



Marcadores moleculares: una herramienta importante en el diagnóstico, tratamiento y epidemiología de la aspergilosis invasora

RESUMEN

El incremento en la incidencia de la aspergilosis invasora representa un grave problema para el tratamiento de pacientes con esta micosis, debido a su elevada tasa de mortalidad por deficiencias diagnósticas y terapéuticas. Éstas se han atribuido a la dificultad para detectar *Aspergillus fumigatus*, principal agente etiológico de esta micosis, en las muestras biológicas de pacientes inmunosuprimidos, que son los principales afectados por el hongo; además por la resistencia a los antifúngicos como consecuencia del uso incontrolado de éstos, a nivel profiláctico y terapéutico, y el desconocimiento de aspectos epidemiológicos de la aspergilosis. En la actualidad, para superar estas limitaciones se han empleado marcadores moleculares. En México su uso aún no está implementado en la rutina de los laboratorios intrahospitalarios, porque a pesar de que se han reportado ampliamente en la bibliografía, hace falta validarlos y estandarizarlos para asegurar que los resultados que se obtengan en cualquier laboratorio sean confiables y comparables. En este trabajo se presenta una revisión actualizada de la utilidad de los marcadores moleculares en la identificación certera de *A. fumigatus* en la detección de resistencia a los antifúngicos triazólicos y en estudios epidemiológicos para establecer las medidas necesarias en la prevención y control de la aspergilosis.

Palabras clave: marcadores moleculares, *Aspergillus fumigatus*, aspergilosis, diagnóstico molecular, antifúngicos, epidemiología.

Molecular markers: an important tool in the diagnosis, treatment and epidemiology of invasive aspergillosis

ABSTRACT

Increase in the incidence of invasive aspergillosis has represented a difficult problem for management of patients with this infection due to its high rate of mortality, limited knowledge concerning its diagnosis, and therapeutic practice. The difficulty in management of patients with aspergillosis initiates with detection of the fungus in the specimens of immunosuppressed patients infected with *Aspergillus fumigatus*; in addition, difficulty exists in terms of the development of resistance to antifungals as a consequence of their indiscriminate use in prophylactic and therapeutic practice and to ignorance concerning the epidemiology

María Guadalupe Frías-de León¹
Gustavo Acosta-Altamirano¹
Esperanza Duarte-Escalante²
José Enrique Martínez-Hernández²
María de los Ángeles Martínez-Rivera³
María del Rocío Reyes-Montes²

¹División de Investigación, Hospital Juárez de México, México, DF.

² Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México, DF.

³ Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México DF.

Recibido: 21 de febrero 2013

Aceptado: 12 de septiembre 2013

Correspondencia

Dra. María del Rocío Reyes Montes
Laboratorio de Micología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria 3000
04510 México DF
Tel.: (55) 5623-2463
remoa@unam.mx

logical data of aspergillosis. With the aim of resolving these problems, molecular markers is employed at present with specific and accurate results. However, in Mexico, the use of molecular markers has not yet been implemented in the routine of intrahospital laboratories; despite the fact that these molecular markers has been widely referred in the literature, it is necessary for it to validated and standardized to ensure that the results obtained in any laboratory would be reliable and comparable. In the present review, we present an update on the usefulness of molecular markers in accurate identification of *A. fumigatus*, detection of resistance to antifungal triazoles, and epidemiological studies for establishing the necessary measures for prevention and control of aspergillosis.

Key words: Molecular markers, *Aspergillus fumigatus*, aspergillosis, molecular diagnosis, antifungals, epidemiology.

ANTECEDENTES

Desde hace varios años, la Micología médica enfrenta graves problemas, como el aumento en la incidencia de las micosis oportunistas, particularmente la aspergillosis, a consecuencia del incremento de personas inmunosuprimidas por diferentes causas. Numerosos trabajos demuestran el aumento en la incidencia de la forma invasora de la aspergillosis y su elevada mortalidad, algunos autores la reportan en 94% de pacientes a quienes se trasplanta algún órgano.¹ En los últimos años se ha reportado que la aspergillosis invasora afecta de 5 a 20% de los pacientes con enfermedad hematológica maligna y transplantados, con una tasa de mortalidad de 30 a 60%.^{2,3} De acuerdo con datos epidemiológicos de otros países, la incidencia de aspergillosis invasora es de 1.6% y se considera la infección fungica invasora más común en trasplante de células hematopoyéticas (43%).¹ Aunque las tasas de supervivencia se han incrementado en los últimos años, al menos en pacientes oncohematológicos y en receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos, tal vez influidas por los regímenes de acondicionamiento no mieloablativos, los medios

de diagnóstico más tempranos o el empleo de regímenes de profilaxis y tratamiento antifúngico más eficaz.⁴ Aun así, las tasas de mortalidad de la aspergillosis invasora son altas (35-95%).⁵ Sin embargo, en México los datos epidemiológicos de la aspergillosis son escasos porque se restringen a la descripción de casos clínicos aislados.⁶ Los datos recientes muestran la importancia de la aspergillosis, sobre todo de la forma invasora, porque en el periodo 2000-2007 se registraron 86 casos en el Hospital Infantil Federico Gómez de la Ciudad de México.⁷ La tasa de mortalidad y el mal pronóstico en los casos de aspergillosis invasora se deben a las deficiencias para establecer un diagnóstico oportuno y la terapéutica eficaz, provocadas por la identificación errónea del agente etiológico y por la resistencia a los antifúngicos más empleados. En la actualidad, en otros países, para contrarrestar esas limitaciones se han empleado marcadores moleculares, que son fragmentos de ADN que pueden corresponder o no a un rasgo genético que se expresa (gen), y pueden usarse con dos fines: identificación genética de los hongos y localización de genes que determinan características cuantitativas. En relación con el primer objetivo, los marcadores moleculares son capaces de detectar la existen-



cia de hongos patógenos en muestras clínicas y ambientales, y diferenciar entre especies y variedades dentro de un mismo género; esto se realiza en el ADN y proporciona el perfil genético preciso de cada organismo estudiado, "DNA fingerprinting". Además, permiten monitorear al agente etiológico durante el tratamiento de la infección y estudiar la epidemiología molecular de las infecciones fúngicas. El segundo objetivo intenta localizar alelos o genes específicos, o putativos, que determinen características fenotípicas del hongo, como por ejemplo, la resistencia a fármacos en aislados clínicos del patógeno.

Los marcadores moleculares han demostrado ser herramientas útiles para el diagnóstico, tratamiento y epidemiología de las micosis, como en el caso de la aspergilosis.

La aspergilosis es causada por varias especies del género *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. flavus*), pero *A. fumigatus* es responsable de más de 90% de los casos en humanos.⁸ Además, estudios recientes han reportado casos de aspergilosis causada por otras especies de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Fumigati* (*Neorsartorya fischeri*, *N. pseudofischeri*, *N. hiratsukae* y *A. lentulus*), que recientemente se reclasificó y en la actualidad contiene 25 especies diferentes, con 8 estados anamorfos y 17 teleomorfos.⁹ *A. fumigatus* es un hongo filamentoso, hialino, saprobio, termofílico, distribuido ampliamente en el medio ambiente; esporula de manera abundante y libera pequeños conidios a la atmósfera, por lo que se considera el hongo patógeno más prevalente en el aire. La inhalación de estos propágulos infecciosos por personas inmunocompetentes rara vez tiene efectos adversos porque los conidios son eliminados eficientemente por el sistema inmunitario; sin embargo, en personas inmunosuprimidas puede causar infecciones invasoras que generalmente son mortales. Los principales

factores de riesgo para la aspergilosis invasora son el trasplante de órganos y médula ósea, la enfermedad injerto contra huésped, neoplasias malignas hematológicas, las enfermedades pulmonares, granulocitopenia prolongada, enfermedad granulomatosa crónica, el tratamiento con corticoesteroides y el SIDA.¹

Existe la opinión generalizada de que la aspergilosis invasora tiene, principalmente, un origen nosocomial; esto se ha comprobado al correlacionar los brotes hospitalarios con el aumento de conidios circulantes ocasionado por obras en construcción, movimiento de mobiliario o manipulaciones en los sistemas de aire acondicionado y de distribución de agua,¹⁰ lo que aunado a la población susceptible, genera brotes epidémicos.

Los estudios epidemiológicos que se han diseñado para comparar los aislados clínicos con los del ambiente hospitalario han demostrado que sólo 40% de los casos de aspergilosis parecen tener un origen nosocomial, mientras que en el 60% restante no se encuentra concordancia entre los genotipos ambientales y clínicos,¹¹ esto puede explicarse por la enorme variabilidad intraespecie que existe entre los aislados de *A. fumigatus*.¹² El aumento en el número de los casos de aspergilosis invasora, la tasa de mortalidad y el mal pronóstico de muchos pacientes, así como el desconocimiento de la epidemiología de la aspergilosis, ha motivado el desarrollo de diferentes marcadores moleculares para solucionar esos problemas y lograr el control de esta micosis. Estos marcadores se describen enseguida.

Marcadores moleculares para el diagnóstico de la aspergilosis

La supervivencia de los pacientes con aspergilosis invasora depende del diagnóstico certero y oportuno y del inicio temprano de un tratamiento

antifúngico efectivo. El diagnóstico definitivo de las micosis se realiza, de preferencia, con el aislamiento del agente causal de muestras clínicas en cultivo; sin embargo, en el caso de *A. fumigatus* este método tiene el inconveniente de no diferenciar fehacientemente entre colonización, invasión y contaminación. Además, en caso de que el cultivo resulte positivo se requiere confirmación por histología, porque la existencia de micelio tabicado en tejidos viables es el patrón de referencia que permite establecer la existencia de infección invasora en pacientes inmunodeprimidos. Esos inconvenientes hacen necesario recurrir a métodos más rápidos, precisos y sensibles que permitan evidenciar la existencia de pequeñas cantidades del agente etiológico o de sus productos en muestras del paciente, por lo que se recomienda el uso de métodos de inmunodiagnóstico, como las técnicas de ELISA y aglutinación en látex que detectan al antígeno galactomanano. Sin embargo, estas técnicas tienen algunas limitaciones en la especificidad, porque hay reacciones cruzadas con otros hongos causantes de cuadros clínicos semejantes. En los últimos años se diseñaron varios marcadores moleculares (sondas de ADN) para utilizarse, a través de PCR, en sus diferentes modalidades en el diagnóstico de la aspergilosis invasora (Cuadro 1).¹³⁻¹⁹ La aplicación de estos marcadores tiene grandes ventajas, entre ellas la detección del hongo en las primeras fases de la enfermedad. Una de las ventajas más importantes es que permite diferenciar las especies de *Aspergillus* de importancia médica, esto es importante porque la identificación errónea de la especie repercute en el tratamiento farmacológico de los pacientes, porque existen diferentes especies con morfotipos casi indistinguibles al de *A. fumigatus*, que tienen diferentes perfiles de susceptibilidad a los antifúngicos, como es el caso de *A. lentulus*.²⁰ Aunque son evidentes las grandes ventajas del uso de marcadores moleculares para la detección de *A. fumigatus*, existen diversos inconvenientes para su apli-

cación, como la reproducibilidad, porque en muchas ocasiones los resultados obtenidos en diferentes laboratorios no son equiparables. Los marcadores moleculares más apropiados para detectar el material genético de *A. fumigatus* en muestras clínicas son, sin lugar a dudas, los de mayor sensibilidad porque la liberación y circulación del ADN fúngico en diferentes fluidos corporales es variable, de tal manera que un ensayo que no sea lo suficientemente sensible para detectarlo en la concentración en que se encuentre generará resultados falsos-negativos.

Marcadores moleculares en A. fumigatus para detectar resistencia antifúngica

Las infecciones nosocomiales causadas por hongos se han incrementado, de ahí también la administración de antifúngicos profilácticos y terapéuticos. Esta situación ha conducido a la aparición de resistencia secundaria a éstos, como se ha reportado en *A. fumigatus*.²¹ Los antifúngicos disponibles para tratar la aspergilosis invasora son la anfotericina B, los triazoles y la caspofungina, que tienen como blanco a la 14 α-lanosterol desmetilasa de la vía sintética del ergosterol y a la β-glucano sintetasa (inhibe la síntesis de pared celular fúngica); sin embargo, no se ha observado la repercusión esperada en la supervivencia de los pacientes porque la tasa de mortalidad por aspergilosis invasora sigue siendo alta (30-60%) debido a la resistencia a estos antifúngicos, en particular a los triazoles, que hoy son los más prescritos.^{23,22} El aumento de la resistencia a los antifúngicos ha renovado el interés por el desarrollo de nuevos fármacos con diferentes mecanismos de acción, y la búsqueda de otras técnicas que permitan determinar la sensibilidad del patógeno frente a cada antifúngico para elegir el tratamiento adecuado en cada paciente con aspergilosis.²³ La resistencia a los triazoles en *A. fumigatus* está determinada por dos mecanismos: la sobreexpresión de genes transportadores (*MDR1* y *MDR2*) asociados con



Cuadro 1. Características de algunos marcadores moleculares desarrollados para el diagnóstico de aspergilosis invasora

Marcador molecular	Utilidad	Referencia
Secuencia del gen 18S del rRNA	Detección de <i>Aspergillus</i> en muestras de sangre, con mayor sensibilidad (79%) y especificidad (92%) que la prueba de ELISA y la determinación de 1-3-β-D-glucano	Kami y col. ¹³
Secuencia del mtDNA	Detección de <i>A. fumigatus</i> en biopsias y lavado broncoalveolar de pacientes con aspergilosis invasora. La sensibilidad es de 73%, la especificidad de 93%, y los valores predictivos positivo y negativo de 73 y 95%, respectivamente	Rantakokko y col. ¹⁴
Secuencia del gen del citocromo b mitocondrial	Detección específica de <i>A. fumigatus</i> y cuantificación de la carga fúngica en lavado broncoalveolar y sangre, con una sensibilidad de 13.2 fg de DNA	Spiess y col. ¹⁵
Amplificación de una región 18S	Detección y cuantificación específica de DNA de <i>A. fumigatus</i> con una sensibilidad de 10 ³ conidios/mL en modelo murino	Buitrago y col. ¹⁶
Secuencia del gen 18S del rRNA	Detección 100% específica y sensible (61.7%) de <i>A. fumigatus</i> , por PCR-ELISA en modelo murino. Este ensayo resultó más sensible que la detección de galactomananas y la PCR tiempo real	Scotter and Chalmers ¹⁷
Región del gen 28S del rDNA	Detección, PCR en tiempo real de diversas especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Candida</i>	Baskova y col. ¹⁸
Secuencias parciales de los genes β-tubulina (β-tub) y rodlet A (rodA)	Identificación específica y altamente reproducible de <i>A. fumigatus</i> dentro de la sección <i>Fumigati</i>	Serrano y col. ¹⁹

las bombas de eliminación activa del fármaco y mutaciones puntuales en el gen *cyp51* que codifica la enzima diana (14 α-lanosterol desmetilasa). Estas confieren diferentes perfiles de susceptibilidad, por ejemplo: la resistencia al itraconazol y posaconazol puede deberse a una sustitución de aminoácidos en la posición Gly54. La sustitución en Gly138 está relacionada con la resistencia cruzada a azoles.^{22,24}

En la aspergilosis no hay duda que los pacientes tratados durante mucho tiempo con azoles, *A. fumigatus* desarrolla resistencia secundaria (la exposición previa al antifúngico es el factor de selección de cepas resistentes), incluso a otros antifúngicos que no habían sido utilizados en el tratamiento, otra alternativa es que el hongo ge-

nere resistencia en el ambiente y después infecte al humano.²⁵ Ante el aumento de resistencia a los antifúngicos es importante determinar los perfiles de susceptibilidad de los aislados clínicos frente a los diferentes fármacos. Hasta ahora existen dos métodos de referencia (M38-A2 y el modificado por EUCAST) para determinar la susceptibilidad *in vitro* de los hongos filamentosos, a fin de encontrar la concentración mínima inhibitoria del antifúngico; es decir, la mínima concentración del fármaco que inhibe el crecimiento parcial al 50% (azoles) o total 90% (anfotericina B o caspofungina) del patógeno. Sin embargo, estos métodos no han resultado del todo adecuados, sobre todo porque no ha sido posible determinar los puntos de corte (susceptibilidad o resistencia, relacionando los datos *in vitro* con la respuesta

clínica a la infección).²⁶ Por ello los marcadores moleculares son una excelente alternativa para detectar aislados resistentes de una manera rápida y eficiente.²⁴ Con este propósito se han diseñado marcadores moleculares con base en las diferentes mutaciones asociadas con resistencia a triazoles en *A. fumigatus*²² (Cuadro 2).²⁷⁻³² En un principio estos marcadores resultaron una herramienta adecuada para detectar resistencia en *A. fumigatus*, porque permitieron seleccionar el tratamiento específico en los pacientes con aspergilosis, particularmente aspergilosis invasora, que disminuyen la mortalidad de los pacientes por falla terapéutica; sin embargo, su uso estuvo limitado debido a que en la misma secuencia del gen *cyp51* se identificaron otras mutaciones también asociadas con la resistencia. Incluso, recientemente se reportó que los aislados con las mutaciones anteriormente asociadas a la resistencia a triazoles, no tienen el fenotipo

aspergilosis, superando las limitaciones de los métodos tradicionales.

Marcadores moleculares utilizados en la epidemiología molecular

En otros países en los últimos años se ha registrado un incremento continuo de la aspergilosis invasora y en México los escasos estudios también sugieren un aumento importante de esta enfermedad,⁷ de ahí que surge la necesidad de realizar estudios epidemiológicos que permitan su mejor conocimiento para determinar factores de riesgo y mejorar las medidas preventivas. Este tipo de estudios también permitirá conocer la genética de poblaciones de este hongo, para identificar atributos de su ciclo de vida, como el modo de reproducción y la variabilidad genética inter e intraespecífica de una población de aislados, que generan mayor impacto en la

Cuadro 2. Marcadores moleculares para detectar resistencia en aislados de *A. fumigatus*

Marcador molecular	Utilidad	Referencia
L98H en <i>cyp51</i>	Detección de resistencia a ITC y PSZ en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Díaz-Guerra y col. ²⁷
M220 en <i>cyp51</i>	Detección de resistencia a ITC en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Mellado y col. ²⁸
G54 en <i>cyp51</i>	Detección de resistencia a ITC y PSZ en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Balashov y col. ²⁹
L98 y una repetición en tandem de 34 bp en <i>cyp51</i>	Detección de resistencia cruzada a azoles en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Mellado y col. ³⁰
G54, L98, 220 y G13	Detección de resistencia cruzada a azoles en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Klaassen y col. ³¹
P216 y F219	Detección de resistencia a ITC y PSZ en aislados de <i>A. fumigatus</i>	Camps y col. ³²

ITC: Itraconazol, PSZ: Posaconazol.

resistente;³³ por esto varios investigadores siguen en el intento de obtener marcadores moleculares que detecten resistencia tomando en cuenta los otros mecanismos de resistencia descritos para *A. fumigatus*. Es claro que este tipo de marcadores permitirá establecer con mayor rapidez y precisión el tratamiento de los pacientes con

identificación clínica y en la investigación relacionada con el tratamiento, incluido el desarrollo de fármacos o vacunas.

A la fecha no existe ningún marcador molecular ideal para la epidemiología molecular de este organismo. Para hacer frente a todas las pre-



guntas en este aspecto, se han evaluado varios métodos moleculares para la tipificación de aislados de *A. fumigatus*. Estos métodos exploran las variaciones que ocurren naturalmente en el ADN, a través de los marcadores generados por el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y técnicas con base en PCR, como el polimorfismo al azar del ADN (RAPD), el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), análisis de secuencias específicas de ADN y secuencias repetitivas en tandem (STR), como los microsatélites. En el caso del RAPD existen problemas de interpretación y reproducibilidad debidos a las bajas temperaturas que suelen emplearse para realizar la PCR. Por eso, la mayoría de los expertos recomiendan utilizar dos técnicas de tipificación o seis fragmentos de genes diferentes a la hora de tipificar cepas.¹² Aunque se considera suficiente emplear la combinación de los métodos mencionados para la tipificación de aislados de *A. fumigatus*, Lasker propuso que el polimorfismo en los marcadores microsatélites (PMM), y el uso de la sonda *Afut 1* utilizadas por separado pueden ser reproducibles con un alto poder discriminatorio y parecen ser más útiles que otros métodos de tipificación.³⁴ En la actualidad la tipificación de secuencias multilocus (MLST) de varios genes (housekeeping) tiene un poder discriminatorio alto y, al mismo tiempo, pueden utilizarse en estudios de epidemiología mundial debido a una tasa de mutación baja en estos genes.³⁵

Algunos marcadores diseñados a partir de regiones génicas pueden ser mejores para discriminar cepas individuales, separar especies o grupos taxonómicos superiores, como el gen *CSP*, que codifica para una proteína de superficie celular. Éste ha demostrado ser un excelente marcador para la tipificación del hongo e, incluso, se ha evaluado interlaboratorios para asegurar su utilidad en la epidemiología del hongo.³⁶ Para otros fines es importante el uso de marcadores diseñados a partir de regiones no codificantes (casi

siempre porciones anónimas del genoma), que son preferibles porque no están afectadas por la presión selectiva del ambiente. Sin embargo, estos métodos poseen ciertas deficiencias que limitan su utilidad en un contexto clínico, sobre todo porque no son de fácil estandarización en diferentes laboratorios y la recopilación de datos requiere equipo especializado, y experiencia en la interpretación de datos. Por estas razones, la mayor parte de las tecnologías siguen siendo en gran medida inaccesibles para muchos laboratorios de microbiología clínica. Los marcadores moleculares más destacados para la epidemiología molecular de *A. fumigatus* se mencionan en el Cuadro 3.³⁷⁻⁴⁴

CONCLUSIONES

Los avances obtenidos en el conocimiento de la epidemiología, taxonomía y diagnóstico de la aspergilosis se han logrado gracias al uso de marcadores moleculares, debido a su mayor sensibilidad y especificidad que los métodos tradicionales. A pesar de que se han reportado numerosos marcadores moleculares para estudiar diferentes aspectos de la enfermedad, en la práctica médica aún no se utilizan porque no se han estandarizado ni validado, para asegurar que los resultados que se obtengan en cualquier laboratorio sean confiables y reproducibles. En el futuro la aplicación de estos marcadores permitirá conocer la epidemiología de la aspergilosis y disponer de herramientas para el diagnóstico, y para elegir el antifúngico adecuado para el tratamiento de esta nosología, lo que repercutirá en la disminución de la prevalencia y mortalidad de los pacientes con aspergilosis invasora.

Agradecimientos

Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México-IN219212.

Cuadro 3. Marcadores moleculares utilizados en la tipificación de aislados de *A. fumigatus*

Marcador Molecular	Utilidad	Referencia
Secuencias de la Región ITS 1 e ITS 2	Identificaron <i>A. fumigatus</i> a nivel de especie y diferenciaron al patógeno de otros hongos oportunistas	Henry y col. ³⁷
MLEE, SSDP, MSP y RAPD	Tipificación de aislados clínicos obtenidos de pacientes con aspergilosis invasora. Apoya el uso de combinación de métodos para discriminar entre aislados	Bertout y col. ³⁸
Microsatélites	Filogenia de aislados clínicos y ambientales de <i>A. fumigatus</i> . Rosehart y col. ³⁹ No hubo relación geográfica temporal entre aislados clínicos y ambientales	
AFLP	Tipificación de aislados clínicos y ambientales del aire y agua. Evidenció que los pacientes se infectaron con aislados del ambiente	Warris y col. ⁴⁰
AFLP y STR	Estudio con 55 aislados de 15 pacientes con aspergilosis invasora. Ambas técnicas mostraron que múltiples aislados de un mismo paciente tenían el mismo genotipo. AFLP es más universalmente aplicable y STRs tiene mayor poder discriminatorio en la tipificación de aislados.	de Valk y col. ⁴¹
Secuencias parciales de los genes β-tubulina, hidrofobina y calmodulina	Ánalisis filogenético de aislados de <i>A. fumigatus</i> . Útil en la clasificación de especies dentro del género <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	Yaguchi y col. ⁴²
Microsatélite (Afu3g08990), hibridación tipo Southern con la sonda (Afut1)	Tipificación de seis brotes nosocomiales de aspergilosis invasora. El marcador CSP permite diferenciar subespecies de <i>Aspergillus</i> . La filogenia fue concordante con ambos métodos.	Balajee y col. ⁴³
AFLP	Distinción entre aislados clínicos y ambientales de <i>A. fumigatus</i> . Identificación de la estructura de poblaciones y su relación con el origen geográfico	Duarte-Escalante y col. ⁴⁴

ITS: Secuencia intergénica, RAPD: Polimorfismo al azar del ADN, AFLP: Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados, STRs: Secuencias repetitivas en tandem, CSP: Proteína de superficie celular, REA: Análisis de restricción enzimática, MSP: Minisatélite-Primed, MLP: Polimorfismos de la longitud de microsatélites, MLEE: Electroforesis de enzimas multilocus, SSDP: polimorfismo de una secuencia de ADN, MLST: Tipificación por secuenciación de multilocus.

Referencias

- Kriengkauykiat J, Ito JI, Dadwal SS. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. Clin Epidemiol 2011;3:175-191.
- Bow EJ. Considerations in the approach to invasive fungal infection in patients with haematological malignancies. Br J Haematol 2008;140:133-152.
- Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V, Moghaddam A, Natara-Jan-Amé S, Fohrer C, et al. Factors Associated with Overall and Attributable Mortality in Invasive Aspergillosis. Clin Infect Dis 2008;47:1176-1184.
- Valdez JM, Scheinberg P, Nunez O, Wu CO, Young NS, Walsh TJ. Decreased Infection-Related Mortality and Improved Survival in Severe Aplastic Anemia in the Past Two Decades. Clin Infect Dis 2011;52:726-735.
- Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. Haematologica 2006;91:1068-1075.
- Arza FS, Coria Lorenzo JJ, Rosales Uribe RE, Gómez Barreto D. Aspergilosis invasiva en el paciente pediátrico oncológico: Revisión del tema a propósito de un caso. Rev Enfer Infec Pediatr 2006;9:80-92.
- Reséndiz J. Utilidad de la detección de galactomananos por ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en pacientes neutropénicos ingresados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Tesis de Maestría. ENCB del IPN, México 2010.
- Latgé JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends Microbiol 2001;9:382-389.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, García-Effron G, Lopez JF, Grimalt JO, Cuenca-Estrella JM, et al. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. Steroids 2008;73:339-347.
- Leenders AC, Van Belkum A, Behrendt M, Luijendijk A, Verbrugh HA. Density and Molecular Epidemiology of As-



- pergillus* in Air and Relationship to Outbreaks of Aspergillus Infection. J Clin Microbiol 1999;37:1752-1757.
11. Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse É, Bretagne S. Microsatellite Markers for Typing *Aspergillus fumigatus* Isolates. J Clin Microbiol 1998;36:2413-2418.
 12. Varga J. Mating type gene homologues in *Aspergillus fumigatus*. Microbiology 2003;149:816-819.
 13. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. Use of Real-Time PCR on Blood Samples for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. Clin Infect Dis 2001;33:1504-1512.
 14. Rantakokko-Jalava K, Laaksonen S, Issakainen J, Vauras J, Nikoskelainen J, Viljanen MK, et al. Semiquantitative Detection by Real-Time PCR of *Aspergillus fumigatus* in Bronchoalveolar Lavage Fluids and Tissue Biopsy Specimens from Patients with Invasive Aspergillosis. J Clin Microbiol 2003;41:4304-4311.
 15. Spiess B, Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Seifarth W, Zeilfelder U, et al. Development of a LightCycler PCR Assay for Detection and Quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in Clinical Samples from Neutropenic Patients. J Clin Microbiol 2003;41:1811-1818.
 16. Buitrago MJ, Gómez-López A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detección de *Aspergillus spp* mediante PCR en tiempo real en un modelo murino de infección pulmonar. Enferm Infect Microbiol Clin 2005;23:464-468.
 17. Scotter JM, Chambers ST. Comparison of Galactomannan Detection, PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Real-Time PCR for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in a Neutropenic Rat Model and Effect of Caspofungin Acetate. Clin Diagn Lab Immunol 2005;12:1322-1327.
 18. Baskova L, Landlunger C, Preuner S, Lion T. The Pan-AC assay: a single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. J Med Microbiol 2007;56:1167-1173.
 19. Serrano R, Gusmão L, Amorim A, Araújo R. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section Fumigati. BMC Microbiology 2011;11:82 (consultado 2011 Oct 8). Disponible en <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/82>
 20. Balajee SA, Grabskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. Nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell 2005;4:625-632.
 21. Denning DW, Venkateswaran K, Oakley L, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:1364-1368.
 22. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure. Emerg Infect Dis 2009;15:1068-1076.
 23. Lai CC, Tan CK, Huang YT, Shao PL, Hsueh PR. Current challenges in the management of invasive fungal infections. J Infect Chemother 2008;14:77-85.
 24. Garcia-Effron G, Dilger A, Alcazar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS. Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2008;46:1200-1206.
 25. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. Environmental Study of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergilli* in Austria, Denmark, and Spain. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4545-4549.26. Howard SJ, Arendrup MC. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. Med Mycol 2011;49(Suppl 1):S90-95.
 27. Díaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. A Point Mutation in the 14α-Sterol Demethylase Gene cyp51A Contributes to Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1120-1124.
 28. Mellado E, García-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Substitutions at Methionine 220 in the 14α-Sterol Demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* Are Responsible for Resistance In Vitro to Azole Antifungal Drugs. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2747-2750.
 29. Balashov SV, Gardiner R, Park S, Perlin DS. Rapid, High-Throughput, Multiplex, Real-Time PCR for Identification of Mutations in the cyp51A Gene of *Aspergillus fumigatus* That Confer Resistance to Itraconazole. J Clin Microbiol 2005;43:214-222.
 30. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A New *Aspergillus fumigatus* Resistance Mechanism Conferring In Vitro Cross-Resistance to Azole Antifungals Involves a Combination of cyp51A Alterations. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1897-1904.
 31. Klaassen CH, de Valk HA, Curfs-Breuker IM, Meis JF. Novel mixed-format real-time PCR assay to detect mutations conferring resistance to triazoles in *Aspergillus fumigatus* and prevalence of multi-triazole resistance among clinical isolates in the Netherlands. J Antimicrob Chemother 2010;65:901-905.
 32. Camps SMT, van der Linden JWM, Li Y, Kuijper E, van Dissel JT, Verweij PE, et al. Rapid Induction of Multiple Resistance Mechanism in *Aspergillus fumigatus* during Azole Therapy: a Case Study and Review of the Literature. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:10-16.
 33. Escribano P, Recio S, Peláez T, Bouza E, Guinea J. *Aspergillus fumigatus* Strains with Mutations in the cyp51A Gene Do Not Always Show Phenotypic Resistance to Itraconazole, Voriconazole, or Posaconazole. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:2460-2462.
 34. Lasker BA. Evaluation of Performance of Four Genotypic Methods for Studying the Genetic Epidemiology of *Aspergillus fumigatus* Isolates. J Clin Microbiol 2002;40:2886-2892.
 35. Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NAR, et al. Multilocus Sequence Typing of the

- Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2007;45:1469-1477.
36. Hurst SF, Kidd SE, Morrissey CO, Snelders E, Melchers WJG, Castelli MV, et al. Interlaboratory Reproducibility of a Single-Locus Sequence-Based Method for Strain Typing of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2009;47:1562-1564.
 37. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* 2000;38:1510-1515.
 38. Bertout S, Renaud F, Barton R, Symoens F, Burnod J, Piens MA, et al. Genetic Polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in Clinical Samples from Patients with Invasive Aspergillosis: Investigation Using Multiple Typing Methods. *J Clin Microbiol* 2001;39:1731-1737.
 39. Rosehart K, Richards MH, Bidochka MJ. Microsatellite analysis of environmental and clinical isolates of the opportunist fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 2002;51:1128-1134.
 40. Warris A, Klaassen CHW, Meis JFGM, de Ruiter MT, de Valk HA, Abrahamsen TG, et al. Molecular Epidemiology of *Aspergillus fumigatus* Isolates Recovered from Water, Air, and Patients Shows Two Clusters of Genetically Distinct Strains. *J Clin Microbiol* 2003;41:4101-4106.
 41. de Valk HA, Meis JFGM, de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CHW. Comparison of Two Highly Discriminatory Molecular Fingerprinting Assays for Analysis of Multiple *Aspergillus fumigatus* Isolates from Patients with Invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2007;45:1415-1419.
 42. Yaguchi T, Oiré Y, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K. Molecular Phylogenetics of Multiple Genes on *Aspergillus* Section *Fumigati* Isolated from Clinical Specimens in Japan. *Jpn J Med Mycol* 2007;48:37-46.
 43. Balajee SA, Tay ST, Lasker BA, Hurst SF, Rooney AP. Characterization of a Novel Gene Strain Typing Reveals Substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. *Eukaryot Cell* 2007;6:1392-1399.
 44. Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Nava Ramírez O, Córdoba S, Reijojo N, Arenas R, et al. Population structure and diversity of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources and geographic origins. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 2009;104:427-433.