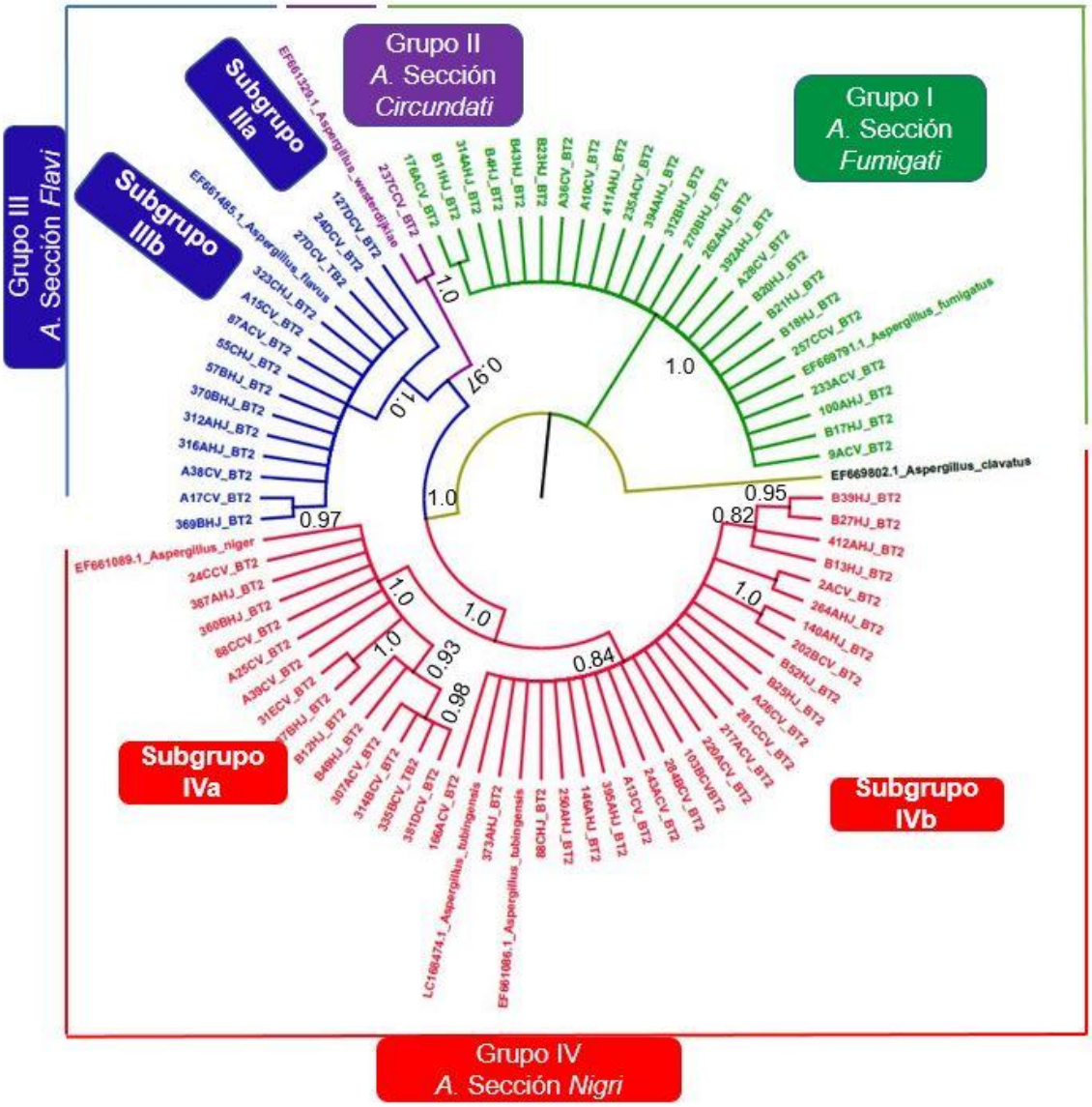

Figura 18. Árbol filogenético construido por el método de Inferencia Bayesiana con las secuencias parciales del gen *BenA* amplificadas del DNA de aislados de las diferentes secciones de *Aspergillus* de ambientes intrahospitalarios. Se utilizó el programa MrBayes 3.2.2.

Cuadro 13. Grupos y subgrupos de árbol filogenético por el método de Inferencia Bayesiana, a partir de secuencias del gen *BenA*

GRUPO	AISLADO	SECCIÓN
I	9ACV, 314AHJ, B23HJ, 394AHJ, B21HJ, 392AHJ, B20HJ, 411AHJ, B18HJ, A36CV, 312BHJ, 270BHJ, B4HJ,100AHJ, B11HJ, A28CV, 262AHJ, 233ACV, 257CCV, 176ACV, 235ACV, B17HJ, A10CV, B23HJ *B. fumigatus* EF669791.1	*Fumigati*
II	237CCV, *A. westerdijkiae*	*Circundati*
III		*Flavi*
IIIa	127DCV,	
IIIb	27DCV, 370BHJ, 312AHJ, A17CV, 57BHJ, 369BHJ, 87ACV, A38CV, 316AHJ, 24DCV, 323CHJ, A15CV, 55CHJ, *A. flavus* EF661485.1	
Subgrupo IVa	A39CV, A25CV, 360BHJ, B49HJ, 31ECV, 87BHJ, 387AHJ, 24CCV, B12HJ, 88CCV, 314BCV, 335BCV, 307ACV, 381DCV, B. niger EF661089.1	*Nigri*
Subgrupo IVb	202BCV, B25HJ, 412AHJ, 395AHJ, 264AHJ, A26CV, 250AHJ, 146AHJ, 243ACV, A13CV, 281CCV, 88CHJ 264BCV, B52HJ, 220ACV, 166ACV, 103BCV, 217ACV, 2ACV, B39HJ, B27HJ, B13HJ, 373AHJ, 140AHJ *A. tubingensis* LC168474.1, *A. tubingensis* EF661086.1	
Grupo Externo	*A. clavatus* EF669802.1	

De acuerdo con el tercer objetivo que fue: "Determinar la actividad elastasa e identificar los genotipos *MAT1-1* y *MAT1-2* de los aislados obtenidos de *A. fumigatus* para establecer su relación con la AI", se obtuvieron los siguientes resultados.

7.6 Determinación de la actividad de elastasa en aislados de *Aspergillus fumigatus*

7.6.1 Estandarización de las condiciones para determinar la actividad de elastasa. Al realizar las curvas de crecimiento con las tres suspensiones evaluadas ($1x10^7$, $1x10^6$ y $1x10^5$ conidios/mL), los inóculos de *A. fumigatus* (aislado 9A) sembrados en medio Sabouraud cubrieron toda la caja de Petri (8.0 cm de diámetro) dentro de los primeros cinco días, mientras que el medio con rosa de bengala disminuyó la velocidad de crecimiento de los hongos. Como se aprecia en la figura 19 el tamaño de la colonia fúngica fue menor en el medio con rosa de bengala al 0.01% y en el medio con elastina (Kothary et al., 1984), en comparación con el medio Sabouraud. Los resultados fueron similares en los cuatro aislados evaluados (Figuras 20 y 21).

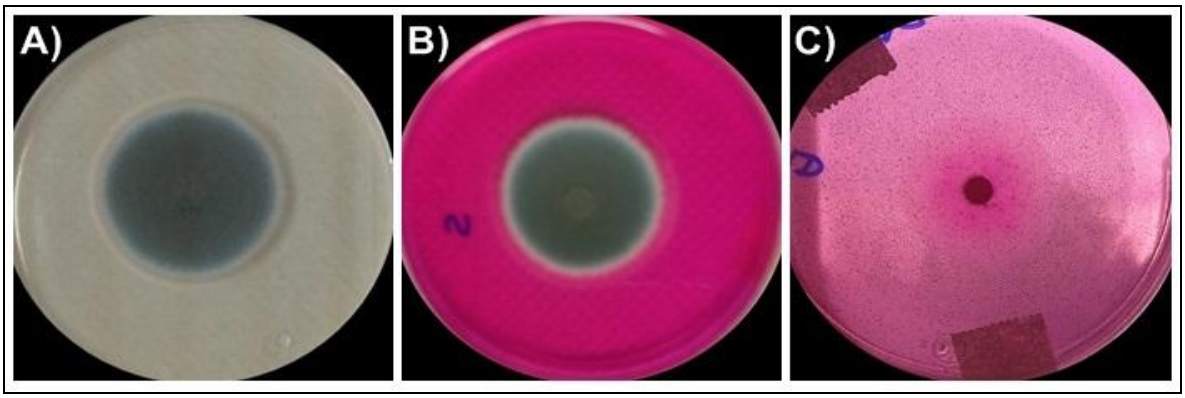

Figura 19. Crecimiento al día 4 de $1x10^7$ conidios/mL de *A. fumigatus* (aislado 9A) en medio de cultivo: A) Sabouraud, B) Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y C) Medio con elastina.

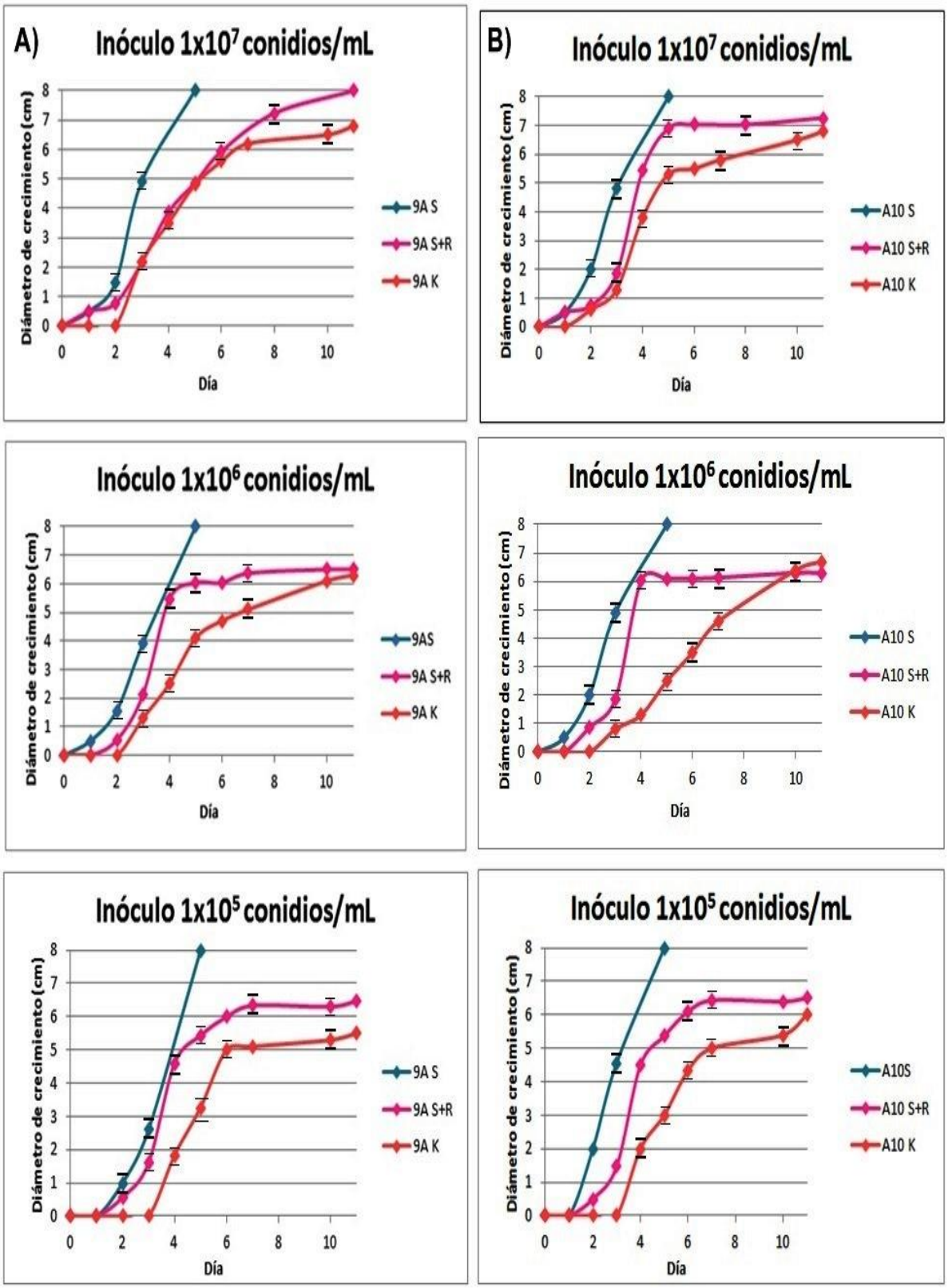

Figura 20. Curvas de crecimiento de los aislados 9A (A) y A10 (B) de *A. fumigatus*. El crecimiento se llevó a cabo en medio Sabouraud (S), Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% (S+R) y medio con elastina (K).

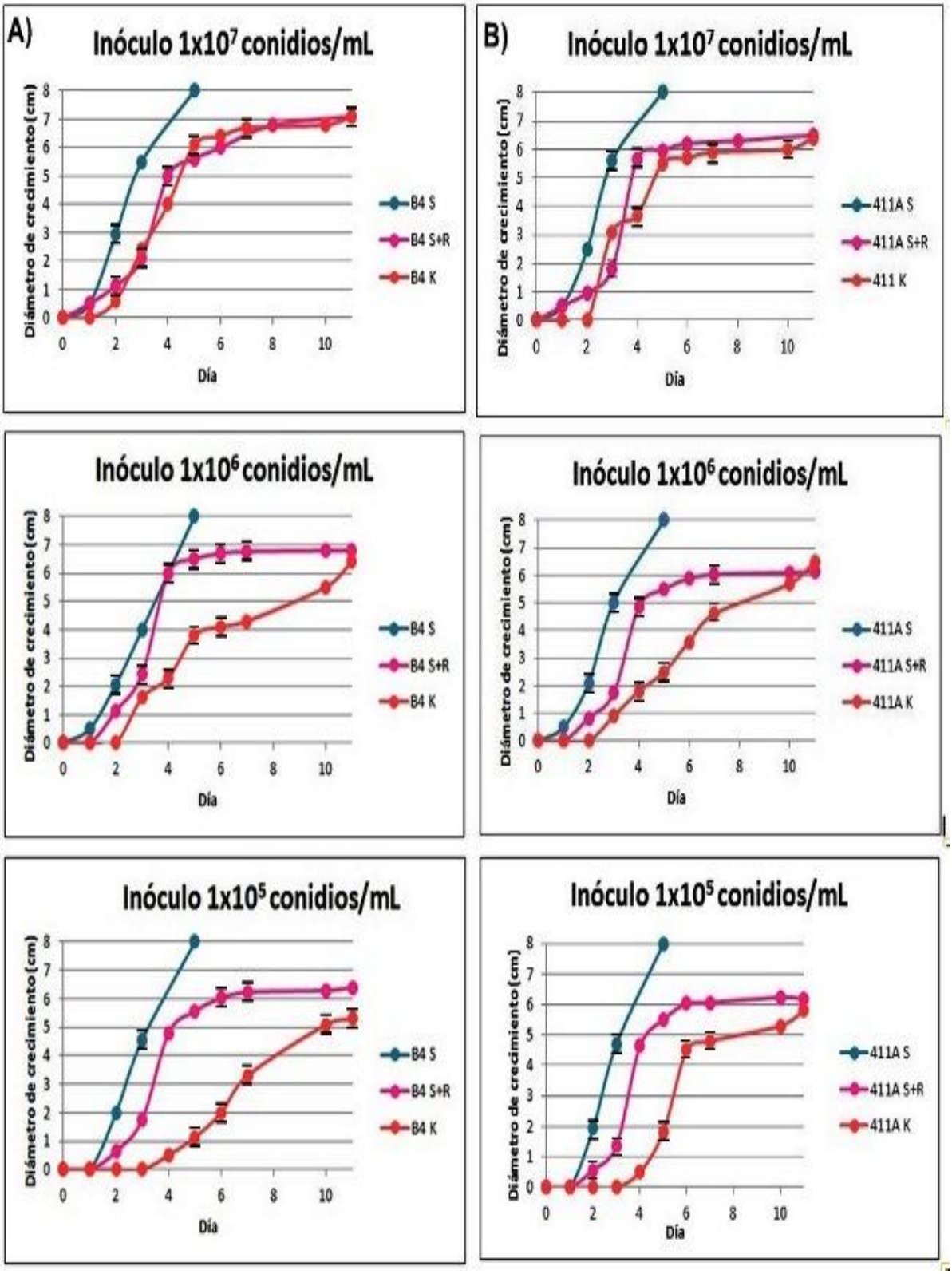

Figura 21. Curvas de crecimiento de los aislados B4 (A) y 411A (B) de *A. fumigatus*. El crecimiento se llevó a cabo en medio Sabouraud (S), Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% (S+R) y medio con elastina (K).

Respecto al tamaño de inóculo, se decidió descartar el de $1x10^5$ conidios/mL ya que a esta concentración el crecimiento era muy lento, y en el medio de elastina[122] no se logró observar halo de degradación. Al evaluar los inóculos de $1x10^6$ y $1x10^7$ conidios/mL en medios de elastina[122] con amortiguador de fosfatos y boratos, se disminuyó a 7 µL la cantidad de inóculo que se colocó sobre el papel filtro, ya que con 10 µL el disco se movía y en ocasiones se despegaba del medio. Todos los aislados crecieron tanto en medio de elastina[122] preparado con el amortiguador de fosfatos, como con el amortiguador de boratos; sin embargo, el halo de la degradación de la elastina fue más evidente en el amortiguador de fosfatos; en algunas muestras el halo de degradación comenzó a desarrollarse el día 4 aunque no era muy marcado. En la figura 22 se muestra un aislado que presentó lisis de elastina.

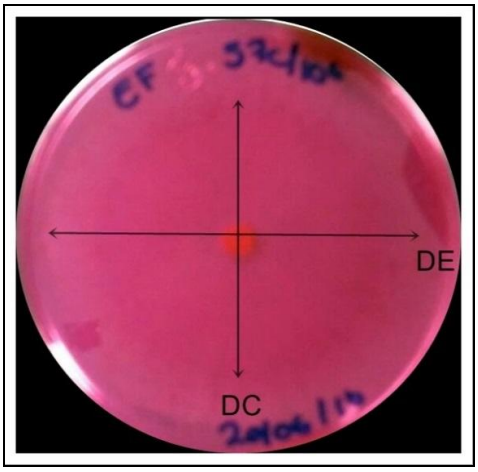

Figura 22. Halo de lisis de elastina generado por el aislado de *A. fumigatus* en medio de Kothary et al. (1984). DC: Diámetro de crecimiento; DE: Diámetro de actividad de elastasa.

Con los datos obtenidos durante la estandarización, se calculó el IAE. En la Cuadro 14 se muestran los resultados de la producción de elastasa en el medio elastina[122] y amortiguador de fosfatos. En ambos inóculos ($1x10^7$ y $1x10^6$ conidios/mL) los valores de los IAE fueron mayores en el día 7 y para el día 10 comenzaron a disminuir. Aún cuando en el día 15 hubo buen crecimiento de los aislados, la degradación de la elastina ya no era visible, por lo que no fue posible determinar el IAE. Se obtuvieron mejores lecturas de los diámetros tanto de crecimiento como del halo de lisis al utilizar el inóculo de $1x10^7$ conidios/mL, por lo que se consideró la concentración más adecuada.

Cuadro 14. Índices de actividad de elastasa (IAE) de *A. fumigatus* en medio de elastina con amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.6.

	$1x10^7$ conidios/mL				$1x10^6$ conidios/mL		
	IAE				IAE		
Aislado	**7 (d)**	**10 (d)**	**15 (d)**	**Aislado**	**7 (d)**	**10 (d)**	**15 (d)**
C-	0.0	0.0	0.0	**C-**	0.0	0.0	0.0
9ª	0.7	0.5	ND	**9A**	0.0	0.0	ND
A10	1.2	0.4	ND	**A10**	0.9	0.0	ND
B4	1.3	1.2	ND	**B4**	1.3	1.3	ND
411A	1.3	1.2	ND	**411A**	1.2	0.0	ND

C-: Testigo negativo (*A. niger*); ND: No determinado; d: días

Los resultados con el medio de elastina[122] preparado con amortiguador de boratos (Cuadro 15) fueron inconsistentes, ya que el testigo negativo (*A. niger*) en la mayor concentración del inóculo pareció degradar la elastina al tornar el medio transparente (Figura 23). Por otro lado, los IAE en algunos aislados disminuyeron para el día 10, mientras que en otros casos aumentaron y en el día 15 no se observó halo de lisis de la elastina

Cuadro 15. Índices de actividad de elastasa (IAE) de aislados de *A. fumigatus* en medio de elastina con amortiguador de boratos 0.05 M pH 7.6.

	$1x10^7$ conidios/mL				$1x10^6$ conidios/mL		
	IAE				IAE		
Aislado	**7 (d)**	**10 (d)**	**15 (d)**	**Aislado**	**7 (d)**	**10 (d)**	**15 (d)**
C-	*	*	*	**C-**	0.0	0.0	0.0
9A	1.2	1.5	ND	**9A**	1.3	0.0	ND
A10	0.8	0.0	ND	**A10**	1.2	1.4	ND
B4	0.0	1.8	ND	**B4**	0.7	0.5	ND
411A	0.0	0.0	ND	**411A**	1.2	0.0	ND

C-: Testigo negativo (*A. niger*); *Alrededor de la colonia el medio se observó transparente; ND: No determinado; d: días

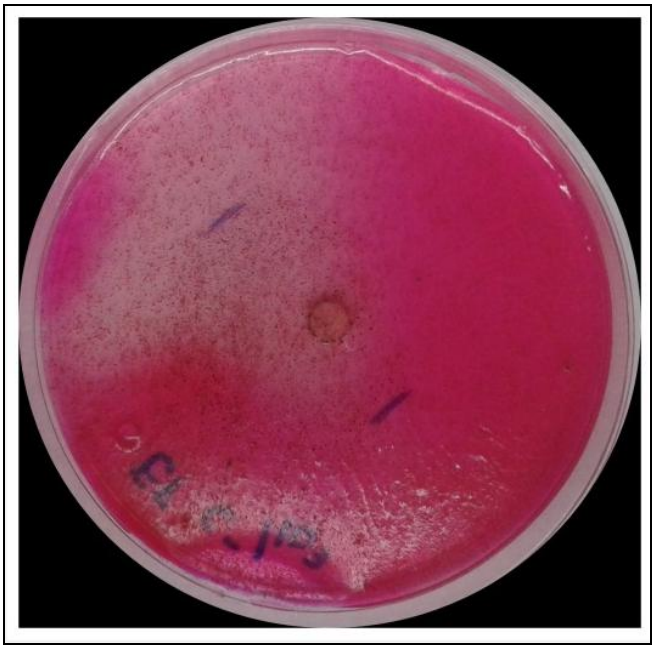

Figura 23. Decoloración del medio de cultivo de elastina con amortiguador de boratos en presencia de *A. niger.*

Al repetir el experimento se observó que *A. niger* generaba resultados falsos positivos, ya que el medio se tornó más claro. En la figura 24 se muestra el crecimiento del hongo en Sabouraud con rosa de bengala a los días 3 y 7; en este último se observa cómo el medio ha pasado de un color rosa fuerte a uno más claro.

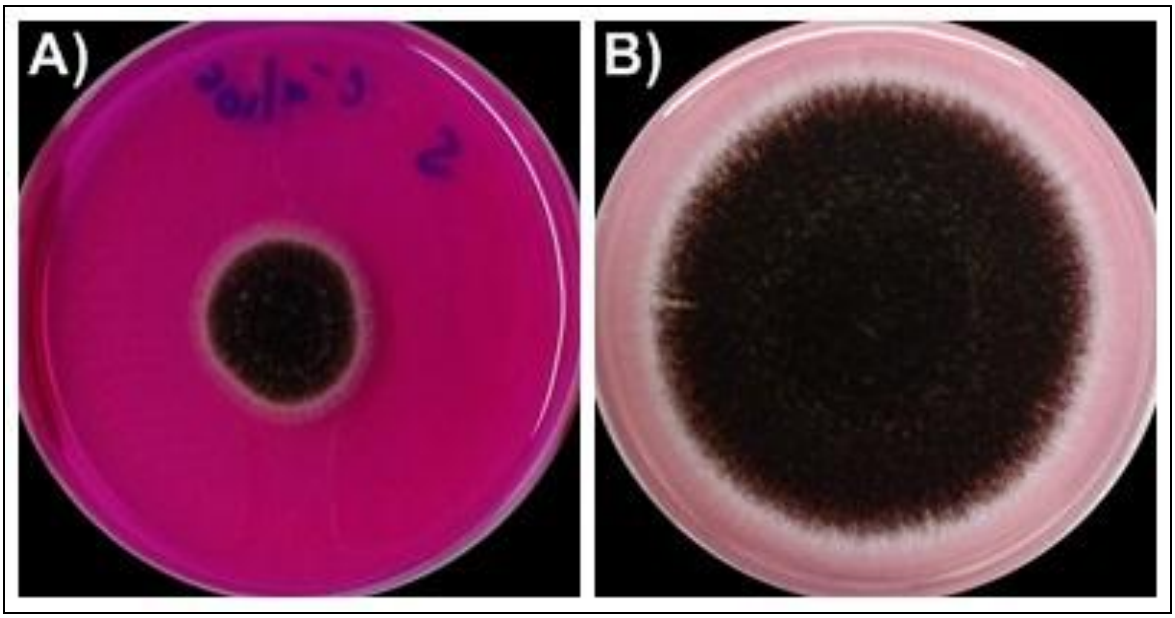

Figura 24. Crecimiento de *A. niger* en medio Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% a los días 3 (A) y 7 (B).

De los tres aislados evaluados, solo el A10 mostró un índice alto de actividad elastasa (Cuadro 16). Como se mencionó anteriormente, también se realizó el experimento en medio de elastina[122] con amortiguador de boratos; sin embargo, fueron pocos los aislados que crecieron y ninguno presentó degradación de la elastina.

Cuadro 16. Índices de actividad de elastasa (IAE) de *A. fumigatus* en medio de elastina en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.6. El inóculo utilizado fue de $1x10^7$ conidios /mL.

		IAE		
	Aislado	**7(d)**	**10(d)**	**15(d)**
	C-	*	*	*
Aislados ambientales	**A10**	1.1	0.2	ND
	257C	0.7	0	ND
	411A	0	0	ND

C-: Testigo negativo (*A. niger*); *Alrededor de la colonia el medio se halló transparente (degradación); ND: No determinado; d: días

Con base en los resultados obtenidos, finalmente se estableció que las condiciones óptimas para realizar la determinación de la actividad de elastasa fueron: 7 µL de inóculo con $1x10^7$ conidios/mL y el tiempo para medir el crecimiento y la degradación fue el día 7 en medio de elastina[122] preparado con amortiguador de fosfatos (0.05 M, pH 7.6). Se descartó a *A. niger* como control negativo y se eligió el medio de cultivo sin elastina como testigo negativo para la producción de elastasa.

7.6.2 Determinación de la actividad elastasa. De los 28 aislados de *A. fumigatus* evaluados, el 86.2% mostró actividad elastasa al degradar la elastina presente en el medio y formar el respectivo halo de degradación. El restante 13.8% de los aislados sólo crecieron en el medio de cultivo pero no presentaron actividad de elastasa; dentro de éstos se hallaron algunos cuyo crecimiento fue escaso o nulo en el medio de cultivo y por lo tanto no produjeron halo de degradación, y otros que

a pesar de tener buen crecimiento, no degradaron la elastina presente en el medio (Figuras 25 y 26).

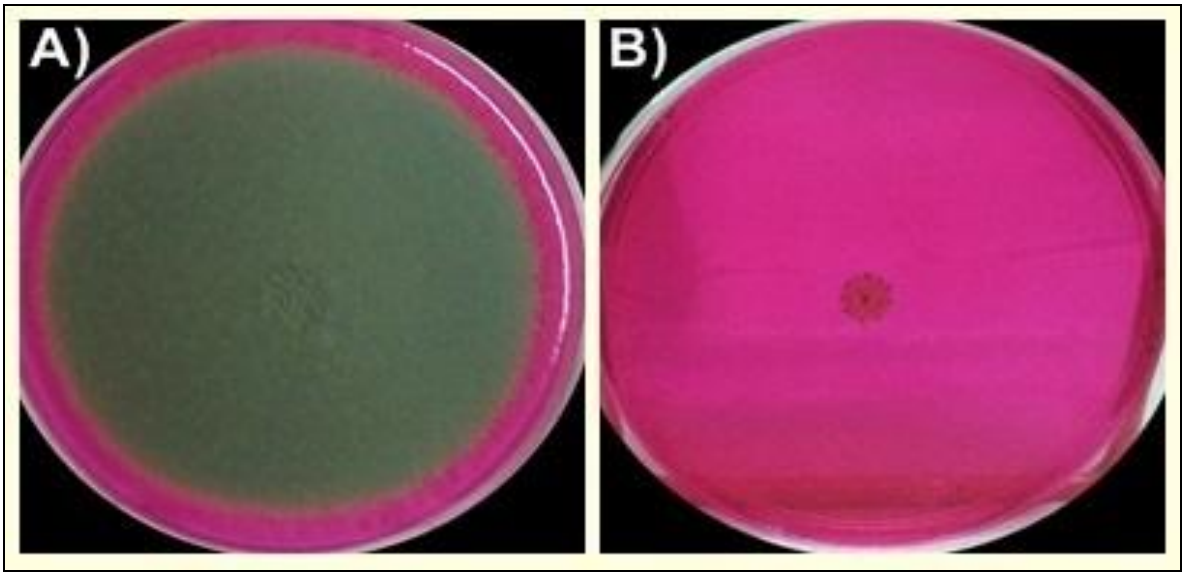

Figura 25. Ausencia de la actividad de elastasa en el aislado 392A: A) crecimiento en medio Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y B) crecimiento escaso en medio de elastina en el día 7.

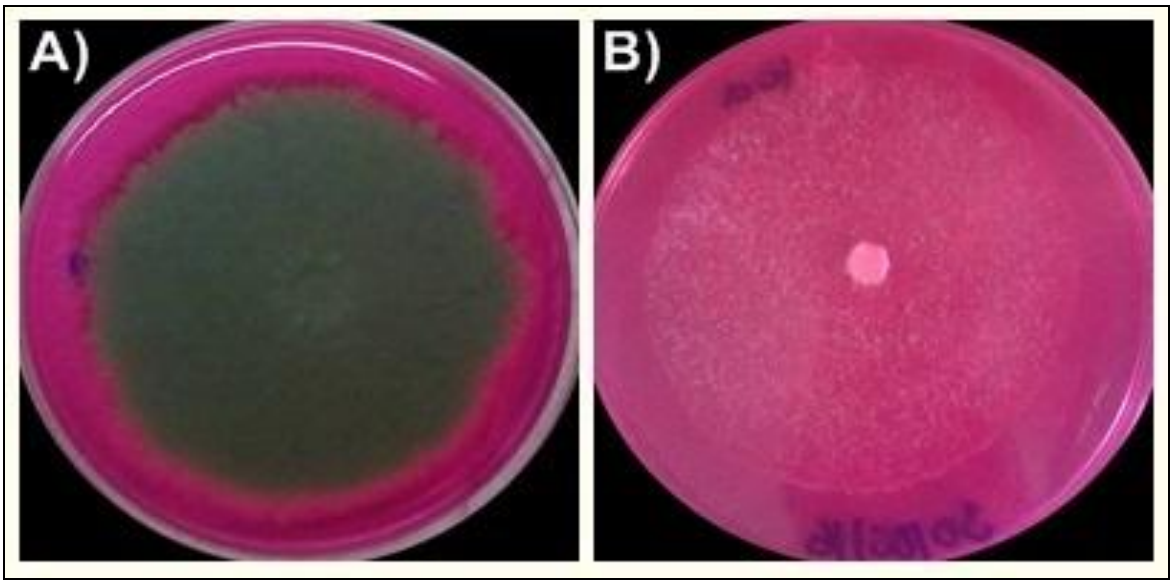

Figura 26. Ausencia de la actividad de elastasa en el aislado B23: A) crecimiento en medio Sabouraud con rosa de bengala al 0.01% y B) crecimiento en medio con elastina en el día 7.

Los diámetros de crecimiento, el halo de degradación y el IAE se muestran en la Cuadro 17. Los resultados evidenciaron valores altos, bajos e incluso nulos de IAE; el promedio fue de 0.9 ±0.5 de IAE.

Cuadro 17. Índices de Actividad de Elastasa (IAE) de aislados ambientales de *A. fumigatus*

Aislado		Diámetro de crecimiento (cm)	Diámetro del halo de lisis (cm)	IAE	IAE Promedio ± DE
9A	**a**	3.0	6.0	2.0	**1.8 ± 0.2**
	b	4.3	6.7	1.6	
	c	3.2	6.0	1.9	
A10	**a**	4.8	6.3	1.3	**1.2 ± 0.0**
	b	5.2	6.0	1.2	
	c	4.2	5.2	1.2	
A28	**a**	6.4	7.0	1.1	**1.1 ± 0.0**
	b	6.6	7.5	1.1	
	c	6.8	7.5	1.1	
A35	**a**	6.5	7.3	1.1	**1.1 ± 0.0**
	b	7.0	7.5	1.1	
	c	6.6	7.5	1.1	
A36	**a**	7.0	0.0	0.0	**0.0 ± 0.0**
	b	7.0	0.0	0.0	
	c	7.0	0.0	0.0	
176A	**a**	5.3	6.5	1.2	**1.3 ± 0.0**
	b	5.3	7.0	1.3	
	c	5.7	7.2	1.3	
222A	**a**	6.4	6.0	0.9	**1.0 ± 0.1**
	b	6.5	7.0	1.1	
	c	6.6	7.0	1.1	
233A	**a**	3.5	5.5	1.6	**1.4 ± 0.1**
	b	3.5	5.0	1.4	
	c	4.5	5.8	1.3	
235A	**a**	7.0	7.0	1.0	**1.1 ± 0.1**
	b	6.7	7.0	1.0	
	c	6.3	7.0	1.1	
257C	**a**	6.5	7.5	1.2	**1.1 ± 0.0**
	b	6.5	7.5	1.2	
	c	6.8	7.4	1.1	
B4	**a**	6.5	4.0	0.6	**0.6 ± 0.0**
	b	6.8	4.7	0.7	

	c	7.0	4.3	0.6	
	a	7.0	7.0	1.0	
B11	**b**	6.7	7.5	1.1	**1.0 ± 0.1**
	c	7.8	7.3	0.9	
	a	6.6	7.5	1.1	
B18	**b**	6.6	7.5	1.1	**1.1 ± 0.0**
	c	6.5	7.5	1.2	
	a	7.5	7.5	1.0	
B20	**b**	7.5	7.5	1.0	**1.1 ± 0.1**
	c	6.5	7.5	1.2	
	a	5.6	7.0	1.3	
B21	**b**	7.0	7.5	1.1	**1.1 ± 0.1**
	c	6.8	7.0	1.0	
	a	7.0	0.0	0.0	
B23	**b**	7.0	0.0	0.0	**0.0 ± 0.0**
	c	7.0	0.0	0.0	
	a	7.0	6.0	0.9	
B43	**b**	7.0	5.0	0.7	**0.8 ± 0.1**
	c	6.9	6.0	0.9	
	a	7.0	5.0	0.7	
100A	**b**	6.9	6.0	0.9	**0.8 ± 0.1**
	c	7.0	6.0	0.9	
	a	5.6	6.5	1.2	
262A	**b**	5.7	7.1	1.2	**1.2 ± 0.0**
	c	5.5	6.6	1.2	
	a	4.5	0.0	0.0	
270B	**b**	4.8	0.0	0.0	**0.0 ± 0.0**
	c	4.0	0.0	0.0	
	a	4.0	5.0	1.3	
312B	**b**	4.2	5.5	1.3	**1.3 ± 0.4**
	c	4.2	5.4	1.3	
	a	6.0	6.5	1.1	
314A	**b**	6.2	7.0	1.1	**1.1 ± 0.1**
	c	6.5	6.5	1.0	
	a	5.8	6.2	1.1	
373C	**b**	5.5	6.2	1.1	**1.1 ± 0.0**
	c	5.4	6.0	1.1	
	a	6.8	7.5	1.1	
385B	**b**	6.8	7.5	1.1	**1.1 ± 0.0**
	c	7.0	7.5	1.1	
392A	**a**	0.0	0.0	0.0	
	b	0.0	0.0	0.0	**0.0 ± 0.0**

	c	0.0	0.0	0.0	
	a	6.0	7.5	1.3	
394A	**b**	5.6	7.0	1.3	**1.2 ± 0.0**
	c	5.7	7.0	1.2	
	a	5.7	6.5	1.1	
411A	**b**	6.3	6.9	1.1	**1.1 ± 0.0**
	c	6.3	6.8	1.1	
	a	7.0	4.3	0.6	
435A	**b**	6.7	4.3	0.6	**0.6 ± 0.0**
	c	6.7	4.3	0.6	

El ensayo se realize por triplicado (a, b y c)

7.7 Determinación del genotipo sexual. La determinación del genotipo sexual *MAT1* a través de la PCR, se realizó inicialmente de acuerdo con las condiciones reportadas por Paoletti et al.[105] No obstante, se estandarizaron las condiciones para optimizar la PCR, obteniendo una concentración óptima de 20 ng de DNA molde, 50 pmol de los oligonucleótidos *AFM1* y *AFM2*, 100 pmol del oligonucleótido *AFM3*, 2.5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de dNTPs y 1 U de *Taq* polimerasa.

En la figura 27 se muestra el corrimiento electroforético de algunos de los productos de amplificación; la banda de 834 pb identifica el idiomorfo *MAT1-1* y la de 438 pb el idiomorfo *MAT1-2*.

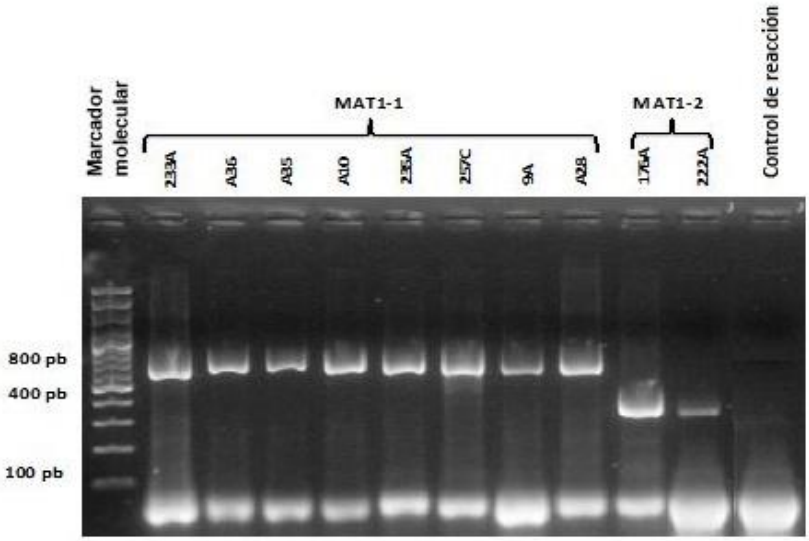

Figura 27. Productos de amplificación de la PCR para la determinación del genotipo sexual de los aislados de *Aspergillus fumigatus*.

Para determinar la correlación entre el genotipo sexual y la actividad elastasa en los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati,* se consideraron valores altos de la actividad enzimática aquellos cuyos IAE fueron mayores o iguales a 1, y valores bajos aquellos cuyo IAE fuera menor a 1 (Cuadro 17).[108,119]

Cuando los resultados fueron analizados estadísticamente, la correlación entre el genotipo sexual *MAT1-1* y los índices altos de la actividad elastasa no fue significativa (χ^2t = 3.84 > χ^2c= 2.53, p = 0.05).

De acuerdo con el cuarto objetivo que fue: “estudiar la variabilidad genotípica de aislados ambientales de *A. fumigatus*, a través del microsatélite *CSP*”, se obtuvieron los siguientes resultados.

7.8 Tipificación de aislados de *A. fumigatus* con el microsatélite *CSP*

7.8.1 Amplificación de microsatélite Inicialmente se probaron diferentes concentraciones de DNA (10, 20, y 30 ng/µL) para la amplificación. En la figura 28 se observa la amplificación del fragmento de 550 bp con las tres concentraciones de DNA probadas; sin embargo, con 20 ng/µL el amplicón fue más definido, por lo que esta concentación fue la seleccionada para realizar los ensayos.

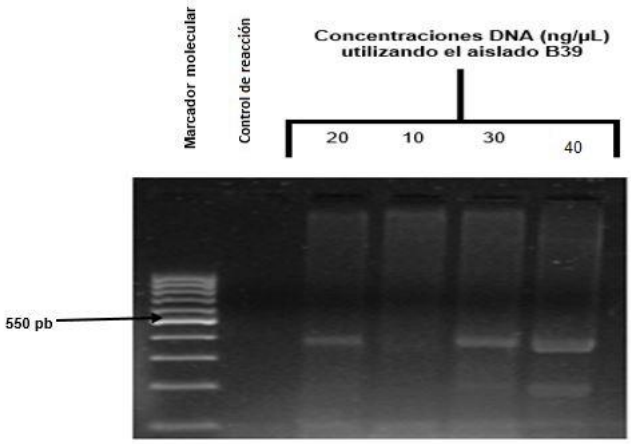

Figura 28. Curva de DNA para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP* del aislado B39 utilizando concentraciones de 10, 20 y 30 ng/µL de DNA. En gel de agarosa 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Curva de $MgCl_2$. Se realizó una curva de concentración de $MgCl_2$, en donde se probaron 1.2, 1.5, 2.0 y 2.5 mM. La amplificación del fragmento de 550-700 bp se observó en 1.5 y 2.0 mM de $MgCl_2$ (Figura 29), de las cuales se eligió la concentración de 2.0 mM, ya que la banda se visualizó mejor.

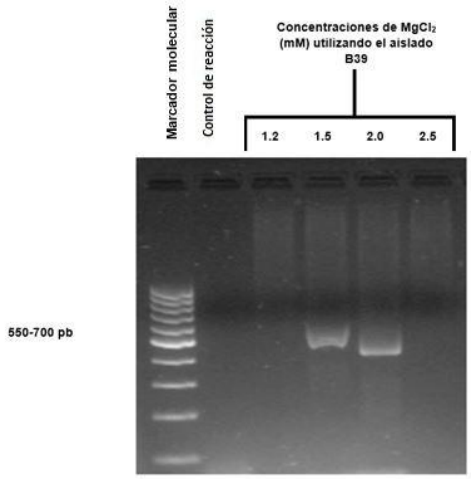

Figura 29. Curva de $MgCl_2$ para estandarización de la PCR para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP.* Se amplificó el aislado B39, con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (1.2 1.5, 2.0 y 2.5). En gel de agarosa 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Curva de oligonucleótidos. La curva de oligonucleótidos para la amplificación de la PCR se realizó con las concentraciones de 10, 20, 50, 100 y 200 pmol/µL. La amplificación del fragmento se observó únicamente en 100 pmol/µL (Figura 30), por lo que se seleccionó esta concentración.

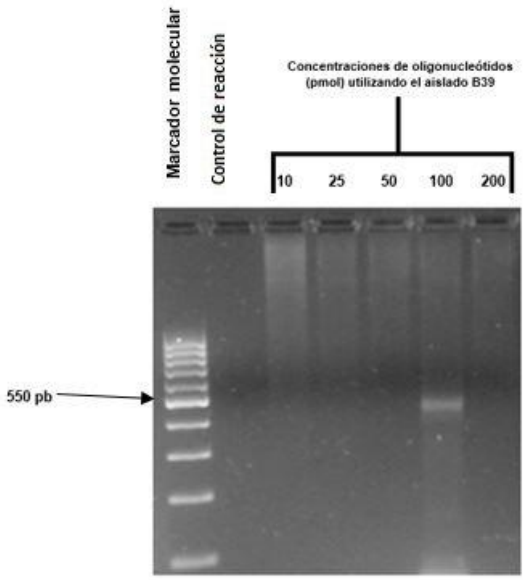

Figura 30. Curva de oligonucleótidos para la estandarización de la amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP*, utilizando las concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 200 pmol. En gel de agarosa 1.5%. Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

De acuerdo con los ensayos de la estandarización, las condiciones óptimas para la amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP* fueron: oligonucleótidos 100 pmol, $MgCl_2$ 2.0 mM, DNA 20 ng, dNTPs 200 µM y *Taq* polimerasa 1 U. Con estas condiciones se amplificó el *CSP* de todos los DNAs de los aislados ambientales de *A. fumigatus* (Figura 31).

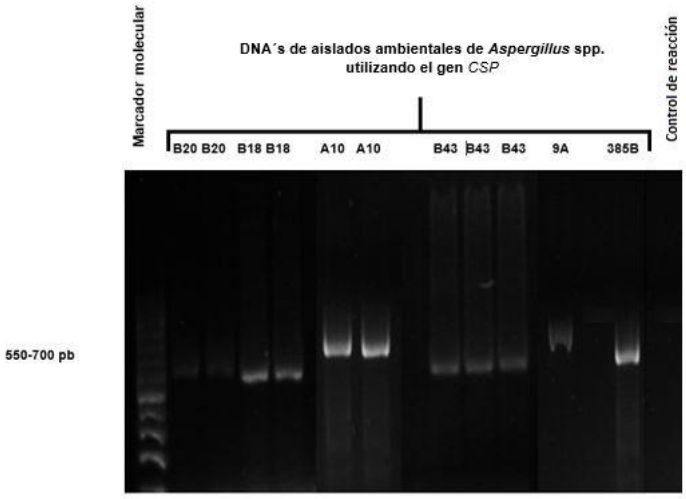

Figura 31. Amplificación de la secuencia parcial del gen *CSP* en diferentes aislados de *A. fumigatus.*

7.8.2 Tipificación de los aislados de *A. fumigatus* con el microsatélite *CSP*

Una vez estandarizadas las condiciones para la PCR, se llevó a cabo el ensayo con todos los aislados de *A. fumigatus*. Con las secuencias obtenidas de los amplicones, se procedió a tipificarlos según el método de Klaassen et al.[132] en el que proponen una nomenclatura estandarizada para repeticiones individuales de 12-mer, así como para tipos *CSP* con el fin de facilitar la portabilidad y el intercambio de datos de tipificación con base en el marcador *CSP*. Un total de 27 aislados ambientales de *A. fumigatus* procedentes de México fueron analizados por tipificación *CSP*; el 100% fueron tipificables de acuerdo con la nomenclatura

propuesta (Tabla 15). En la figura 32 se muestra un ejemplo de los análisis de las secuencias para identificar los tipos de repetición. Mediante la inspección de las secuencias de DNA dentro de la región de repetición en tándem, así como las regiones flanqueantes de -45 pb y +9 pb, se identificaron 7 tipos de repetición en los aislados estudiados y un total de 5 tipos *CSP*, designados como t01, t02 y t03, t04A y t10. Éstos se encuentran dentro de los reportados por Klaassen et al. (2009), los que se ubican en tres linajes (A, B y C) (Cuadro 18).[132] Se calculó la prevalencia de los tipos *CSP* observados en México y se compararon con los reportados en otros países (Holanda, Australia y China); se observó que en México prevalecen en orden decreciente: t04A (55.6%), t01 (14.8%), t03, t010 (11.1%) y t02 (7.4%). Es importante mencionar que la mayor prevalencia del t04A en este estudio concuerda con los resultados de los aislados ambientales de Australia (Cuadro 19).

Cuadro 18. Patrones de los repetidos en tándem (tipos *CSP*) de aislados de *A. fumigatus* recuperados del ambiente de dos Instituciones hospitalarias de la ciudad de México

No. de aislado	Tipo de CSP	Repetidos en tandem	Número de repeticiones	Linaje
373C	t10	01-01-01-05-03-01-06-03-07	9	A
435A	t10	01-01-01-05-03-01-06-03-07	9	A
314A	t10	01-01-01-05-03-01-06-03-07	9	A
100A	t01	01-01-01-01-05-03-01-06-03-07	10	A
222A	t01	01-01-01-01-05-03-01-06-03-07	10	A
262A	t01	01-01-01-01-05-03-01-06-03-07	10	A
394A	t01	01-01-01-01-05-03-01-06-03-07	10	A
9A	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
235A	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
257C	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
A10	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
A28	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
A35	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
A36	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
312B	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
B11	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
B18	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
B20	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
B21	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
B43	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
270B	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
385B	t04A	01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	10	B
176A	t02	01-01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	11	B
233A	t02	01-01-02-03-04-05-03-01-06-03-07	11	B
392A	t03	01-02-03-04-06-03-07	7	C
B4	t03	01-02-03-04-06-03-07	7	C
B23	t03	01-02-03-04-06-03-07	7	C

```
                  *        20         *        40         *        60         *        80         *
257C_CSP : ACTCTCTTACCTTCTGCATGGAGGACACTGACATTGCGGTAATAGGGTCATTCTGGTTACCCTGGTCACACCCCTCCCACCAAGTGGCCAGCCA

           0         *       140         *       160         *       180         *       200         *
257C_CSP : GACGGCAACGTACTTGACCACAACCTGCCCAGGTATGATGCTCCACCTGACCTTTTCAAGCGCATGTGTCTTAATACTATCATCGCAGTTTCCC

           40        *       260         *       280         *       300         *       320         *
257C_CSP : GACTTTGACTATTCCTATCACTCTGACTAGTACAATCACTGTGACTACCACTACCGTTGAGGACTCGAACACCGAGACTCGAGTGGTCGTGCCC

           360       *       380         *       400         *       420         *       440         *
257C_CSP : TGGTTCCGACTTCTGTCCCGACTTCTGTCCCAACTCAAAACGCGACTTCAATCCCGACTTTTGTCCCGACTCAAAACGCGACTTCTGTCCCGA

            480       *       500         *       520         *       540         *       560         *
257C_CSP : ACTATTGTGCCACCTCCAAAGGTTGTCCCAACGGGTGTCCCCGGCCAGAACACTACTGTTGTCCCACCCCCCAGGCCCGCTCCTTTCACCAACA
```

Figura 32. Patrón de repeticiones en tándem de un aislado de *A. fumigatus*

Cuadro 19. Prevalencia de los tipos de *CSP* observados en diferentes regiones del mundo.

	México		China	Australia		
Tipo CSP		Amb (*n*=27)	Clín (*n*=162)	Clín (*n*=95)	Amb (*n*=27)	Total (*n*=122)
t01	4	14.8%	11.7%	22.1%	18.5%	21.3%
t02	2	7.4%	9.9%	7.4%	7.4%	7.4%
t03	3	11.1%	20.4%	26.3%	14.8%	23.8%
t04A	15	55.6%	31.5%	25.3%	40.7%	28.7%
t05			1.2%	2.1%		1.6%
t06A			3.1%	3.2%		2.5%
t06B			5.6%	1.1%		0.8%
t07						
t08						
t09				1.1%	7.4%	2.5%
t10	3	11.1%	3.7%	2.1%		1.6%
t11						
t12			1.9%			
t13					7.4%	1.6%
t14			1.9%	1.1%		0.8%
t15						
t16						
t17			0.6%	1.1%		0.8%
t18A				2.1%		1.6%
t18B			1.9%			
t19				4.2%	3.7%	4.1%
t20				1.1%		0.8%
t21			0.6%			
t22			4.9%			
t23			0.6%			
t24			0.6%			

(Klaassen et al.[132]; Kidd et al.[133]; Gao et al.[134])

8. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, se ha evidenciado un aumento global de las infecciones fúngicas nosocomiales debido, entre otros factores, a los avances en terapias médicas y quirúrgicas cada vez más eficaces, pero también más agresivas.[149] Las enfermedades fúngicas invasivas causadas por hongos filamentosos están asociadas con una elevada morbilidad y mortalidad, lo que se debe en parte a la dificultad de realizar un diagnóstico precoz, que en consecuencia provoca un retraso en el inicio del tratamiento adecuado. Aunque los hongos tienen varias vías de entrada en el huésped, la más común es a través de la inhalación; por lo tanto, se requiere mantener una buena calidad del aire en áreas críticas de hospitales para reducir la incidencia de infecciones fúngicas invasivas. De ahí la importancia de llevar a cabo estudios orientados en la búsqueda de hongos aerotransportados en el ambiente, principalmente en áreas intrahospitalarias, ya que los pacientes pueden ser un blanco de los patógenos fúngicos detectados.

Objetivo 1: "Aislar hongos ambientales en diferentes áreas de dos hospitales, ubicados en el centro y norte de la Ciudad de México"

El presente trabajo, enfocado en la detección de especies fúngicas en ambientes intrahopitalarios de dos instituciones de salud, mostró resultados coincidentes con otros estudios de aeromicología realizados en México y Brasil.[150-152] Durante el período de muestreo, la concentración de propágulos fúngicos en el aire (UFC/m^3) en ambas instituciones fue similar, tanto en la estación seca como en la lluviosa (Cuadro 5), independientemente de las condiciones o estructura de cada área de muestreo. Las UFC/m^3 en las áreas de muestreo de ambas instituciones mostraron en promedio 40.22 UFC/m^3, con excepción del quirófano de la Institución 2, donde

se hallaron valores de 8.53 y 8.95 UFC/m^3 en las estaciones lluviosa y seca, respectivamente. Por otro lado, la carga de hongos en las áreas muestreadas de ambas instituciones, no corresponde con lo reportado en otros países,[153,154] sin embargo, de manera individual, los datos de UFC/m^3 en el quirófano (5-10 UFC/m^3) sí coinciden con estos trabajos, lo que se explica por las rigurosas medidas higiénicas en los quirófanos. Del mismo modo, no existen criterios establecidos a nivel institucional en México sobre los intervalos de UFC/m^3 que se consideren aceptables, ya que solo se ha reportado un estudio de este tipo.[152] La homogeneidad en el número de UFC/m^3 encontrados durante las dos estaciones (lluviosa y seca) puede explicarse por la similitud entre estas temporadas en la Ciudad de México, en comparación con los países de Norteamérica y Europa, donde las estaciones están marcadas por cambios abruptos en la temperatura ambiente y por una separación física eficiente entre ambientes intramuros y extramuros, lo que no ocurre en México.

En ambas instituciones hospitalarias, también la diversidad fúngica fue similar. Fueron identificados los hongos *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp, *A.* sección *Nigri*, *A.* sección *Flavi* y *A*. sección *Fumigati*, todos médicamente relevantes, además de que fueron los más abundantes en ambas instituciones. Estos resultados son consistentes con los reportados por Hao et al.[155] quienes examinaron la carga fúngica ambiental en dos hospitales en China y demostraron que *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. estuvieron presentes en el aire, en las superficies y en el agua del grifo. También informaron que la carga de hongos en el aire fluctuó durante el año de muestreo, y las densidades más altas de estos microorganismos se observaron

durante el verano y la primavera. Azimi et al.[156] también reportaron que *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Cladosporium* fueron los géneros más comunes en diferentes áreas de hospitales. La diversidad de hongos identificados en este trabajo puede explicarse porque los hongos suspendidos en la atmósfera suelen ser transportados rápidamente como bioaerosoles a grandes distancias con el movimiento del aire, lo que representa el mecanismo óptimo de dispersión. Asimismo, ciertos hongos han desarrollado mecanismos que favorecen su supervivencia y dispersión en la atmósfera, como su transportación sobre partículas de polvo, fragmentos de hojas, piel, fibras de ropa o en gotas de agua.[157] Por otro lado, las condiciones fisicoquímicas de la atmósfera no favorecen el crecimiento o la supervivencia de los microorganismos; por lo tanto, la mayoría sólo sobreviven durante un corto período de tiempo. Sin embargo, los conidios fúngicos, a diferencia de las hifas, son formas de vida con tasas de supervivencia largas y tienen varias propiedades que contribuyen con su capacidad de sobrevivir en la atmósfera, tales como paredes gruesas que los protegen de la desecación, y pigmento (melanina), que les protege de la radiación ultravioleta.[115] Asimismo, los conidios poseen otras habilidades, como la termotolerancia y la versatilidad nutricional, lo que les permite utilizar una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno, como ocurre en las especies del género *Aspergillus*.[115] La capa externa conidial, rica en hidrofobinas, les permite a estos propágulos permanecer suspendidos en el aire. Las hidrofobinas son proteínas ricas en cisteína y están relacionadas con la alta actividad tensoactiva de los hongos; se ensamblan en la interfase hidrófila-hidrofóbica y forman una monocapa anfipática.[158,159] Estas moléculas reducen la tensión superficial del medio o sustrato en el que crece el

hongo, lo que permite romper la interfase aire-agua y evitar que la hidrosaturación mantenga la permeabilidad al gas. El grado de hidrofobicidad entre los hongos varía de leve a muy hidrófobo, lo que afecta la eficiencia de la capacidad de dispersión de esporas; por ejemplo, los conidios de *A. fumigatus* son significativamente más hidrofóbicos que otras especies de este género, característica que les permite permanecer en el aire.[158,159] Sin lugar a dudas, la presencia de especies fúngicas en entornos hospitalarios es una advertencia para tomar medidas de control más estrictas, ya que entre estos hongos se encuentran especies del género *Aspergillus*, consideradas la principal causa de enfermedades fúngicas invasivas por hongos filamentosos en pacientes inmunocomprometidos (40-90%).[160] Además, las enfermedades invasivas causadas por hongos filamentosos distintos de *Aspergillus* spp. también han aumentado en frecuencia y mortalidad en los últimos años, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Así, hongos como los Mucorales, incluyendo *Mucor*, *Rhizopus, Lichtheimia*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* y hongos dematiáceos, como *Bipolaris*, *Exophiala*, *Alternaria* y *Cladosporium,* deben controlarse dependiendo de los factores de susceptibilidad de los diferentes huéspedes.[149] Las enfermedades fúngicas invasivas causadas por estos hongos son menos frecuentes que las ocasionadas por especies del género *Aspergillus*; sin embargo, *Penicillium* spp. puede causar ciertos tipos de asma,[161] y *Cladosporium* spp. ha sido asociado con cambios en la función pulmonar en niños.[162] Además, estos hongos suelen ser más virulentos y difíciles de tratar, debido a su resistencia contra la mayoría de los fármacos disponibles y el tipo de paciente afectado, como aquellos que reciben tratamiento hematológico o trasplantes de órganos sólidos.[149]

Objetivo 2: "Identificar y caracterizar *Aspergillus* spp. por métodos fenotípicos (termotolerancia, tamaño de conidios y vesículas) y moleculares (genes *BenA* y *ActA*)"

Por otro lado, los ensayos de termotolerancia realizados a 28 °C y a 50 °C para confirmar la identificación de *A. fumigatus* sección *Fumigati* permitieron distinguir a *A. fumigatus* de otras especies de importancia clínica que pertenecen a otras secciones. Previamente, Balajee et al.[147] mostraron la habilidad de *A. fumigatus* para crecer a temperaturas de 55 °C y sobrevivir hasta 75 °C, características que permiten que el organismo se desarrolle en materia orgánica en descomposición e infecte huéspedes mamíferos.[163-164]

Los resultados del presente estudio mostraron que los aislados identificados como *A*. sección *Fumigati* crecieron a 28 y 50 °C. Sin embargo, los hongos identificados como *A*. sección *Flavi*, *A*. sección *Nigri*, y *A*. sección *Terrei* sólo crecieron a 28 °C. Por lo tanto, esta característica fenotípica es fundamental para la confirmación de la identificación de *A. fumigatus* sección *Fumigati*.[163]

Las tasas de crecimiento calculadas para todos los aislados del género *Aspergillus* se realizaron para identificar diferencias entre secciones y entre los aislados de *A.* sección *Fumigati* a 50 ºC. La habilidad de estos hongos para resistir altas temperaturas puede desempeñar un papel crucial en la selección de especies patógenas, como *A. fumigatus* que se adapta a cambios extremos en las condiciones ambientales. Ello favorece el desarrollo de infecciones invasivas porque el microambiente proporcionado por el cuerpo humano parece suministrar condiciones excelentes para su crecimiento e invasión, mientras que los aislados de *A. flavus* y *A. niger* no pueden adaptarse a condiciones similares porque no

pueden soportar altas temperaturas.[165] Las tasas de crecimiento más rápidas a 28 ° C correspondieron a aislados de *A*. sección *Nigri*, seguidos por *A*. sección *Flavi*, *A*. sección *Fumigati* y *A*. sección *Terrei* de ambos hospitales. Este resultado fue consistente con el trabajo de Marin et al.[166] quienes observaron que el crecimiento de conidios ocurre más rápidamente en *A.* sección *Nigri* a temperaturas entre 28-30 ° C. Sin embargo, a pesar de la abundancia y la alta tasa de crecimiento de *A*. sección *Nigri*, es menos termotolerante que *A*. sección *Fumigati* porque su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C. Por lo tanto, es difícil para *A*. sección *Nigri* germinar a 37 °C, que es la temperatura del cuerpo humano. Tal vez esto es un factor determinante de por qué los casos nosocomiales de aspergilosis son causados principalmente por *A. fumigatus* y no *A. niger.*

La siguiente etapa de este proyecto consistió en identificar los aislados ambientales a nivel de especie a través de su ubicación filogenética, ya que previamente fueron identificados por métodos fenotípicos sólo a nivel de sección. La ubicación filogenética de las especies es importante, ya que *Aspergillus* comprende un grupo diverso de especies clasificadas con base en caracteres morfológicos, fisiológicos y filogenéticos, lo cual impacta significativamente en biotecnología, producción de alimentos, ambientes internos y salud humana. El primer tratado taxonómico más completo del género se llevó a cabo con base en criterios morfológicos y se incluyeron 150 taxa que se separaron en "grupos".[37] Estos grupos de especies ("grupos") fueron posteriormente renombrados como 18 "secciones" con 6 subgéneros, con el fin de obtener un estatus en la nomenclatura.[38] Posteriromente, se describió una lista de 182 especies con nombres válidos,[167] que se amplió a ~ 250 especies,[168] sin embargo, actualmente se consideran más de 344 especies.[35]

Asimismo, durante la última década se ha llevado a cabo una revisión del género *Aspergillus* y los análisis moleculares han permitido una mejor comprensión de las relaciones taxonómicas y filogenéticas.[169,170] Además, la revisión se ha llevado a cabo con base en un enfoque polifásico que incluye datos moleculares, así como características morfológicas, fisiológicas y ecológicas, ya que un método único no es suficiente para el reconocimiento de las especies.[168] Para la tipificación molecular de las especies de *Aspergillus*, se ha sugerido el uso de secuencias de los genes *BenA*, *CaM*, *ActA*, *ITS* y RNA polimerasa II segunda subunidad más grande (*RPB2*); ésta última no es fácil de amplificar,[44,46,170-172] concatenarla y utilizarla como una unidad, para intentar resolver las ambigüedades taxonómicas existentes. La utilización de estos marcadores, ha dado como resultado la reevaluación del género *Aspergillus*.[39,51] De esta manera, en el presente estudio se utilizaron secuencias de los genes *BenA* y *ActA* para identificar las especies de *Aspergillus,* las que amplificaron adecuadamente.

En este estudio, también para la construcción de la filogenia se tomaron en cuenta las secuencias de referencia RefSeq, ya que el GenBank es un archivo público de bases de datos, lo que significa que acepta todas las secuencias y no siempre se pueden verificar los nombres taxonómicos atribuidos a las mismas. Al llevar a cabo una búsqueda en el BLAST, a menudo se obtienen secuencias erróneamente identificadas en la base de datos, por lo que se ha llevado a cabo la limpieza de secuencias mal identificadas depositadas en el GenBank y estas secuencias verificadas son resguardadas en el RefSeq (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/). En esta base de datos se encuentran las secuencias *ITS* y secuencias representativas de *BenA* y *RPB2*.[173] El no contar con secuencias verificadas y disponibles en las

bases de datos fue una limitante, puesto que no fue posible definir correctamente en algunos casos las especies del género *Aspergillus.*

La construcción filogenética con el gen *ActA* a través de Máxima Verosimilitud e Inteferencia Bayesiana mostró concordancia en la topología de los árboles. De los 29 aislados identificados fenotípicamente como *Aspergillus* sección *Fumigati*, solo 24 aislados fueron tipificados como *A. fumigatus* al asociarse con la secuencia de referencia obtenida del GenBank, no obstante que se incluyeron secuencias de referencia de otras especies de la sección. Por otro lado, de los 42 aisaldos identificados fenotípicamente como *Aspergillus* sección *Nigri*, solo 38 aislados fueron tipificados dentro de la sección *Nigri,* 14 se asociaron con la secuencia de referencia de *A. niger* obtenida del GenBank; el resto de los aislados no pudo ser identificado a nivel de especie ya que no hay secuencias reportadas de otras especies de la sección *Nigri* amplificadas con este gen. Asimismo, en otro grupo identificado previamente como sección *Flavi* no se pudo identificar ninguna especie de esta sección por no encontrarse niguna secuencia de referencia con este gen en el GenBank (Figuras 15 y 16).

De igual forma, cuando se llevó a cabo la construcción filogenética con el gen *BenA* a través de Máxima Verimilitud e Inteferencia Bayesiana, también se encontró concordancia en la topología de los árboles. De los 24 aislados identificados como *A. fumigatus* sección *Fumigati*, todos fueron identificados como *A. fumigatus*, observándose un mejor agrupamiento con Inferencia Bayesiana, de los 29 aislados identificados fenotípicamente como *Aspergillus* sección *Fumigati,* estos métodos solo agruparon 24 secuencias de *A. fumigatus* con la secuencia de referencia del

GenBank. Con Máxima Verosimilitud se formaron dos subgrupos, uno con 23 secuencias, las cuales se agruparon con la secuencia de referencia y el otro relacionada con este grupo. Por otro lado, de los 42 aislados identificados fenotípicamente como *Aspergillus* sección *Nigri*, solo 38 aislados se tipificaron como sección *Nigri* de los que 14 se asociaron con la secuencia de referencia de *A. niger* obtenida del GenBank, los restantes se asociaron con las secuencias de referencia de *A. tubingensis*. Asimismo, en otro grupo de 14 aislados identificados previamente como sección *Flavi,* todos se asociaron con la secuencia de referencia de *A. flavus* obtenida del GenBank. Finalmente, un aislado identificado previamente dentro de la sección *Flavi* se agrupó con una secuencia de referencia que corresponde a *A. westerdijkise,* especie que pertenece a la sección *Circundanti* (Figuras 17 y 18).

Objetivo 3: "Determinar la actividad elastasa e identificar los genotipos *MAT1-1* y *MAT1-2* de los aislados obtenidos de *A. fumigatus* para establecer su relación con la AI"

Otro aspecto que se analizó en este estudio fue identificar los genotipos *MAT1-1* y *MAT1-2* de los aislados identificados como *A. fumigatus* y su actividad de elastasa, para establecer su relación con la aspergilosis invasiva; los trabajos experimentales llevados a cabo para relacionar la ocurrencia del tipo sexual con la patogenicidad en *A. fumigatus* son escasos.[107,108] Además, ninguno de éstos ha considerado la identificación taxonómica del hongo, lo cual resulta inquietante, porque *A. fumigatus* es en realidad un complejo de especies, cuyos miembros poseen morfología similar, pero presentan diferente patogenicidad y perfiles particulares de susceptibilidad a los antifúngicos.[34,44,174,175] Para la determinación del índice de

actividad de elastasa, en el presente estudio se utilizó el medio de cultivo descrito por Kothary et al.[122] quienes fueron los primeros en evaluar la producción de elastasa de *A. fumigatus* en un modelo murino.[122] Inicialmente, se constató que el rosa de bengala contenido en el medio limitara el rápido crecimiento del hongo y permitiera monitorear su desarrollo por más de siete días, como reportaron Kothary et al.[122]. Estos autores realizaron curvas de crecimiento y confirmaron la reducción en el crecimiento del hongo en los medios que contenían el colorante, permitiendo realizar el monitoreo por más de diez días, a diferencia de lo que se observó en medio Sabouraud, donde el desarrollo de las colonias fue dentro de los primeros cinco días de incubación.[1]

Por otro lado, se esperaba que la tasa de crecimiento de los aislados en el medio de Kothary et al.[122] fuera similar en agar Sabouraud con rosa de bengala; sin embargo, el crecimiento fue aún más lento, lo que permitió evaluar el índice de actividad de elastasa hasta los 10 días de incubación. Esto podría deberse a que los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati* no asimilan rápidamente la elastina y requieren de mayor tiempo para expresar la actividad proteolítica y así degradar el principal sustrato del medio, razón por la cual en otros estudios evalúan la actividad de elastasa durante 15 días.[108,109,116] Durante la estandarización de la metodología para la determinación del índice de actividad de elastasa, también se tomó en cuenta que la elastina se degrada a elevadas temperaturas. En algunos estudios, el medio se esterilizó en autoclave sin considerar la posible desnaturalización de la proteína, de manera que no se podía determinar con certeza si el halo de degradación se debía a la actividad de elastasa o a otras proteasas que pudieran haber sido activadas por la degradación de la elastina durante la esterilización.[122]

Asimismo, aunque se trató de un modelo *in vitro*, se procuró que las condiciones en el experimento fueran similares a las de una infección por *A. fumigatus* a nivel fisiológico, por esto se probó el medio preparado con amortiguador de boratos y de fosfatos, manteniendo la misma concentración y pH.[176,178] La producción del halo de degradación fue más evidente en el medio preparado con el amortiguador de fosfatos, en comparación con el de boratos, aun cuando la actividad enzimática óptima de la elastasa está reportada en éste último.[178] Esta diferencia pudiera atribuirse al hecho de que en este trabajo se evaluó la actividad producida por un microorganismo al momento de cultivarlo en presencia del sustrato y no a partir de la enzima purificada, como reporta Shotton[178].

Durante la estandarización, se incluyó un aislado de *A. niger* como testigo negativo; sin embargo, se observó decoloración tanto del medio de Kothary et al.[122] como del medio que sólo contenía rosa de bengala. Esto puede explicarse, ya que se ha reportado la actividad de elastasa en aislados de *A. niger*,[123] o a que probablemente el hongo puede estar utilizando el rosa de bengala como nutrimento o secreta alguna sustancia al medio que propicie la decoloración y genere resultados falsos positivos en las lecturas. Por estas razones, se descartó la utilización de este hongo como testigo negativo.

La actividad de elastasa en algunos de los aislados de *A. fumigatus,* mostró valores altos, sin embargo, de acuerdo con lo reportado en estudios previos,[108.109] se esperaba que todos los aislados presentaran valores bajos. No obstante, no se puede afirmar que los aislados ambientales, que presentaron poca o nula actividad de elastasa no sean patógenos, pues se ha visto que aun cuando los aislados de *Aspergillus* carecen de la actividad de elastasa, son capaces de colonizar los

tejidos, y que, después de inoculaciones sucesivas, la actividad de elastasa aumenta debido a una adaptación del hongo a las condiciones del medio donde se desarrolla.[110]

Cuando se determinó el genotipo *MAT* de los aislados de *A. fumigatus* sección *Fumigati*, se observó que el genotipo *MAT1-1* fue predominante. Ello concuerda con lo descrito por Álvarez-Pérez et al.[108] quienes observaron una mayor proporción de aislados *MAT1-1* en casos de AI en comparación con los obtenidos de otras fuentes, sugiriendo la posible asociación entre el genotipo sexual y la invasividad de los aislados. Estos autores, también mencionan que la distribución de ambos genotipos sexuales (*MAT1-1* y *MAT1-2*) es similar en muestras procedentes de procesos no invasivos y del ambiente; sin embargo, en las muestras ambientales evaluadas en el presente estudio, el genotipo *MAT1-1* prevaleció sobre el genotipo *MAT1-2*. Estos resultados también contrastan con lo reportado por Paoletti et al.[105] quienes encontraron que la frecuencia del genotipo *MAT1-1* en aislados clínicos fue similar al de los ambientales, mientras que Bain et al.[106] reportaron una mayor frecuencia del genotipo *MAT1-2* en aislados clínicos.

Cuando se analizó si existía correlación entre el genotipo sexual y la actividad de elastasa de los aislados de *A. fumigatus*, no se encontró que el genotipo *MAT1-1* se asociara con valores altos de índice de actividad de elastasa, como ha sido reportado en la literatura.[108,179] Esto pudiera deberse a que en los pocos trabajos reportados anteriormente, la identificación del hongo no se realizó por métodos moleculares, lo que deja en duda si esta relación entre el genotipo sexual y la actividad de elastasa corresponde realmente a *A. fumigatus* o a alguna de las otras especies dentro de la sección *Fumigati.*

Objetivo 4: "Estudiar la variabilidad genotípica de aislados ambientales de *A. fumigatus*, a través del microsatélite *CSP*"

Finalmente, para examinar los mecanismos de los brotes nosocomiales y para conocer mejor el alcance de la diversidad entre aislados, las relaciones entre aislados clínicos y ambientales, y los patrones de colonización e infección invasiva en pacientes, se requiere de técnicas de tipificación reproducibles y estables. Sin embargo, la aplicación de una amplia variedad de técnicas no estandarizadas en estudios de epidemiología molecular de *A. fumigatus* han conducido a la imposibilidad de comparar datos en diferentes regiones geográficas. Poco se sabe sobre estos aspectos en las poblaciones de *A. fumigatus* en México, o las similitudes y diferencias entre aislados de este país y los de otras zonas del mundo. La tipificación con *CSP* es una estrategia que supera muchos de los problemas relativos a la comparación de datos. Esta técnica es altamente reproducible y estable, y su poder discriminatorio es intermedio a la tipificación MLST y *STRAf*, haciendo su uso ideal como un método de primera línea para la tipificación de aislamientos de *A. fumigatus* y la determinación de relaciones a nivel de subpoblación.[106,132,133,180] Klaassen et al.,[132] propusieron una nomenclatura estandarizada para el sistema de tipificación *CSP*, utilizado con gran éxito en cepas de *Staphylococcus aureus*,[181,132,133] que simplificó en gran medida el reconocimiento y la comunicación de datos de tipo *CSP*. Kidd et al.[133] aplicaron la tipificación de *CSP* en aislamientos australianos de *A. fumigatus*, identificaron otros tipos de *CSP* y recomendaron una serie de modificaciones a la nomenclatura de tipificación.[133] En otro estudio realizado en China,[134] se encontraron cinco variantes *CSP* que no se observaron en estudios anteriores .[131,132] Actualmente, la

tipificación con *CSP* se ha utilizado para describir aislados de Australia, Norteamérica, Países Bajos y China y el número total de variantes *CSP* corresponde a 27. El presente estudio representa la primera investigación de tipificación molecular de aislamientos de *A. fumigatus* procedentes de México, utilizando esta nomenclatura. Esta técnica se aplicó con éxito para todos los aislados en este estudio, confirmando su utilidad, así como la aplicación de la nomenclatura de tipificación *CSP* para comparar con otros laboratorios. No se identificaron nuevas variantes; los tipos *CSP* que se encontraron fueron t01, t02, t03, t04A y t10. El reconocimiento de estos tipos de *CSP* en diferentes países es de gran importancia, ya que ayudará a mantener la nomenclatura estandarizada utilizada para los tipos de *CSP* y facilitará la comprensión de la diversidad genética de *A. fumigatus*. En nuestro estudio, en la tabla 16 se muestra que el tipo *CSP* más común fue el t04A, lo que concuerda con lo reportado por Kidd et al.[133] en aislados ambientales. Por otro lado, los tipos de *CSP* que no se observaron en los dos hospitales de México tuvieron una prevalencia relativamente baja en otras investigaciones[132] y su ausencia en el presente estudio puede ser un reflejo del tamaño de la muestra.

9. CONCLUSIONES

Objetivo 1: "Aislar hongos ambientales en diferentes áreas de dos hospitales, ubicados en el centro y norte de la Ciudad de México"

- La riqueza y abundancia fúngica en el aire en dos hospitales de la Ciudad de México fue similar, destacando *Aspergillus* sección *Fumigati*, grupo de

hongos filamentosos cuyos miembros son los principales responsables de la aspergilosis invasiva en todo el mundo.

- La diversidad de los hongos aislados fue mayor en los distintos sitios de muestreo de la institución hospitalaria 1, en comparación con los de la institución 2.

Objetivo 2: "Identificar y caracterizar *Aspergillus* spp. por métodos fenotípicos (termotolerancia, tamaño de conidios y vesículas) y moleculares (genes *BenA* y *ActA*)"

- Los métodos fenotípicos sólo permitieron identificar los diferentes aislados del género *Aspergillus* a nivel de sección.
- De acuerdo con la termotolerancia, los aislados de la única sección de *Aspergillus* que tuvieron una tasa de crecimiento a 50 °C en ambas instituciones hospitalarias, pertenecieron a *Fumigati.*
- El tamaño de conidios y vesículas coincidió con lo reportado para las diferentes secciones del género *Aspergillus.*
- Los métodos genotípicos permitieron la identificación y agrupación de las especies en las diferentes secciones de *Aspergillus.*
- La topología del árbol obtenido con las secuencias del gen codificador de la ß-tubulina (*BenA)* mostró la mejor la agrupación para la identificación de las especies de *Aspergillus*.

Objetivo 3: "Determinar la actividad elastasa e identificar los genotipos *MAT1-1* y *MAT1-2* de los aislados obtenidos de *A. fumigatus* para establecer su relación con la AI"

- En los aislados de *A. fumigatus* el genotipo sexual *MAT1-1* fue el que predominó.
- El genotipo *MAT1-1* no correlacionó con los índices de actividad de elastasa ≥1 en los aislados estudiados.

Objetivo 4: "Estudiar la variabilidad genotípica de aislados ambientales de *A. fumigatus*, a través del microsatélite *CSP*"

- No se identificaron nuevas variantes de los tipos *CSP* reportados previamente en *A. fumigatus*.
- El método de tipificación reportado por Klaassen et al. fue útil en la tipificación de los aislados ambientales de *A. fumigatus* procedentes de México.
- El tipo *CSP* más frecuente en los aislados hospitalarios de *A. fumigatus* fue el t04A.

10. IMPLICACIONES

Objetivo 1: "Aislar hongos ambientales en diferentes áreas de dos hospitales, ubicados en el centro y norte de la Ciudad de México.

La identificación de hongos ambientales presentes en las instituciones hospitalarias es de gran relevancia, ya que la mayoría pueden ser potencialmente patógenos, particularmente en pacientes que se encuentran en las unidades de cuidados intensivos y en hematología. Destacan aquéllos hongos que representan una

amenaza mayor, como las especies del género *Aspergillus,* de manera que estas áreas deben ser monitoreadas con el fin de tomar medidas encaminadas en reducir sustancialmente la morbilidad, la mortalidad y los altos costos de servicios hospitalarios.

Objetivo 2: "Identificar y caracterizar *Aspergillus* spp. por métodos fenotípicos (termotolerancia, tamaño de conidios y vesículas) y moleculares (genes *BenA* y *ActA*)".

El estudio filogenético realizado con los dos marcadores moleculares (*BenA* y *ActA*) contribuyó con la resolución de las relaciones filogenéticas entre los diferentes aislados de *Aspergillus*. También se confirmó que los análisis con base en un solo gen no resuelven todas las ambigüedades y no siempre representan la historia evolutiva de la especie; por lo tanto, la combinación de información de secuencias de diferentes genes resuelve varias circunscripciones y relaciones de especies de *Aspergillus* dentro de diferentes secciones, y demuestra las ventajas de este enfoque multigénico. Además, hay que tomar en cuenta que, debido a la diversidad del género, los marcadores moleculares propuestos para la identificación de especies pueden o no funcionar en aislados procedentes de diferentes áreas geográficas.

Objetivo 3: "Determinar la actividad elastasa e identificar los genotipos *MAT1-1* y *MAT1-2* de los aislados obtenidos de *A. fumigatus* para establecer su relación con la AI".

El genotipo sexual *MAT1-1* relacionado con la aspergilosis invasiva no correlacionó con los índices altos de actividad de elastasa en los aislados estudiados; esto se debe probablemente a que el tamaño de muestra no fue significativo o que el

genotipo *MAT* y la elastasa funcionen independientemente en la patogenicidad del hongo.

Objetivo 4: "Estudiar la variabilidad genotípica de aislados ambientales de *A. fumigatus*, a través del microsatélite *CSP*".

Se confirmó y validó la utilidad de la tipificación de los aislados ambientales de *A. fumigatus* procedentes de México con el marcador microsatélite *CSP*. El tipo *CSP* más frecuente fue el t04A. La ampliación de este estudio hacia aislados procedentes de otras áreas geográficas de México permitirá tener una visión más precisa del intervalo de tipos *CSP* y su prevalencia en esta región. Estos resultados serán depositados en un banco de datos de tipos *CSP* con el fin de definir los tipos prevalentes en cada país y establecer diferencias filogeográficas entre las poblaciones de *A. fumigatus* de México, Europa, Asia y Norteamérica, así como para examinar la estructura de la población en diferentes regiones.

11. APORTACIONES

El presente estudio es el primero en realizarse en México para registrar la presencia de *Aspergillus* spp. en ambientes nosocomiales, y sienta las bases para generar protocolos más rigurosos de seguridad a los pacientes.

La tipificación molecular permitió identificar especies de *Aspergillus* no reportadas en México como *A. tubingensis* y *A. westerdijkiae.*

Se evidenció la presencia de *A. fumigatus* en ambientes nosocomiales con genotipo *MAT*1-1 que se relaciona con la aspergilosis invasiva.

Se reportaron los primeros tipos de *CSP* de aislados de *A. fumigatus* en ambientes nosocomiales de México.

12. REFERENCIAS

1. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12(2): 310-350.

2. Latgé J. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol 2001; 9 (8): 382-389.

3. Brookman JL, Denning DW. Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. Curr Op Microbiol 2000; 3(5): 468-474.

4. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002 ; 21(3) : 161-172.

5. Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26(4): 781-803; quiz 804-805

6. Ribaud P, Chastang C, Latgé JP, Baffroy-Lafitte L, Natquet N, Devergie A, Espérou H, Sélimi F, Rocha V, Derouin F, Socié G, Gluckman E. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. Clin Infect Dis 1999; 28(2): 322-330.

7. Stevens DA, Kan VL, Judson MA, Morrison VA, Dummer S, Denning DW, Bennett JE, Walsh TJ, Patterson TF, Pankey GA. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2000; 30(4): 696-709.

8. Kontoyiannis D, Bodey G. Invasive aspergilosis in 2002: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21(3): 161-172.

9. Cornet M, Fleury L, Maslo C, Bernard JF, Brucker G**;** Invasive Aspergillosis Surveillance Network of the Assistance Publique-Hopitau de Paris.

Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. J Hosp Infect 2002; 51(4): 288-296.

10. Denning DW. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1996; 23(3): 608-615.

11. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis 2001; 32(3): 358-366.

12. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. Clin Microbiol Rev 2005; 18(1): 44-69

13. Denning DW, O'Driscoll BR, Hogaboam CM, Bowyer P, Niven RM. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. Eur Respir J 2006; 27(3): 615-626

14. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology 2007: 153(Pt 6): 1677-1692.

15. Bodey GP, Vartivarian S. Aspergillosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8(5): 4130-437.

16. Denning DW. *Aspergillus tracheobronchitis*. Clin Infect Dis 1994; 19(6): 1176-1177.

17. Aisner J, Schimpff SC, Bennett JE, Young VM, Wiernik PH. *Aspergillus* infections in cancer patients: association with fire proofing materials in a new hospital. JAMA 1976; 235(4): 411-412.

18. Arnow PM, Andersen RL, Mainous PD, Smith EJ. Pulmonary aspergillosis during hospital renovation. Am Rev Respir Dis 1978; 118(1): 49-53.

19. Arnow PM, Sadigh M, Costas C, Weil D, Chudy R. Endemic and epidemic aspergillosis associated with in-hospital replication of *Aspergillus* organisms. J Infect Dis 1991; 164(5): 998-1002.

20. Sherertz RJ, Belani A, Kramer BS, Elfenbein GJ, Weiner RS, Sullivan ML, Thomas RG, Samsa GP. Impact of air filtration onnosocomial *Aspergillus* infection. Unique risk of bone marrow transplant recipients. Am J Med 1987; 83(4): 709-718.

21. Barnes RA and Rogers TR. Control of an outbreak of nosocomial aspergillosis by laminar air-flow isolation. J Hosp Infect 1989; 14(2): 89-94.

22. Walsh TJ, Dixon DM. Nosocomial aspergillosis: environmental microbiology, hospital epidemiology, diagnosis and treatment. Eur J Epidemiol 1989; 5(2): 131-142.

23. Patterson JE, Zidouh A, Miniter P, Andriole VT, Patterson TF. Hospital epidemiologic surveillance for invasive aspergillosis: patient demographics and the utility of antigen detection. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18(2): 104-108.

24. Iwen P, Reed EC, Armitage JO, Bierman PJ, Kessinger A, Vose JM, Arneson MA, Winfield BA, Woods GL. Nosocomial invasive aspergillosis in lymphoma patients treated with bone marrow or peripheral stem cell transplants. Infect. Control Hosp Epidemiol 1993; 14(3): 131-139.

25. Iwen PC, Davis JC, Reed EC, Winfield BA, Hinrichs SH. Airborne fungal spore monitoring in a protective environment during hospital construction, and correlation with an outbreak of invasive aspergillosis. Infect Control Hosp Epidemiol 1994; 15(5): 303-306.

26. Rogers TR. Epidemiology and control of nosocomial fungal infections. Curr Opin Infect Dis 1995; 8(4): 287-290.

27. Buffington J, Reporter R, Lasker BA, McNeil MM, Lanson JM, Ross LA, Mascola L, Jarvis W R. Investigation of an epidemic of invasive aspergillosis: utility of molecular typing with the use of random amplified polymorphic DNA probes. Pediatr Infect Dis J 1994; 13(5): 386-393.

28. Lin DM, Lehmann PF, Hamory BH, Padhye AA, Durry E, Pinner RW, Lasker BA. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 1995; 33(6): 1596-1601.

29. Leenders A, Van Belkum A, Janssen S, De Marie S, Kluytmans J, Wielenga J, Lowenberg B, Verbrugh H. Molecular epidemiology of apparent outbreak of invasive aspergillosis in an hematology ward. J Clin Microbiol 1996; 34(2): 345-351.

30. Debeaupuis J P, Sarfati J, Chazalet V, Latgé JP. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun 1997; 65(8): 3080-3085.

31. Griffiths WD, DeCosemo GAL. The assesment of bioaerosols-A critical review. J Aerosol Sci 1994; 25(8): 1425-1458.

32. McDevitt JJ, Lees PS, Merz WG, Schwab KJ. Development of a method to detect and quantify *Aspergillus fumigatus* conidia by quantitative PCR for environmental air samples. Mycopathologia 2004; 158(3): 325-335.

33. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S,

Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol 2014; 78: 141-173.

34. Fernandez-Molina JV, Abad-Diaz-de-Cerio A, Sueiro-Olivares M, Pellon A, Ramirez-Garcia A, Garaizar J, Pemán J, Hernando FL, Rementeria A. Rapid and specific detection of section *Fumigati* and *Aspergillus fumigatus* in human samples using a new multiplex real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis 2014; 80(2): 111-118.

35. Frisvad JC. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. Front Microbiol 2015; 5: 773. doi 10.3389/fmicb.2014.00773.

36. Frisvad JC, Larsen TO. Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and other pathogenic species in *Aspergillus* section *Fumigati*. Front Microbiol 2016; 6: 1485. doi: 10.3389/fmicb.2015.01485.

37. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore. 1965; pp. 1-686.

38. Gams W, Christensen M, Onions AH, Pitt JI, Samson RA. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Samson RA, Pitt JI, eds. New York: Plenum Press: 1985; 55-62.

39. Peterson SW. Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia 2008; 100(2): 205-226.

40. Houbraken J, Vries RP de, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Adv Appl Microbiol 2014; 86: 199-249

41. Samson RA, Varga J. Molecular Systematics of *Aspergillus* and its Teleomorphs. In: *Aspergillus*: Molecular Biology and Genomics. M. Machida & K. Gomi, Eds. 2010: pp.19-40.

42. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 3rd ed. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center 2011.

43. Piontelli EL. Agentes comunes en las aspergilosis humanas: conceptos primarios en la diferenciación de sus complejos de especies. Bol Micol 2014; 29(2): 63-100.

44. Samson RA, Varga J, Witiak SM, Geiser DM. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. Stud Mycol 2007; 59: 71-73.

45. Samson R, Hong S, Peterson S, Frisval J, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. Stud Mycol 2007; 59: 147-203.

46. Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G, Samson RA. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. Stud Mycol 2011; 69(1): 1-17.

47. Varga J, Tóth B, Kocsubé S, Farkas B, Szakács G, Téren J, Kozakiewicz Z Evolutionary relationships among *Aspergillus terreus* isolates and their relatives. Antonie Van Leeuwenhoek 2005; 88(2): 141-150.

48. Balajee SA. *Aspergillus terreus* complex. Med Mycol 2009; 47 (Suppl 1): S42-S46.

49. Balajee SA, Baddley JW, Peterson SW, Nickle D, Varga J, Boey A, Lass-Flörl C, Frisvad JC, Samson RA; ISHAM Working Group on *A. terreus*.

Aspergillus alabamensis, a new clinically relevant species in the section *Terrei*. Eukaryot Cell 2009a; 8(5): 713-722.

50. Buzina W. *Aspergillus*--Classification and antifungal susceptibilities. Curr Pharm Des 2013; 19(20): 3615-3628.

51. Peterson SW, Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. In: Varga J, Samson RA. Eds. *Aspergillus* in the genomic era: 33-56. Wageningen: Wageningen Academic Publishers 2008a.

52. Varga J, Frisvad JC, Samson RA. *Aspergillus* sect *Aeni* sect. nov., a new section of the genus for *A. karnatakaensis* sp. nov. and some allied fungi. IMA Fungus 2010; 1(2): 197-205.

53. Frisvad JC, Samson RA. *Emericella venezuelensis,* a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B1. Syst Appl Microbiol 2004; 27(6): 672-680.

54. Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, Meijer M, Noonim P, Mahakarnchanakul W, Samson RA. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products**.** Stud Mycol 2007; 59: 53-66.

55. Pointing, SB, Hyde, KD. Bio-exploitation of Filamentous Fungi. Fungal Diversity Press, Hong Kong 2001: pp. 223-251.

56. Oelofse D, Dubery IA, Meyer R, Arendse MS, Gazendam I, Berger DK. Apple polygalacturonase inhibiting protein1 expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. Phytochemistry 2006; 67(3): 255-263.

57. Vanden Bossche, H. *Aspergillus* and Aspergillosis. Hardback, New York, EEUU. 1988. pp. 23.

58. Kradin RL, Mark EJ. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. Arch Pathol Lab Med 2008; 132(4): 606-614.

59. O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature 2009; 457(7228): 471-474.

60. Index Fungorum. An online database currently coordinated and supported by CABI Bioscience, CBS and Landcare Research [base de datos en línea; consultada el 13-10-2009]: Disponible en: http://www.speciesfungorum.org.

61. Sugui JA, Vinh DC, Nardone G, Shea YR, Chang YC, Zelazny AM, Marr KA, Holland SM, Kwon-Chung KJ. *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an emerging agent of aspergillosis: how different is it from *Aspergillus fumigatus*? J Clin Microbiol 2010; 48(1): 220-228.

62. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. Eukaryot Cell 2006; 5(10): 1705-1712.

63. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(4): 1244-1251.

64. Varga J, Houbraken J, Van Der Lee HA, Verweij PE, Samson RA. *Aspergillus calidoustus* sp. nov. causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus.* Eukaryot Cell 2008; 7(4): 630-638.

65. Bohekout T, Gueidan C, de Hoog S, Samson R, Varga J, Walther G. Fungal taxonomy: New developments in medically important fungi. Curr Fungal Infect Rep 2009; 3(3): 170-178.

66. De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 3rd ed. Utrecht: Cetraaalbureau voor Schimmelcultures; 2009. CD-ROM version; 2009.

67. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. J Hosp Infect 2006; 63(3): 246-254.

68. Ponton J, Cabanes FJ. *Aspergillus* and nosocomial aspergillosis. Rev Iberoam Micol 2000; 17(3): S77-S78.

69. Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. Infect Dis Clin 2002; 16(4): 875-894.

70. Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Konotoyiannis DP, Walsh TJ, Fridkin SK, Pappas PG, Warnock DW. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. Med Mycol 2005; 43(suppl 1): S49-S58.

71. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: Spectrum of disease, diagnosis and treatment. Infect Clin Dis North Am 2006; 20(3): 545-561.

72. Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: Epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. Drugs 2007; 67(11): 1567-1601.

73. Galimberti R, Torre AC, Baztán MC, Rodríguez-Chiappetta F. Emerging systemic fungal infections. Clin Dermatol 2012; 30(6): 633-650.

74. Arenas R. Micología Médica Ilustrada 5a ed. México. McGraw-Hill (2014). pp. 293.

75. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberg P, Judson MA, Denning DW, Crameri R, Brody AS, Light M, Skov M, Maish W, Mastella G. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis-state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. Clin Infect Dis 2003; 37(Suppl 3): S225-S264.

76. Tillie-Leblond I, Tonnel AB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Allergy 2005; 60(8): 1004-1013.

77. Schmiedel Y, Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergilosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis* pneumonia. Swiss Med Wkly 2016; 146: w14281.

78. Restrepo-Gualteros SM, Jaramillo-Barberi LE, Rodríguez-Martínez CE, Camacho Moreno G, Niño G. Aspergillosis pulmonar invasiva: Reporte de un caso. Biomédica 2015; 35(2): 171-176.

79. Lee SH, Lee BJ, Jung DY, Kim JH, Sohn DS, Shin JW, Kim JY, Park IW, Choi BW. Clinical manifestations and treatment outcomes of pulmonary aspergilloma. Korean J Intern Med 2004; 19(1): 38-42.

80. Prasanna S, Grover N, Bhatt P, Sahni AK. A case of *Aspergillus nidulans* causing white granule mycetoma. Med J Armed Forces India. 2016; 72(1): 88-90.

81. Ahmed SA, Abbas MA, Jouvion G, Al-Hatmi AM,de Hoog GS, Kolecka A, Mahgoub el S. Seventeen years of subcutaneous infection by *Aspergillus*

flavus; eumycetoma confirmed by immunohistochemistry. Mycoses 2015; 58(12): 728-734.

82. Babamahmoodi F, Shokohi T, Ahangarkani F, Nabili M, Ashkezari EA, Alinezhad S. Rare case of *Aspergillus ochraceus* osteomielitis of calcaneus bone in a patient with diabetic foot ulcers. Case Rep Med 2015. doi:10.1155/2015/509827.

83. Ramos S, Méndez E, Labat A, Peyré A, de Anda G, Puig R, Mandressi L, López J. Úlceras de pierna: causas infrecuentes. Rev Med Urug 2001; 17: 33-41.

84. Manikandan P, Varga J, Kocsubé S, Revathi R, Anita R, Dóczi I, Németh TM, Narendran V, Vágvölgyi C, Bhaskar M, Manoharan C, Samson RA, Kredics L. Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports. J Med Case Rep 2010; 4: 68.

85. Demir T, Ergenoglu MU, Ekinci A, Tanrikulu N, Sahin M, Demirsoy E. *Aspergillus flavus* endocarditis of the native mitral valve in a bone marrow transplant patient. Am J Case Rep 2015; 16: 25-30.

86. Pongbhaesaj P, Dejthevaporn C, Tunlayadechanont S, Witoonpanich R, Sungkanuparph S, Vibhagool A. Aspergilosis of the central nervous system: Catastrophic oportunistic infection. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2004; 35(1): 119-125.

87. Wang RX, Zhang JT, Chen Y, Huang XS, Jia WQ, Yu SY. Cerebral aspergillosis: a retrospective analysis of eight cases. Int J Neurosci 2016; 127(4): 339-343.

88. Mylonakis E, Paliou M, Sax PE, Skolnik PR, Baron MJ, Rich JD. Central nervous sistem aspergillosis in patients with human immunodeficiency virus infection. Report of 6 cases and review. Medicine (Baltimore) 2000; 79(4): 269-280.

89. Kleinschmidt-DeMasters BK. Central nervous system aspergillosis: a 20-year retrospective series. Hum Pathol 2002; 33(1): 116-124.

90. Vergara GE, Roura N, del Castillo M, Mora A, Alcorta SC, Mormandi R, Cervio A, Salvat J. Aspergilosis cervical con diseminación al sistema nervioso central. Presentación de un caso y revisión de bibliografía. Surg Neurol Int 2015; 6(suppl 20): S524-S529.

91. Martínez E, Tejada D, Arroyo S, Porras F, Arenas R. Onychomycosis due to opportunistic molds. An Bras Dermatol 2015; 90(3): 334-337.

92. Tsang CC, Hui TWS, Lee KC, Chen JHK, Ngan AHY, Tam EWT, Chan JFW, Wu AL, Cheung M, Tse BPH, Wu AKL, Lai CKC, Tsang DNC, Que TL, Lam CW, Yuen KY, Lau SKP, Woo PCY. Genetic diversity of *Aspergillus* species isolated from onychomycosis and *Aspergillus hongkongensis* sp. Nov. with implications to antifungal susceptibility testing. Diagnost Microb Infec Dis 2016; 84(2): 125-134.

93. Nouripour-Sisakht S, Mirhendi H, Shidfar MR, Anmadi B, Rezael-Matehkolaei A, Geramishoar M, Zarei F, Jalalizand N. *Aspergillus* species as emerging causative agents of onychomycosis. J Mycol Med 2015; 25(2): 101-107.

94. Del Palacio A, Pazos C, Cuétara S. Onicomicosis por hongos filamentosos no dermatofitos. Enferm Infec Microbiol Clin 2001; 19(9): 439-442.

95. Kotwal A, Biswas D, Kakati B, Roy S, Chauchan BS. *Aspergillus nidulans* causing primary cutaneous aspergillosis in an immunocompetent patient. Cutis 2015; 95(1): E1-E3.

96. Rogdo B, Kahlert C, Diener PA, Micallef J. Primary cutaneous aspergillosis in a preterm neonate. BMJ Case Rep 2014. doi:10.1136/bcr-2014-204752.

97. Keating MR, Guerrero MA, Daly RC, Walker RC, Davies SF. Transmission of invasive aspergillosis from a subclinically infected donor to three different organ transplant recipients. Chest 1996; 109(4): 1119-1124.

98. Varga J. Mating type gene homologues in *Aspergillus fumigatus*. Microbiology 2003; 149(Pt 4): 816-819.

99. Turgeon BG, Yoder OC. Proposed nomenclature for mating type of filamentous ascomycetes. Fungal Genet and Biol 2000; 31(1): 1-5.

100. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer PS, Farman M, Fedorova N, Fedorova N, Feldblyum TV, Fischer R, Fosker N, Fraser A, García JL, García MJ, Goble A, Goldman GH, Gomi K, Griffith-Jones S, Gwilliam R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang J, Humphray S, Jiménez J, Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafon A, Latgé JP, Li W, Lord A, Lu C, Majoros WH, May GS, Miller BL, Mohamoud Y, Molina M, Monod M, Mouyna I, Mulligan S, Murphy L, O'Neil S, Paulsen I, Peñalva MA, Pertea M, Price C, Pritchard BL, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rawlins N, Rajandream MA, Reichard U, Renauld H, Robson GD, Rodriguez de Córdoba S, Rodríguez-Peña JM, Ronning CM, Rutter S, Salzberg SL,

Sanchez M, Sánchez-Ferrero JC, Saunders D, Seeger K, Squares R, Squares S, Takeuchi M, Tekaia F, Turner G, Vazquez de Aldana CR, Weidman J, White O, Woodward J, Yu JH, Fraser C, Galagan JE, Asai K, Machida M, Hall N, Barrell B, Denning DW. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature 2005; 438(7071): 1151-1156.

101. Heitman J. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. Curr Biol 2006; 16(17): R711-725.

102. Fraser JA, Heitman J. Sex, MAT, and the evolution of fungal virulence. En: Heitman J, Filler SG, Edwards JE, Mitchell AP, editores. Molecular principles of fungal pathogenesis. Washington DC: ASM Press; 2006. pp. 13-33.

103. Nielsen K, Heitman J. Sex and virulence of human pathogenic fungi. Adv Genet 2007; 57: 143-73.

104. Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, Allen A, Stajich JE, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. Nature. 2005; 437: 1360–1364.

105. Paoletti M, Rydholm C, Schwier E, Anderson M, Szakacs G, Lutzoni F, Debeaupuis JP, Latgé JP, Denning DW, Dyer PS. Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Curr Biol 2005; 15(13): 1242-1248.

106. Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NAR, Odds FC. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1469-1477.

107. Alvarez-Perez S, Garcia M, Bouza E, Pelaez T, Blanco JL. Characterization of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* from patients: genotype, mating type and invasiveness. Med Mycol 2009; 47(6): 601-608.

108. Alvarez-Perez S, Blanco JL, Alba P, Garcia ME. Mating type and invasiveness are significantly associated in *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol 2010; 48(2): 273-277.

109. Blanco J, Hontecillas R, Bouza E, Blanco I, Peláez T, Muñoz P, Pérez-Molina J, García ME. Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2002; 40(5): 1811-1813.

110. García M, Caballero J, Blanco I, Cruzado M, Costas E y Blanco J. Changes in the elastase activity and colonization ability of *Aspergillus fumigatus* after successive inoculations in mice. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 221-223.

111. Bouchara JP, Tronchin G, Larcher G, Chabasse D. The search for virulence determinants in *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol 1995; 3(8): 327-330.

112. Blanco JL, Guedeja-Marrón J, Caballero J, García ME. Aspergillosis: Mechanisms of pathogenicity implicated and approach to laboratory diagnosis.Rev Iberoam Micol 1998; 15(1): 10-15.

113. Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco A, Bikandi J, Pontón J, Garaizar J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. Rev Iberoam Micol 2005; 22(1):1-23.

114. Nielsen K, Marra RE, Hagen F, Boekhout T, Mitchell TG, Cox GM, Heitman J. Interaction between genetic background and the mating-type locus

in *Cryptococcus neoformans* virulence potential. Genetics 2005; 171(3): 975-983.

115. Abad A, Victoria Fernández-Molina J, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, Hernando FL, Pontón J, Garaizar J, Rementeria A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Rev Iberoam Micol 2010; 27(4): 155-182.

116. Khosravi A, Mahdavi Omran S, Shokri H, Lotfi A, Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis. J Med Mycol 2012; 22(2): 167-172.

117. Tomee JF, Kauffman HF. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. Clin Exp Allergy 2000; 30(4): 476-484.

118. Youngchim S. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. J Med Microbiol 2004; 53(3): 175-181.

119. Tekaia F, Latgé J. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? Curr Opin Microbiol 2005; 8(4): 385-392.

120. Kimbel P. Proteolytic lung damage. Chest 1980; 77(2): 274-276.

121. Modelo B, González A, Monjarás J, González N, Méndez A, Lemus R, Azuara P, Martínez Y, Barrera G, Escamilla M, Rosas R, Paz C, Machado L, Morales J. La importancia de la deficiencia de alfa-1 antitripsina en el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y otras patologías pulmonares. Neumol Cir Tórax 2008; 67(1): 16-23.

122. Kothary M, Chase T, Macmillan J. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. Infect Immun 1984; 43(1): 320-325.

123. Alp S, Arikan S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. J Basic Microbiol 2008; 48(5): 331-337.

124. Staab JF, Balajee SA, Marr KA. *Aspergillus* section *Fumigati* typing by PCR-restriction fragment polymorphism. J Clin Microbiol 2009; 47(7): 2079-2083.

125. Refojo N, Duarte-Escalante E, Dignani MC, Heviaa AI, Abrantes RA, Davel G, Canteros C, Frías-de-León MG, Acosta-Altamirano G, Zúniga G, Reyes-Montes MR. Genotipificación de aislamientos clínicos de *Aspergillus flavus* y su relación con aislamientos ambientales de un centro oncohematológico. Rev Iberoam Micol 2013; 30(1): 25-30.

126. Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Nava Ramírez O, Córdoba S, Refojo N, Arenas R, Delhaes L, Reyes-Montes MR. Population structure and diversity in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolates from different sources and geographic origins. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(3): 427-433.

127. Frías-De León MG, Zavala-Ramírez M, Córdoba S, Zúñiga G, Duarte-Escalante E, Pérez-Torres A, Zepeda-Rodríguez A, López-Martínez I, Buitrago MJ, Reyes-Montes MR. Phenotypic characteristics of isolates of *Aspergillus section Fumigati* from different geographic origins and their relationships with genotypic characteristics. BMC Infect Dis 2011; 11:116.

128. Rydholm C, Szakacs G, Lutzoni F. Low genetic variation and no detectable population structure in *Aspergillus fumigatus* compared to closely related *Neosartorya* species. Eukaryot Cell 2006; 5(4): 650-657.

129. Cuenca-Estrella M, Mellado E. ¿Tienen utilidad las técnicas moleculares para la vigilancia y el control de la aspergilosis? Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21(9): 469-471.

130. Neuveglise C, Sarfati J, Latge J P, Paris S. *Afut1*, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. Nucleic Acids Res 1996; 24(8): 1428-1434.

131. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong S-B, Yaghuchi T, Varga J, Samson RA. *Aspergillus* species identification in the clinical setting**.** Stud Mycol 2007; 59: 39-46.

132. Klaassen CHW, de Valk HA, Balajee SA, Meis JFGM. Utility of CSP typing to sub-type clinical *Aspergillus fumigatus* isolates and proposal for a new CSP type nomenclature. J Microbiol Method 2009; 77(3): 292-296.

133. Kidd SE, Zulkepeli NAAN, Slavin MA, Morrissey CO. Utility of a proposed CSP typing nomenclature for Australian *Aspergillus fumigatus* isolates: Identification of additional CSP types and suggested modifications. J Microbiol Meth 2009; 78: 223-226.

134. Gao LJ, Sun Y, Wan Z, Yu Li R, Yu J. CSP typing of Chinese *Aspergillus fumigatus* isolates: identifi cation of additional CSP types. Medical Mycology 2013; 51(7): 683-687.

135. Riddell RW. Permanent strained mycologycal preparation obtained by slide cultures. Mycologia 1950; 42(2): 265-270.

136. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST, Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electronica 2001; 4(1): 1-9.

137. Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, Navarro-Barranco H, Sousa V, Zúñiga G, Toriello C. Phenotyping and Genotyping of *Sporothrix schenckii* Isolates According to Geographic Origin and Clinical Form of Sporotrichosis**.** J Clin Microbiol 2002; 40(8): 3004–3011.

138. Baranyi J, Roberts TA. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int J Food Microbiol 1994; 23(3-4): 277-294.

139. Williams RH, Ward E and McCartney HA. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for the detection of airborne fungal spores. Appl Environ Microbiol 2001; 67(6): 2453-2459.

140. Calderon C, Ward E, Freeman J, McCartney A. Detection of airborne spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. Aerosol Science 2002; 33(2): 283-296.

141. Carbone I, Kohn LM. A Method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia. 1999; 91(3): 553-556.

142. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol 1995; 61(4): 1323-1330.

143. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol 2013; 30(4): 772-780.

144. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods 2012; 9(8): 772. doi:10.1038/nmeth.2109.

145. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 2016; 33(7): 1870-1874.

146. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2001; 17(8): 754-755. doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754.

147. Balajee SA, Tay ST, Lasker BA, Hurst SF, Rooney AP. Caracterization of a novel gene for strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. Eukaryot Cell 2007; 6(8): 1392.

148. Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DW. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. Embnew News 1997; 4(1): 1-4.

149. Pemán J, Salavert M. Epidemiology and prevention of nosocomial invasive infections by filamentous fungi and yeasts. Enferm Infec Microbiol Clin 2013; 31(5): 328-341.

150. Martins-Diniz JN, da Silva RA, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ. Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit. Rev Saude Publica 2005; 39(3): 398-405.

151. Cordeiro RA, Brilhante RS, Pantoja LD, Moreira Filho RE, Vieira PR, Rocha MF, Monteiro AJ, Sidrim JJ. Isolation of pathogenic yeasts in the air from hospital environments in the city of Fortaleza, northeast Brazil. Braz J Infect Dis 2010; 14(1): 30-34.

152. Ríos-Yuil JM, Arenas R, Fernández R, Calderón-Ezquerro M, Rodriguez-Badillo R. Aeromycological study at the intensive care unit of the “Dr. Manuel Gea Gonzalez” General Hospital. Braz J Infect Dis 2012; 16(5): 432-435.

153. De Rosa FG, Shaz D, Campagna AC, Dellaripa PE, Khettry U, Craven DE. Invasive pulmonary aspergillosis soon after therapy with infliximab, a tumor necrosis factor-alpha–neutralizing antibody: a possible healthcare-associated case? Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24(7): 477-482.

154. Andersen Viable Particle Sampler, Thermo Electron Corporation. Environmental Instruments. Series 10-800. Single stage viable sampler. Instruction manual P/N 100074-00. Massachusetts, USA: Thermo Electron Corporation, 2003. pp. 13.

155. Hao ZF, Ao JH, Hao F, Yang Rong-ya RY, Zhu H, Zhang J. Environment surveillance of filamentous fungi in two tertiary care hospitals in China. Chin Med J (Engl) 2011; 124(13): 1970-1975.

156. Azimi F, Naddafi K, Nabizadeh R, Hassanvand MS, Alimohammadi M, Afhami S, Musavi SN. Fungal air quality in hospital rooms: a case study in Tehran, Iran. J Environ Health Sci Eng 2013; 11(1): 30. doi: 10.1186/2052-336X-11-30.

157. Hoseinzadeh E, Reza Samarghandie M, Ghiasian SA, Alikhani MY, Roshanaie G. Evaluation of bioaerosols in five educational hospitals wards air in Hamedan, during 2011-2012. Jundishapur J Microbiol 2013; 6(6): e10704.

158. Bayry J, Aimanianda V, Guijarro JI, Sunde M, Latgé JP. Hydrophobins-unique fungal proteins. PLoS Pathog 2012; 8(5): 1-4.

159. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*-What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? PLoS Pathog 2013; 9(12): 1-4.

160. Alangaden GJ. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. Infect Dis Clin North Am 2011; 25(1): 201–225.

161. Licorish K, Novey HS, Kozak P, Fairshter RD, Wilson AF. Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol 1985; 76(6): 819–825.

162. Chen BY, Chao HJ, Wu CF, Kim H, Honda Y, Guo YL. High ambient *Cladosporium* spores were associated with reduced lung function in schoolchildren in a longitudinal study. Sci Total Environ 2014; 481: 370-376.

163. Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(3): 461-488.

164. Ryckeboer J, Mergaert J, Coosemans J, Deprins K, Swings J. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. J Appl Microbiol 2003; 94(1): 127-137.

165. Araujo R, Gonçalves-Rodrigues A. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. J Clin Microbiol 2004; 42(9): 4335-4337.

166. Marín S, Sanchis V, Sáenz R, Ramos AJ, Vinas I, Magan N. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. J Appl Microbiol. 1998; 84(1): 25-36.

167. Pitt JI, Samson RA, Frisvad JC. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. RA Samson, JI Pitt (Eds.) Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, Harwood Academic Publishers, Amsterdam (2000), pp. 9-49.

168. 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.

169. Samson RA, Varga J. What is a species in *Aspergillus*? Medical Mycol 2009; 47(Suppl 1): S13–S20.

170. Samson RA, Varga J, Meijer M, Frisvad C. New taxa in *Aspergillus* section *Usti*. Stud Mycol 2011; 69(1): 81-97.

171. Houbraken J, Due M, Varga J, Meijer M, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. Stud Mycol 2007; 59:107-128.

172. Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. Stud Mycol 2007; 59: 75-88.

173. Schoch CL, Robbertse B, Robert V, Vu D, Cardinali G, Irinyi L, Meyer W, Nilsson RH, Hughes K, Miller AN, Kirk PM, Abarenkov K, Aime MC, Ariyawansa HA, Bidartondo M, Boekhout T, Buyck B, Cai Q, Chen J, Crespo A, Crous PW, Damm U, De Beer ZW, Dentinger BT, Divakar PK, Dueñas M, Feau N, Fliegerova K, García MA, Ge ZW, Griffith GW, Groenewald JZ, Groenewald M, Grube M, Gryzenhout M, Gueidan C, Guo L, Hambleton S, Hamelin R, Hansen K, Hofstetter V, Hong SB, Houbraken J, Hyde KD, Inderbitzin P, Johnston PR, Karunarathna SC, Kõljalg U, Kovács GM, Kraichak E, Krizsan K, Kurtzman CP, Larsson KH, Leavitt S, Letcher PM, Liimatainen K, Liu JK, Lodge DJ, Luangsa-ard JJ, Lumbsch HT, Maharachchikumbura SS, Manamgoda D, Martín MP, Minnis AM, Moncalvo

JM, Mulè G, Nakasone KK, Niskanen T, Olariaga I, Papp T, Petkovits T, Pino-Bodas R, Powell MJ, Raja HA, Redecker D, Sarmiento-Ramirez JM, Seifert KA, Shrestha B, Stenroos S, Stielow B, Suh SO, Tanaka K, Tedersoo L, Telleria MT, Udayanga D, Untereiner WA, Diéguez Uribeondo J, Subbarao KV, Vágvölgyi C, Visagie C, Voigt K, Walker DM, Weir BS, Weiß M, Wijayawardene NN, Wingfield MJ, Xu JP, Yang ZL, Zhang N, Zhuang WY, Federhen S. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. Database (Oxford). 2014; 30 doi: 10.1093/database/bau061.

174. Giray B, Kocaögüt E, Ucar F, Haliki-UztanA. Genotypic discrimination of *Aspergillus fumigatus* strain from related species within section *Fumigati*. Ann Agric Env iron Med 2016; 23(3): 448-451.

175. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(4): 1244-1251.

176. Macarulla J, Goñi F. Bioquímica humana: curso básico. 2a ed. España: Reverté; 1994. pp. 530.

177. Lodish H. Biología Celular y Molecular. 5a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005.

178. Shotton D. Elastase. In: Methods in Enzymology (eds. Perlman, G.E. & Lorand, L.) Vol. XIX, 1970113-40. Academic Press; 1970.

179. Cheema M, Christians J. Virulence in an insect model differs between mating types in *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol 2011; 49(2): 202-207.

180. Hurst S F, Kidd SE, Morrissey CO, Snelders E, Melchers WJ, Castelli MV, Mellado E, Simmon K, Petti CA, Richardson S, Zhang S, Romanelli AM, Wickes BL, de Valk H A, Klaassen CH, Balajee SA. Interlaboratory reproducibility of a single-locus sequence-based method for strain typing of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2009; 47(5): 1562-1564.

181. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5442-5448.

ARTÍCULO

Annals of Agricultural and Environmental Medicine 2016, Vol 23, No 2, 264–269
www.aaem.pl

ORIGINAL ARTICLE

Fungal diversity and *Aspergillus* in hospital environments

Erick Obed Martínez-Herrera[1], María Guadalupe Frías-De-León[2], Esperanza Duarte-Escalante[3], María del Carmen Calderón-Ezquerro[4], María del Carmen Jiménez-Martínez[5,6], Gustavo Acosta-Altamirano[7], Facundo Rivera-Becerril[8], Conchita Toriello[3], María del Rocío Reyes-Montes[3]

[1] *Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México*
[2] *División de Investigación, Hospital Juárez de México. Av. Instituto Politécnico Nacional, México*
[3] *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico*
[4] *Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico*
[5] *Unidad de Investigación, Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP", México*
[6] *Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico*
[7] *Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, Mexico*
[8] *Departamento el Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México*

Martínez-Herrera EO, Frías-De-León MG, Duarte-Escalante E, Calderón-Ezquerro MC, Jiménez-Martínez MC, Acosta-Altamirano G, Rivera-Becerril F, Toriello C, Reyes-Montes MR. Fungal diversity and *Aspergillus* in hospital environments. Ann Agric Environ Med. 2016; 23(2): 264–269. doi: 10.5604/12321966.1203888

Abstract

Introduction and objective. Nosocomial invasive fungal infections, particularly aspergillosis, are an increasing problem in immunocompromised patients. The presented study evaluates fungal diversity and the presence of *Aspergillus* in air samples from two hospitals.

Materials and methods. Over the course of one year (rainy and dry seasons), the air was sampled from three areas in two hospitals (1 and 2) using a single-stage Andersen viable particle sampler (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The fungi were identified by macro- and micromorphology, and the number of colony forming units (CFU)/m^3 air and their richness, abundance, and diversity were determined. Isolates *Aspergillus* genus were characterized by their thermotolerance.

Results. The CFU/m^3 air was similar at both hospitals during the two seasons, but different between the sampled areas. Results showed 10 fungal genera for hospital 1, and 8 for hospital 2. The most abundant were *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus*. The thermotolerance test confirmed the identification of *A. fumigatus* section *Fumigati*. The highest growth rate was found in *Aspergillus* section *Nigri*.

Conclusion. Determining the fungal diversity in the two hospitals was important because all the species have the potential to be pathogenic, especially the section *Fumigati*.

Key words

fungal diversity, *Aspergillus* spp., airborne, thermotolerance

INTRODUCTION

Exposure to bioaerosols is one of the greatest threats to public health because of the adverse effects on humans, animals, and plants [1, 2, 3]. Bioaerosols are aerial suspensions of particles from living organisms, microorganisms or other biological materials [4, 5], the bioaerosols can be dispersed over long distances by air currents and then inhaled, ingested, or otherwise contacted by humans [3]. Fungi are an important component of the bioaerosols of the air and are widely distributed in soil, water, and decaying vegetation [6], and fungi can change benign superficial infections into invasive mycoses [6–11]. Most of the fungi in the environment, both indoors and outdoors, belong to the divisions Ascomycota, Basidiomycota, and mitosporic fungi [12], with *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, and *Alternaria* the most abundant genera [13]. In intramural environments such as those of hospitals, the diversity of fungi is similar, but the concentration and abundance of conidia is associated with their growth in building materials, food, pots, bedding, dust, paint, etc.; under suitable temperature and moisture conditions, conidia grow and sporulate on these substrates, thus constituting a significant source of conidia and hyphal fragments in the air. Numerous studies have been conducted on the adverse effects on human health caused by fungi in intramural and extramural environments [11]. In most of these studies, the single-stage Andersen viable particle sampler (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) is the most frequently used air sampler [14–17] in the detection of colony forming units (CFU) per cubic meter of air, after which identification of the fungi is performed by culture or by molecular techniques [14, 15, 17, 18]. Studies have shown that the highest percentage of nosocomial infections is caused by fungi such as *Candida albicans* and the previously mentioned filamentous fungi [19–22]. A genus that has emerged most often as an important cause of morbidity and high mortality in immunocompromised patients is *Aspergillus* [23, 24]. Invasive aspergillosis (IA) and other infections caused by filamentous

Address for correspondence: María del Rocío Reyes-Montes, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria No. 3000, México Cd. Mx., 04510, México.
E-mail: remoa@unam.mx

Received: 08 September 2015; accepted: 11 December 2015

fungi occur in different groups of immunocompromised patients, including patients with haematologic malignancies [25] who have undergone transplantation [26], patients with congenital immunodeficiencies [27], and patients undergoing immunosuppressive drug therapy [28]. Therefore, the objective of this study was to assess fungal diversity and the presence of airborne fungi at two hospitals in Mexico City.

MATERIALS AND METHOD

Sampling area. Sampling was conducted from May – October 2012 (rainy season) and November 2012 – April 2013 (dry season) in two hospitals located in Mexico City: a specialty hospital, which houses nearly 1,400 patients per month, and the Institute of Ophthalmology, which can house 100 patients; the hospitals were designated 1 and 2, respectively. The areas sampled in hospital 1 were haematology, adult intensive care, and paediatric intensive care units, whereas the areas sampled in hospital 2 were the operating theatre, recovery room, and outpatient room. The sampling of air in different areas was always performed on the same day (Monday and Wednesday) and at the same time (10:00).

Air sampling procedure. Air samples were obtained with a single-stage Andersen viable particle sampler (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA). This system impacts the microorganisms from the environment onto Sabouraud-agar medium (Bioxón, D.F., Mexico). The sampler was placed at a height of 1.5 m from the floor, in the center of each sampling area, and each sample was collected with a vacuum flow of 28.3 L/min for 15 min. Three samples were collected from each sampling area [29].

Fungal examination of airborne samples. After three days of incubation at 28 °C, all the plates were examined and the colonies counted. For each sampled area, the average number of all the colonies grown on the three Sabouraud-agar plates was calculated, and the number of CFU/m^3 air determined according to the manufacturer's protocol sampler. In addition, the CFU/m^3 air was calculated separately for each different colony observed on the plates. All the different colonies were identified by their macro and micromorphologies. The isolates grown on Sabouraud-agar at 28 °C for 4–7 days were observed to identify the typical morphology of each fungus, including the colour and colonial texture. The micromorphological characteristics of all isolates were analyzed using the microculture method of Riddell [30]. The isolates with characteristics compatible with *Aspergillus* species were inoculated and incubated at 25 °C in Czapek-Dox agar (Becton Dickinson, MD, USA) and potato dextrose agar (Bioxon) to identify the species using taxonomic keys [31]. Furthermore, the isolates identified in the different sections of *Aspergillus* were tested in assays of thermotolerance to corroborate those belonging to *A. fumigatus* section *Fumigati*. The assays were conducted as described by Frías-De-León et al. [32]. A suspension of 5 x 10^3 conidia/mL was prepared with PBST (phosphate buffered saline solution with tween 20) using a Neubauer chamber and inoculated in triplicate for each temperature (28 and 50 °C). Growth rate (GR) of all *Aspergillus* isolates studied was determined according to the model of Baranyi and Roberts [33].

Fungal diversity. The richness and abundance of organisms were determined in each area sampled at the two hospitals. The richness was obtained based on the number of species isolated in each sampling area; the abundance was determined by the number of occurrences of each microorganism in each area divided by the total CFU of each area and then multiplied by 100. The fungal diversity was calculated for each hospital based on a matrix of the presence and abundance of the species using the Shannon-Wiener (*H*) and Simpson indices and the software PAST version 1.89 (http://folk.uio.no/ohammer/past) [34].

Statistical analysis. Analysis of variance (ANOVA) was performed to determine if there were statistically significant differences in aero-conidial concentration (CFU/m^3) between the dry and cold seasons of each sampling area, and between the hospitals. All tests were conducted at a significance level of 5% using the software NCSS ver. 7.0 (www.ncss.com).

RESULTS

Quantification of CFU/m^3 in hospitals 1 and 2. A total of 432 air samples obtained in the two hospitals were studied. At both hospitals, the concentration of airborne fungi was similar, and no significant differences in the levels of fungi (CFU/m^3) between the dry and rainy seasons ($p>0.05$) (Tab. 1) were observed.

Table 1. Colony forming units (CFU) in each area sampled in hospitals 1 and 2

Hospital	Sampling area	Rainy season CFU/m^3 ± SD	Dry season CFU/m^3 ± SD
1	Haematology	85.98 ± 13.87	97.09 ± 8.55
1	Adult intensive care unit	43.51 ± 9.37	40.22 ± 10.03
1	Paediatric intensive care unit	41.24 ± 8.09	43.75 ± 6.99
2	Outpatient room	56.30 ± 14.77	53.79 ± 10.24
2	Recovery room	50.57 ± 13.99	53.59 ± 6.66
2	Operating theatre	8.53 ± 2.06	8.95 ± 2.69

SD = Standard Deviation

At hospital 1, the highest concentration of conidia in the air (CFU/m^3) was recorded as follows (in descending order): haematology unit, adult intensive care ward, and paediatric intensive care ward. The differences in CFU/m^3 between the three areas sampled in hospital 1 were statistically significant ($p<0.05$). At hospital 2, the highest concentration of CFU/m^3 in the air was recorded as follows (in descending order): outpatient room, recovery room, and operating theatre. The differences in CFU/m^3 between the three areas sampled in hospital 2 were also statistically significant ($p < 0.05$) (Tab. 1).

Identification of fungi isolated in hospitals 1 and 2 by macromorphology and micromorphology. At hospital 1, the fungi detected were: *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Fumigati*, *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Terrei*, *Cladophialophora bantiana*, *Cladosporium* sp., *Fusarium proliferatum*, *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *R. stolonifer* and *Trichoderma* sp. (Fig. 1). At hospital 2, the fungi detected were: *Alternaria* sp., *Aspergillus*

sp., *A.* section *Flavi*, *A.* section *Fumigati*, *A.* section *Nigri*, *A.* section *Terrei*, *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *P. griseofulvum*, *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., and *R. stolonifer* (Fig. 2).

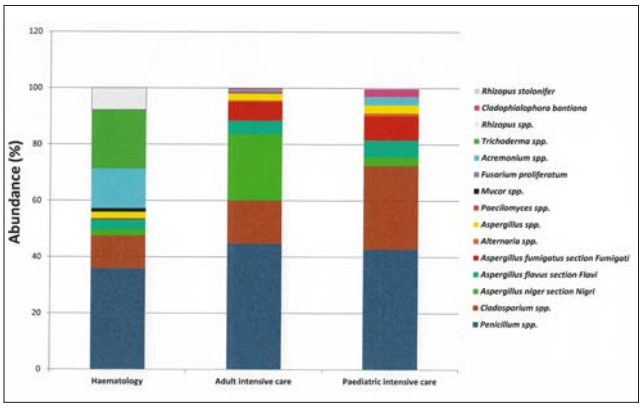

Figure 1. Richness and abundance of fungi in the sampled areas of hospital 1

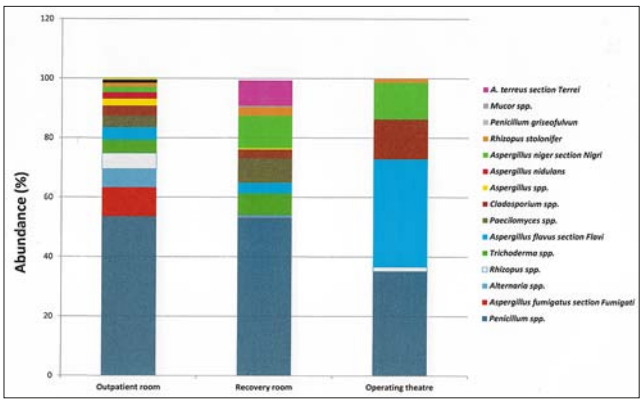

Figure 2. Richness and abundance of fungi in the sampled areas of hospital 2

Fungal diversity. The fungal diversity in hospital 1 showed a richness of fungi distributed as follows: 7 genera and 6 species were found in the adult intensive care unit, 6 genera and 5 species in the paediatric intensive care unit, and 7 genera and 5 species in the haematology unit. In hospital 2: 8 genera and 6 species in the outpatient consultation room, 8 genera and 5 species in the recovery room, and 4 genera and 3 species in the operating theatre (Figs. 1 and 2).

The most abundant fungi sampled in each area of hospital 1 were *A.* section *Flavi*, *A.* section *Fumigati*, *A.* section *Nigri*, *Cladosporium* sp., and *Penicillium* sp. in the pediatric intensive care unit; *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. and *Trichoderma* sp. in haematology; *A.* section *Flavi, A.* section *Fumigati, A.* section *Nigri*, *Cladosporium* sp., and *Penicillium* sp. in adult intensive care (Fig. 1). The most abundant fungi sampled in each area of hospital 2 were: *Alternaria* spp., *A.* section *Flavi*, *A.* section *Fumigati*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., and *Trichoderma* sp. in outpatient consultation; *A.* section *Nigri*, *A.* section *Terrei*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. and *Trichoderma* sp. in the recovery room; *A.* section *Flavi*, *A.* section *Nigri, Cladosporium* sp. and *Penicillium* sp. in the operating theatre (Fig. 2). The diversity values estimated by the Shannon-Wiener and Simpson indices revealed a slightly higher diversity in hospital 1 (Tab. 2).

Table 2. Fungal diversity in the different sampled areas in hospitals 1 and 2

Hospital 1			Hospital 2		
Sampled area	Simpson Index	Shannon Index	Sampled area	Simpson Index	Shannon Index
AICU	0.7784	1.822	OPR	0.6593	1.668
HAEM	0.7822	1.942	RR	0.6494	1.677
PICU	0.7915	1.879	OT	0.6172	1.204

AICU = Adult intensive care unit; HAEM = Haematology; PICU = Paediatric intensive care unit; OPR = Outpatient room; RR = Recovery room; OT = Operating theatre.

All the isolates of the genus *Aspergillus* from hospital 1 grew at 28 °C (Tab. 3). The GR for the *A.* section *Fumigati* isolates was in the range of 13.90–19 mm/day and for *A.* section *Nigri* was in the range of 18.13–25.44 mm/day. The GR for *A.* section *Flavi* was in the range of 15.96–19.08 mm/day and for *A.* section *Terrei* was in the range of 8.17–8.87 mm/day. All the *Aspergillus* isolates from hospital 2 grew at 28 °C. The GR for *A.* section *Fumigati* isolates was in the range of 14.79–22.39 mm/day and for *A.* section *Nigri* was in the range of 20.49–25.69 mm/day. The GR for *A.* section *Flavi* was in the range of 14.88–22.52 mm/day and for *A.* section *Terrei* was in the range of 9.20–9.57 mm/day.

Only the isolates from hospitals 1 and 2 identified as *A.* section *Fumigati* grew at 50 °C (Tab. 3). Isolates from hospital 1 presented a GR of 0.88–21.93 mm/day, whereas isolates from hospital 2 presented a range of 2.61–29.21 mm/day (Tab. 3), showing statistically significant differences ($p<0.05$) among their GR, both among and between isolates of hospital 1 and hospital 2.

Table 3. Growth rate of *Aspergillus* spp. isolates

Hospital	Section	Growth rate (mm/day) ± SD	
		28°C	50°C
1	*Fumigati*	16.95 ± 1.63	6.53 ± 5.13
1	*Nigri*	22.95 ± 1.92	NA
1	*Flavi*	17.07 ± 1.19	NA
1	*Terrei*	8.54 ± 0.35	NA
2	*Fumigati*	17.94 ± 2.16	12.61 ± 7.13
2	*Nigri*	23.04 ± 1.39	NA
2	*Flavi*	18.34 ± 2.72	NA
2	*Terrei*	9.38 ± 0.26	NA

SD = Standard deviation; NA = Not applicable

DISCUSSION

In recent decades, there has been a global increase in nosocomial fungal infections because of advances in increasingly effective, but also more aggressive, medical and surgical therapies [35]. Invasive fungal diseases caused by filamentous fungi are associated with high morbidity and mortality, which is partially because of the difficulty in making an early diagnosis, thus resulting in a delay in starting appropriate treatment. Although fungi have several routes of entry into the host, the most common is through inhalation of propagules; thus, maintaining good air quality in critical areas of hospitals is required to reduce the incidence of invasive fungal infections. Therefore, the presented study is aimed at detecting airborne fungi in the environment of

different areas of two hospitals (1 and 2) to illustrate the occurrence of fungal species. The results obtained are in accordance with the results of other aeromycology studies from Mexico and Brazil [36–38].

During the sampling period, the concentration of fungi in the air (CFU/m^3) at both hospitals was similar for both the dry and rainy seasons, regardless of the conditions or structure of each sampling area. The CFU/m^3 in the sampled areas of the two hospitals showed averages above 40.22 CFU/m^3, with the exception of the operating theatre in hospital 2, which produced values of 8.53 and 8.95 for the rainy and dry seasons, respectively. The fungal burden found in the sampled areas of the two hospitals is inconsistent with that reported in other countries [28, 29]; however, the CFU/m^3 in the operating theatre is consistent with such reports (5–10 CFU/m^3), which can be explained by the stringent hygienic measures in operating theatres. Similarly, there are no established criteria at the institutional level in Mexico regarding the ranges of CFU/m^3 that are considered acceptable, since only one study of this type has been reported [38]. The homogeneity in the number of CFU/m^3 found during the two seasons (rainy and dry) can be explained by the similarity between these season in Mexico City, compared with countries of North America and Europe, where seasons are marked by abrupt changes in ambient temperature and a true separation occurs between intramural and extramural environments, which does not happen in Mexico.

In both hospitals, the fungal diversity was similar, with *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp, *A.* section *Nigri*, *A.* section *Flavi,* and *A.* section *Fumigati*, which are all medically relevant, and the most abundant in both hospitals. These results are consistent with those reported by Hao *et al.* [39], who examined the environmental fungal load of two hospitals in China and demonstrated that *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., and *Fusarium* spp. were present in the air, on surfaces, and in the tap water. They also reported that the fungal load fluctuated during the year of air sampling, and the highest densities of these microorganisms were observed during the summer and spring. Azimi *et al.* [40] also found that *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., and *Cladosporium* were the most common genera in different hospitals areas. The diversity of fungi found in this work can be explained because fungi suspended in the atmosphere can be transported quickly as bioaerosols over great distances with the movement of air, which represents the optimal mechanism of dispersion [41]. Certain fungi have developed specialized adaptations that favour their survival and dispersal in the atmosphere, with their transport performed on dust particles, fragments of leaves, skin, clothing fibers, or in drops of water [42]. The physicochemical conditions of the atmosphere do not favour the growth or survival of microorganisms; thus, the majority can only survive in the atmosphere for a short period of time. However, fungal conidia are life forms with longer survival rates and have several properties that contribute to their ability to survive in the atmosphere, such as thick walls, which protect them from desiccation, and pigment (melanin), which aids protects gainst ultraviolet radiation [43]. Additionally, conidia possess other adaptations, such as thermotolerance and nutritional versatility, which allows them to utilize a wide range of carbon and nitrogen sources, as in the case of the genus *Aspergillus* [43]. Also, their hydrophobin-rich conidial external layer allows them to remain suspended in the air without settling, because this cysteine-rich proteins are related to the high surfactant activity of fungi; hydrophobins self-assemble at the hydrophilic-hydrophobic interface to form an amphipathic monolayer [44, 45]. These molecules reduce the surface tension of the medium or substrate on which the fungus grows, allowing it to break the air-water interface and prevent hydrosaturation to maintain gas permeability. The degree of hydrophobicity among fungi ranges from mild to highly hydrophobic, which affects the efficiency of the spore dispersion capacity; for example, conidia from *A. fumigatus* are significantly more hydrophobic than other species in this genus, allowing them to remain in the air [44, 45].

Undoubtedly, the presence of these microorganisms in hospital environments is a warning for more stringent control measures because among these fungi are species of the genus *Aspergillus*, which is considered the main cause of invasive fungal diseases by filamentous fungi in immunocompromised patients, resulting in high mortality rates of 40–90% [46]. Moreover, invasive fungal diseases caused by filamentous fungi other than *Aspergillus* spp. have also increased in frequency and mortality in recent years, especially in immunocompromised patients. The following fungi must be controlled for depending on the susceptibility factors of different hosts: Mucorales, such as *Mucor*, *Rhizopus,* and *Lichtheimia*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Paecilomyces, Trichoderma,* and dematiaceous fungi, such as *Bipolaris*, *Exophiala*, *Alternaria,* and *Cladosporium* [35]. Invasive fungal diseases caused by these fungi are less common than those caused by the genus *Aspergillus*; however, *Penicillium* spp. can cause certain types of asthma [47], and *Cladosporium* spp. may be associated with changes in lung function in children [48]. In addition, these fungi are usually more virulent and difficult to treat because of their resistance to most of the available drugs and type of affected patient, with those receiving haematologic treatment or solid organ transplants generally more affected [35].

Thermotolerance was conducted at 28 °C and 50 °C to confirm the identification of the *A. fumigatus* section *Fumigati*, because thermotolerance can be used to distinguish *A. fumigatus* from other species of clinical significance belonging to other sections. The *Fumigati* section [49] can be distinguished because of its ability to grow at temperatures of 55 °C and survive at 75 °C, allowing the organism to grow in decaying organic matter and infect mammalian hosts [50, 51]. The results of the presented study revealed that the isolates identified as *A.* section *Fumigati* grew at 28 and 50 °C. However, the fungi identified as *A.* section *Flavi*, *A.* section *Nigri,* and *A.* section *Terrei* only grew at 28 °C. Thus, this phenotypic characteristic is important for confirmation of identification of *A. fumigatus* section *Fumigati* [51].

The GR assays of all the isolates of the genus *Aspergillus* were performed to identify differences which were observed between the GRs of the isolates of *A.* section *Fumigati* at 50 °C. The ability of these fungi to resist high temperatures may play a crucial role in the selection and promotion of pathogenic species, such as *A.* section *Fumigati*, which is a species that adapts to extreme changes in environmental conditions, thus allowing it to develop invasive infections because the microenvironment provided by the human body appears to supply excellent conditions for its growth and invasion. The isolates of *A. flavus* and *A. niger* cannot adapt to similar conditions because they cannot withstand high temperatures [52]. The faster GRs at 28 °C corresponded

to isolates of *A.* section *Nigri*, followed by *A.* section *Flavi*, *A.* section *Fumigati,* and *A.* section *Terrei* from both hospitals. This result was consistent with that of Marin *et al.* [53], who observed that the growth of conidia occurs more rapidly in *A.* section *Nigri* at temperatures between 28–30 °C. However, despite the abundance and high GR of *A.* section *Nigri*, it is less thermotolerant than *A.* section *Fumigati* because its optimal growth temperature is 30 °C. Thus, it is difficult for *A.* section *Nigri* to germinate at 37 °C, which is the temperature of the human body. Perhaps this is a determining factor for why the nosocomial cases of aspergillosis are primarily caused by *A. fumigatus* and not *A. niger.*

The isolation of *A.* section *Terrei* reinforces the findings of Rüping et al. [54] who reported its presence in hospital environments, suggesting that its incidence has increased in cases of IA.

CONCLUSIONS

The airborne fungi in both hospitals was similar, highlighting *Aspergillus* section *Fumigati*, the filamentous fungus responsible for invasive aspergillosis worldwide. The current study presents one of the first to be performed in Mexico for evidence of airborne fungi in nosocomial environments. Furthermore, the isolation, identification and characterization of airborne fungi in hospital environments is a key task, because most of these fungi have the potential to be pathogenic, particularly for patients in intensive care and haematology units. Additionally, the presence of the genus *Aspergillus* within hospital environments should be monitored in areas that house immunosuppressed patients susceptible to exposure to this pathogen. These findings support the necessity to develop stricter safety protocols that would substantially reduce morbidity and mortality in patients and high hospital costs.

Acknowledgements
The study was supported by PAPIIT-DGAPA (IN219212), UNAM, as a part of the PhD thesis of Erick Obed Martínez-Herrera, a student of the Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud at the Universidad Autónoma Metropolitana and the scholarship of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Mexico (CONACyT–Mexico, Reference Number-554689). The authors thank César Guerrero Guerra for their technical advice.

Author´s Contributions
Erick Obed Martínez-Herrera, María Guadalupe Frías-De-León and Esperanza Duarte-Escalante conducted all the experiments. María del Carmen Calderón-Ezquerro, María del Carmen Jiménez-Martínez and Gustavo Acosta-Altamirano, conducted the sampling procedures in the two hospitals. Erick Obed Martínez-Herrera, Facundo Rivera-Becerril and Conchita Toriello conducted statistical analysis, and Facundo Rivera-Becerril and Conchita Toriello provided a critical review of the manuscript. María del Rocío Reyes-Montes was involved in the study design, analysis and interpretation of results and drafted the manuscript. María Guadalupe Frías-De-León and Esperanza Duarte-Escalante contributed to data interpretation and improvement of the manuscript. All of the authors read and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. Fernstrom A, Goldblatt M. Aerobiology and its role in the transmission of infectious diseases. J Pathol. 2013; 2013: 1-C13.
2. Durugbo EU, Kajero AO, Omoregie EI, Oyejide NE. A survey of outdoor and indoor airborne fungal spora in the Redemption City, Ogun State, south-western Nigeria. Aerobiologia. 2013; 29(2): 201–216.
3. Menezes EA, Trindade ECP, Costa MM, Freire CCF, Cavalcante MS, Cunha F. Airborne fungi isolated from Fortaleza City, State of Ceara, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004; 46(3): 133–137.
4. Kasprzyk I. Aeromycology – main research fields of interest during the last 25 years. Ann Agric Environ Med. 2008; 15(1): 1–7.
5. Srikanth P, Sudharsanam S, Steinberg R. Bio-aerosols in indoor environment: Composition, health effects and analysis. Indian J Med Microbiol. 2008; 26(4): 302–312.
6. Sen B, Asan A. Fungal flora in indoor and outdoor air of different residential houses in Tekirdag City (Turkey): seasonal distribution and relationship with climatic factors. Environ Monit Assess. 2009; 151(1–4): 209–219.
7. Simon-Nobbe B, Denk U, Pöll V, Rid R, Breitenbach M. The spectrum of fungal allergy. Int Arch Allergy Immunol. 2008; 145(1): 58–86.
8. Hedayati MT, Mayahi S, Aghili R, Goharimoghadam K. Airborne fungi in indoor and outdoor of asthmatic patients' home, living in the city of Sari. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2005; 4(4): 189–191.
9. Lentino JR, Rosenkranz MA, Michaels JA, Kurup VP, Rose HD, Rytel MW. Nosocomial aspergillosis: a retrospective review of airborne disease secondary to road construction and contaminated air conditioners. Am J Epidemiol. 1982; 116(3): 430–437.
10. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. J Hosp Infect. 2006; 63(3): 246–254.
11. Sepahvand A, Shams-Ghahfarokhi M, Allameh A, Razzaghi-Abyaneh M. Diversity and distribution patterns of airborne microfungi in indoor and outdoor hospital environments in Khorramabad, Southwest Iran. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(2): 86–192.
12. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30(1): 33–39.
13. de Ana SG, Torres-Rodríguez JM, Ramírez EA, García SM, Belmonte-Soler J. Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. J Investig Allergol Clin Immunol. 2006; 16(6): 357–363.
14. Mobin M, do Amparo Salmito M. Fungus microbiota in air conditioners in intensive care units in Teresina, Piauí. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39(6): 556–559.
15. Cárdenas MX, Cortes JA, Parra CM. *Aspergillus* spp. in risk areas of transplant patients in a university hospital. Rev Iberoam Micol. 2008; 25(4): 232–236.
16. Eames I, Tang JW, Li Y, Wilson P. Airborne transmission of disease in hospitals. J R Soc Interface. 2009; 6(Suppl 6): S697–S702.
17. Kim KY, Kim YS, Kim D. Distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in the general hospitals of Korea. Ind Health. 2010; 48(2): 236–243.
18. Augustowska M, Dutkiewicz J. Variability of airborne microflora in a hospital ward within a period of one year. Ann Agric Environ Med. 2006; 13(1): 99–106.
19. Perdelli F, Cristina ML, Spagnolo AM, Dallera M, Ottria G, Lombardi R, Grimaldi M, Orlando P. Fungal contamination in hospital environments. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006; 27(1): 44–47.
20. Faure O, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Mallaret MR, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units. J Hosp Infect. 2002; 50(2): 155–160.
21. Fox BC, Chamberlin L, Kulich P, Rae EJ, Webster LR. Heavy contamination of operating room air by *Penicillium* species: Identification of the source and attempts at decontamination. Am J Infect Control. 1990; 18(5): 300–306.
22. Panagopoulou P, Filioti J, Farmaki E, Maloukou A, Roilides E. Filamentous fungi in a tertiary care hospital: environmental surveillance and susceptibility to antifungal drugs. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007; 28(1): 60–67.
23. Clark TA, Hajjeh RA. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. Curr Opin Infect Dis. 2002; 15(6): 569–574.
24. Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis. 1998; 26(4):781–803.
25. Martino R, Subira M. Invasive fungal infections in hematology: new trends. Ann Hematol. 2002; 81(5): 233–243.
26. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis. 2002; 34(1): 909–917.

27. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H. Chronic granulomatous disease: report on a national registry of 368 patients. Medicine. 2000; 79(3): 155–169.
28. De Rosa FG, Shaz D, Campagna AC, Dellaripa PE, Khettry U, Craven DE. Invasive pulmonary aspergillosis soon after therapy with infliximab, a tumor necrosis factor-alpha–neutralizing antibody: a possible healthcare-associated case? Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24(7): 477–482.
29. Andersen Viable Particle Sampler, Thermo Electron Corporation. Environmental Instruments. Series 10–800. Single Stage Viable Sampler. Instruction manual P/N 100074–00. Massachusetts, USA: Thermo Electron Corporation, 2003.p. 13.
30. Ridell R. Permanent stained micological preparations obtained by slide culture. Mycology. 1950; 42(2): 265–270.
31. Raper KB, Fennel DI. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins (Baltimore, MD, USA) Publisher, 1965.
32. Frías De León MG, Zavala-Ramírez M, Córdoba S, Zúñiga G, Duarte-Escalante E, Pérez-Torres A, Zepeda-Rodríguez A, López-Martínez I, Buitrago MJ, Reyes-Montes MR. Phenotypic characteristics of isolates of *A. fumigatus* from different geographic origins and their relationships with genotypic characteristic. BMC Infect Dis. 2011; 11: 116.
33. Baranyi J, Roberts TA. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int J Food Microbiol. 1994; 23(3–4): 277–294.
34. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST, Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electronica. 2001; 4(1):1–9.
35. Pemán J, Salavert M. Epidemiology and prevention of nosocomial invasive infections by filamentous fungi and yeasts. Enferm Infec Microbiol Clin. 2013; 31(5): 328–341.
36. Martins-Diniz JN, da Silva RA, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ. Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit. Rev Saude Publica. 2005; 39(3): 398–405.
37. Cordeiro RA, Brilhante RS, Pantoja LD, Moreira Filho RE, Vieira PR, Rocha MF, Monteiro AJ, Sidrim JJ. Isolation of pathogenic yeasts in the air from hospital environments in the city of Fortaleza, northeast Brazil. Braz J Infect Dis. 2010; 14(1): 30–34.
38. Ríos-Yuil JM, Arenas R, Fernández R, Calderón-Ezquerro M, Rodriguez-Badillo R. Aeromycological study at the intensive care unit of the "Dr. Manuel Gea Gonzalez" General Hospital. Braz J Infect Dis. 2012; 16(5): 432–435.
39. Hao ZF, Ao JH, Hao F, Yang Rong-ya RY, Zhu H, Zhang J. Environment surveillance of filamentous fungi in two tertiary care hospitals in China. Chin Med J (Engl). 2011; 124(13): 1970–1975.
40. Azimi F, Naddafi K, Nabizadeh R, Hassanvand MS, Alimohammadi M, Afhami S, Musavi SN. Fungal air quality in hospital rooms: a case study in Tehran, Iran. J Environ Health Sci Eng. 2013; 11(1): 30.
41. Warris A, Voss A, Verweij PE. Hospital sources of *Aspergillus*: New routes of transmission? Rev Iberoam Micol. 2001; 18(4): 156–162.
42. Hoseinzadeh E, Reza Samarghandie M, Ghiasian SA, Alikhani MY, Roshanaie G. Evaluation of bioaerosols in five educational hospitals wards air in Hamedan, during 2011–2012. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(6): e10704.
43. Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, Hernando FL, Pontón J, Garaizar J, Rementeria A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Rev Iberoam Micol. 2010; 27(4):155–182.
44. Bayry J, Aimanianda V, Guijarro JI, Sunde M, Latgé JP. Hydrophobins-unique fungal proteins. PLoS Pathog. 2012; 8(5): 1–4.
45. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. *Aspergillus fumigatus*-What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? PLoS Pathog. 2013; 9(12): 1–4.
46. Alangaden GJ. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. Infect Dis Clin North Am. 2011; 25(1): 201–225.
47. Licorish K, Novey HS, Kozak P, Fairshter RD, Wilson AF. Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol. 1985; 76(6): 819–825.
48. Chen BY, Chao HJ, Wu CF, Kim H, Honda Y, Guo YL. High ambient *Cladosporium* spores were associated with reduced lung function in schoolchildren in a longitudinal study. Sci Total Environ. 2014; 481: 370–376.
49. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong S-B, Yaghuchi T, Varga J, Samson RA. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. Stud Mycol. 2007; 59: 39–46.
50. Ryckeboer J, Mergaert J, Coosemans J, Deprins K, Swings J. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. J Appl Microbiol. 2003; 94(1): 127–137.
51. Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(3): 461–488.
52. Araujo R, Gonçalves-Rodrigues A. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. J Clin Microbiol. 2004; 42(9): 4335–4337.
53. Marín S, Sanchis V, Sáenz R, Ramos AJ, Vinas I, Magan N. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. J Appl Microbiol. 1998; 84(1): 25–36.
54. Rüping MJGT, Gerlach S, Fischer G, Lass-Flörl C, Hellmich M, Vehreschild JJ, Cornely OA. Environmental and clinical epidemiology of *Aspergillus terreus*: data from a prospective surveillance study. J Hosp Infect. 2011; 78(3): 226–230.