

# Genotipificación de aislamientos clínicos de *Aspergillus flavus* y su relación con aislamientos ambientales de un centro oncohematológico

Nicolás Refojo<sup>a</sup>, Esperanza Duarte-Escalante<sup>b</sup>, María Cecilia Dignani<sup>c</sup>, Alejandra I. Hevia<sup>a</sup>, Rubén A. Abrantes<sup>a</sup>, Graciela Davel<sup>a</sup>, Cristina Canteros<sup>a</sup>, María Guadalupe Frías de León<sup>d</sup>, Gustavo Acosta-Altamirano<sup>d</sup>, Gerardo Zúñiga<sup>e</sup> y María del Rocío Reyes-Montes<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Micología, INEI ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Departamento de Microbiología-Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F., México

<sup>c</sup> Departamento de Enfermedades Infecciosas, Institución de Diagnóstico y Tratamiento de Pacientes Oncohematológicos, Buenos Aires, Argentina

<sup>d</sup> División de Investigación, Hospital Juárez de México, México D.F., México

<sup>e</sup> Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

## R E S U M E N

### Palabras clave:

*Aspergillus flavus*  
Variabilidad genética  
Relación genética  
Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados  
ADN polimórfico amplificado al azar  
Infección nosocomial

**Antecedentes:** Durante un período de 4 meses, y mientras se llevaba a cabo un muestreo ambiental de aire, se diagnosticaron 2 casos de aspergilosis por *Aspergillus flavus* en un centro oncohematológico de Buenos Aires, Argentina.

**Objetivos:** Conocer la variabilidad y la relación genética entre los aislamientos clínicos y los ambientales obtenidos en el centro oncohematológico.

**Métodos:** Se utilizaron 2 técnicas de genotipificación con diferente poder discriminatorio (RAPD y AFLP). Una matriz de similitud genética fue calculada usando el método de Jaccard y fue la base para la construcción de un dendrograma por el método de UPGMA. Se estimó el nivel de variabilidad genética por medio del porcentaje de loci polimórficos, número de alelos efectivos y heterocigosidad esperada, y el índice de asociación ( $I_A$ ).

**Resultados:** El dendrograma mostró que los aislamientos de *A. flavus* recuperados de los pacientes no se relacionaron genéticamente con los del ambiente nosocomial. Los valores más altos de diversidad genética correspondieron a los aislamientos ambientales. El  $I_A$  estimado para todos los aislamientos sugiere eventos de recombinación.

**Conclusiones:** Los pacientes 1 y 2 no fueron infectados con los aislamientos obtenidos del ambiente hospitalario. Los aislamientos clínicos y ambientales de *A. flavus* mostraron alta variabilidad genética entre ellos.

## Genotyping of clinical isolates of *Aspergillus flavus* and its relationship with environmental isolates of an oncohematological center

### A B S T R A C T

### Keywords:

*Aspergillus flavus*  
Genetic variability  
Genetic relationship  
Amplified fragment length polymorphism  
Random-amplified polymorphic DNA  
Nosocomial infection

**Background:** During 4 months, and while conducting an environmental sampling of air, 2 cases of aspergilosis by *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) were diagnosed at an oncohematological center in Buenos Aires, Argentina.

**Aims:** The aim of this study was to know the variability and the genetic relationship between the clinical and environmental isolates, obtained in the oncohematological center.

**Methods:** Two genotyping techniques of different discriminatory power (RAPD and AFLP) were used. A genetic similarity matrix was calculated using Jaccard method and was the basis for the construction of a dendrogram by UPGMA. The level of genetic variability was assessed by measuring the percentage of polymorphic loci, number of effective allele, expected heterozygosity and association index test ( $I_A$ ).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: remoa@unam.mx (M.R. Reyes-Montes).

**Results:** The dendrogram reveals that the *A. flavus* isolates recovered from the patients were not genetically related to those gotten from the rooms occupied by the patients. The environmental isolates had higher values of genetic diversity than the clinical isolates. The  $I_A$  estimated for all the isolates suggest that recombination events occurred.

**Conclusions:** Patients 1 and 2 were not infected with isolates from the nosocomial environment. Clinical and environmental isolates of *A. flavus* showed high genetic variability among them.

Las especies del género *Aspergillus* están distribuidas ampliamente en el medio ambiente, y cerca de 250 especies se han identificado, de las que más de 40 están documentadas como causantes de enfermedad en el ser humano<sup>3</sup>. La inhalación de conidios de *Aspergillus* por el huésped puede inducir manifestaciones alérgicas, colonización, o infecciones invasivas en función de su inmunidad<sup>24</sup>. Las infecciones por *Aspergillus* se registran con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos y estas son causadas por *Aspergillus fumigatus* (80%), seguido por *Aspergillus flavus* (15-20%) y en menor medida por *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus*<sup>24</sup>. En Estados Unidos, *A. fumigatus* es el agente etiológico más frecuente de la aspergilosis, mientras que *A. flavus* es el patógeno predominante en países del Medio Oriente, África y el sudeste de Asia, por su habilidad para sobrevivir en condiciones climáticas áridas y secas<sup>21,22</sup>. *A. flavus* es una de las especies que tiene afinidad por un amplio rango de huéspedes incluyendo el ser humano, los animales y las plantas, además de ser el patógeno que está involucrado con mayor frecuencia en la producción de aflatoxinas y es capaz de causar otras enfermedades en personas inmunocompetentes tales como sinusitis fúngica indolente, queratitis, otitis y oncomicosis<sup>1,7,15</sup>.

La tipificación molecular de los aislamientos clínicos y ambientales de *A. flavus* y *A. fumigatus* ha proporcionado información importante sobre aspectos epidemiológicos y de salud pública, como son las fuentes de infección, las vías de transmisión, la identificación del patógeno o su resistencia a antifúngicos, lo que sin duda ha coadyuvado a implementar medidas de prevención de la infección en personas susceptibles. Entre las técnicas moleculares que han sido aplicadas en la genotipificación de *A. flavus*, destaca el empleo de la técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para distinguir *A. flavus* de otras especies relacionadas, así como inferir sus relaciones filogenéticas y discriminar entre aislamientos de la misma o diferentes especies<sup>4,6,10,28,33</sup>. Otra técnica utilizada ha sido el RAPD (*Random-Amplified Polymorphic DNA*), que a pesar de presentar problemas en su reproducibilidad, ha permitido la tipificación exitosa de aislamientos clínicos y ambientales de *A. flavus*, e incluso se ha utilizado para corregir identificaciones equivocadas de aislamientos de otras especies registradas como *A. flavus*<sup>2,5,11,19,34,48</sup>. El AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) también ha sido aplicado en estudios de diversidad y estructura genética de poblaciones de *Aspergillus*<sup>12,32</sup>. Otra de las técnicas empleadas es el análisis de microsatélites y la secuenciación de regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) o de genes específicos, que son técnicas con mayor poder de discriminación en la tipificación de *A. flavus* y en la identificación de especies estrechamente relacionadas con este hongo<sup>4,5,13,16,25,36,39,40,43,45</sup>. Aunque cada una de estas técnicas posee diferentes niveles para la tipificación de microorganismos, actualmente se utilizan 2 o más técnicas moleculares como estrategia para lograr una tipificación más eficiente de los aislamientos de *A. flavus* y otras especies, como es el caso de la caracterización por *multilocus enzyme electrophoresis*, RAPD y *sequence-specific DNA primers*, o RAPD y *short sequence repeat*<sup>16,41</sup>. Considerando estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue genotipificar aislamientos clínicos y ambientales de *A. flavus* obtenidos en la Institución de diagnóstico y tratamiento de pacientes oncohematológicos de Buenos Aires,

Argentina, utilizando el AFLP y RAPD. Además, fue de nuestro interés estimar la diversidad y relación genética entre los aislamientos.

## Materiales y métodos

### Aislamientos fúngicos

Se utilizaron 6 aislamientos clínicos obtenidos de 2 pacientes oncohematológicos (1 y 2) internados en la Institución de diagnóstico y tratamiento de pacientes oncohematológicos en el período de febrero a mayo de 2005, ambos con diagnóstico de aspergilosis probable según los criterios de consenso de EORTC/MSG<sup>8</sup>. El paciente 1 estuvo internado en la habitación 23 y el paciente 2 en las habitaciones 10 y 22. Las habitaciones 22 y 23 son contiguas, y ninguna de ellas posee equipamiento de filtración de aire ni presión positiva. Ambas habitaciones comparten un baño externo con ducha, contiguo a la habitación 23, al que acceden los pacientes por el mismo pasillo. El personal de limpieza reporta que toda superficie mojada o húmeda es secada luego de haberse utilizado la ducha.

Los pacientes presentaron, durante su estancia, sinusitis y cuadro neumónico. Cinco aislamientos de *A. flavus* fueron obtenidos a partir de diferentes muestras clínicas del paciente 1, y un aislamiento a partir de lavado broncoalveolar del paciente 2. Seis aislamientos ambientales de *A. flavus* fueron recuperados de muestras de aire, tomadas tanto en las habitaciones referidas anteriormente, como en otros sitios dentro y fuera del nombrado nosocomio, entre el 1 de noviembre de 2004 y el 30 de noviembre de 2005. Las muestras de aire se tomaron con el dispositivo portátil SAS Super-90 (Pbi Internacional, Milán, Italia) según las indicaciones del fabricante, a razón de 200 l por muestra y descontaminando el equipo con alcohol isopropílico al 70% entre cada toma de muestra. La muestra ambiental del baño compartido por las habitaciones 22 y 23 fue muestreada con idéntica metodología; sin embargo, no se recuperó ningún aislamiento de *A. flavus*.

El medio de cultivo utilizado en el muestreo fue agar extracto de malta al 2% con cloranfenicol (250 mg/l). Las placas fueron incubadas durante una semana a 28 °C con observación diaria. Como testigos externos, se utilizaron 2 aislamientos clínicos de *A. flavus* provenientes de México. Las características y los datos de recogida de las diferentes muestras y el aislamiento de los hongos se indican en la tabla 1.

Todos los aislamientos fueron identificados por sus características macro y micromorfológicas utilizando las claves de Raper y Fennell<sup>37</sup> y Klich y Pitt<sup>23</sup>. Los aislamientos fueron conservados en agua y medio de cultivo con aceite mineral, y depositados en las colecciones de cultivos fúngicos del Departamento de Micología del INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán y del Laboratorio de Micología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

### Obtención de ADN

Los aislamientos fueron cultivados en agar papa dextrosa (Bioxón, México D.F., México) durante 3 días a 28 °C. A partir de estos

**Tabla 1**  
Origen y fecha de recolección de las muestras de los aislamientos de *A. flavus*

Número de aislamiento	Origen	Fecha de recolección de la muestra
073117	Paciente 1 (hisopado nasal)	04/02/05
073113	Paciente 1 (hisopado nasal)	10/02/05
073114	Paciente 1 (biopsia seno maxilar)	18/02/05
073115	Paciente 1 (biopsia fosa nasal)	18/02/05
073109 A	Aire interno (habitación 22)	12/11/04
073109 B	Aire interno (habitación 22)	12/11/04
073116	Paciente 1 (biopsia fosa nasal)	07/03/05
073118	Paciente 2 (lavado broncoalveolar)	03/05/05
073111	Aire externo (patio)	25/02/05
073110	Aire externo (vereda)	25/02/05
073112	Aire interno (pasillo del quirófano)	27/05/05
MM-41	Broncoaspirado <sup>a</sup>	23/10/04
MM-44	Biopsia pulmonar <sup>a</sup>	12/09/04

Paciente 1: internado en la habitación 23 (contigua a la 22). Paciente 2: internado en habitaciones 10 y 22.

<sup>a</sup> México.

cultivos se obtuvo una suspensión de conidios, agregando a cada tubo 1 ml de tampón PBS adicionado con 0,5% de Tween® 20 y agitando en vórtex (Daigger Vortex Genie 2®, Scientific Industries Inc., NY, Estados Unidos). Posteriormente, se sembró en medio líquido YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%), y se incubó a 37 °C con agitación durante 2 días o hasta observar crecimiento micelial. La biomasa micelial de cada aislamiento se filtró al vacío utilizando papel filtro estéril en un embudo Büchner, realizando 2 lavados con agua milliQ® estéril hasta eliminar la humedad.

Posteriormente, la extracción del ADN se llevó a cabo con el Kit DNeasy® Plant Mini (Qiagen, TX, Estados Unidos) de la siguiente manera: 100 mg de masa micelial fueron depositados en tubos de 1,5 ml conteniendo 0,2 g de perlas de vidrio estériles de 400 a 455 µm de diámetro (Sigma, MO, Estados Unidos) y se agregaron 400 µl del tampón de extracción AP1 (Kit DNeasy® Plant Mini [Qiagen, TX, Estados Unidos]). Los tubos con el micelio se colocaron en un FastPrep®24 (MP Biomedicals, CA, Estados Unidos) y se sometieron a 4 períodos de disrupción celular. Los períodos fueron de 40 s a 6 m/s, con 5 min de enfriamiento en hielo entre cada período. Después de romper el micelio, se continuó con las indicaciones descritas por el fabricante del kit. La concentración de cada muestra de ADN fue cuantificada por fluorometría y por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio (10 µg/ml), en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM), pH 8,0. El ADN se cuantificó por comparación con diferentes concentraciones del fago λ (10, 20 y 50 ng/µl) (Invitrogen, CA, Estados Unidos). Las imágenes de los geles fueron fotodocumentadas (GeneCam; Syngene, MA, Estados Unidos). Finalmente, el ADN se conservó a 4 °C.

#### Identificación molecular de los aislamientos fenotípicamente identificados como *A. flavus*

La identidad de los aislamientos de *A. flavus* incluidos en el estudio fue confirmada por la técnica PCR descrita por González-Salgado et al.<sup>14</sup>. La PCR se llevó a cabo con pequeñas modificaciones: la mezcla de reacción (25 µl) consistió en 5 ng/µl de ADN, dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 100 pmol de cada oligonucleótido FLA1 (5'-GTAGGGTTCCTAGCGAGCC-3') y FLA2 (5'-GGAAAAGATTGATTGCGTTC-3') (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) y *Taq* polimerasa 1 U (Invitrogen, CA, Estados Unidos), en amortiguador 1X. Se utilizó como testigo ADN de otros hongos relacionados (*A. fumigatus* y *A. niger*) procedentes del cepario del Laboratorio de Micología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. El programa de amplificación fue: un ciclo a 95 °C durante 5 min; 26 ciclos de

95 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 45 s, y un ciclo de extensión a 72 °C durante 5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio.

#### Random-amplified polymorphic DNA

Se utilizaron 2 oligonucleótidos, 1253 (5'-GTTTCCGCCC-3') y 1283 (5'-GCGATCCCCA-3') (Operon Technologies Inc., CA, Estados Unidos), en reacciones independientes. El programa de amplificación, las condiciones de reacción y la lectura de las bandas se realizaron de acuerdo con Reyes-Montes et al.<sup>38</sup>. Para asegurar la reproducibilidad del RAPD se llevaron a cabo ensayos independientes por duplicado.

#### Amplified fragment length polymorphism

Los análisis de AFLP se llevaron a cabo de acuerdo con lo descrito por Vos et al.<sup>46</sup>, utilizando el Kit AFLP® Analysis System I (Invitrogen, CA, Estados Unidos). Brevemente, el ADN fue cortado con las endonucleasas *EcoRI* y *MseI*. Después de la restricción, los adaptadores fueron ligados a los fragmentos obtenidos. Estos fragmentos fueron preamplificados con los oligonucleótidos *E* (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') y *M* (5'-GACGATGAGTCTGAGTAA-3'), seguido de una segunda PCR selectiva. Los oligonucleótidos selectivos fueron idénticos a los oligonucleótidos *E* o *M*, pero con 2 o 3 nucleótidos específicos adicionales en la región terminal 3'. Se utilizaron 6 combinaciones de oligonucleótidos (*E*+AA/*M*+CAT; *E*+AA/*M*+CAC; *E*+AC/*M*+CAT y *E*+AC/*M*+CTC; *E*+AC/*M*+CAC y *E*+AA/*M*+CTC). El oligonucleótido *E* fue marcado radiactivamente con ATP-P<sup>32</sup> y el ADN amplificado fue analizado en geles de poliacrilamida al 5%. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara BioRad Laboratories (Sequi-Gen® GT System, CA, Estados Unidos) en un tampón TBE 0.5X, pH 8,0 a voltaje constante (1.600 V) y hasta que el colorante xilen-cianol alcanzó el final del gel. Se utilizó el marcador de tamaño molecular DNA Ladder 50 bp (Invitrogen, CA, Estados Unidos). El gel se adhirió a papel filtro Whatman no. 1 y se secó al vacío en un sistema HydroTech™ Gel Drying System Model 583 (BioRad, CA, Estados Unidos). Finalmente, se expuso el gel a una placa de radiografía Kodak® X-OMAT AR FILM (35 × 43 cm) a -70 °C durante 20 h. El análisis de las bandas se realizó en la autorradiografía.

#### Análisis de datos

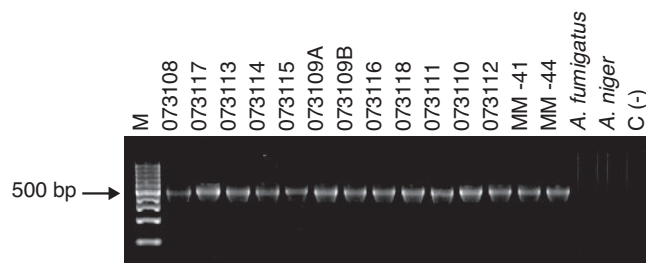
Se construyó una matriz binaria de datos [presencia (1) y ausencia (0) de bandas] para los 14 aislamientos, a partir de los

perfiles obtenidos por AFLP y RAPD. La relación genética entre los aislamientos fue obtenida por medio de un dendrograma construido por el método de UPGMA, a partir de las similitudes genéticas pareadas calculadas con el índice de Jaccard<sup>26</sup>. La confiabilidad del dendrograma se estableció por medio del coeficiente de correlación cofenética (CCCr), a partir de la prueba aleatorizada no paramétrica de Mantel<sup>29</sup>. Valores de bootstrap después de 1.000 pseudorreplicas fueron obtenidos para conocer la solidez de las agrupaciones en el dendrograma. Estos análisis fueron realizados con los programas NTSYS-PC versión 2.0<sup>42</sup> y Free Tree<sup>35</sup>. La diversidad genética de los aislamientos se estimó a partir del índice de Shannon ( $I$ ), y la heterocigosidad promedio ( $h$ ), el porcentaje de polimorfismo y el número efectivo de alelos ( $n_e$ ), con el programa POPGENE versión 1.32<sup>47</sup>. Para distinguir si los aislamientos han experimentado o no eventos de recombinación se utilizó el índice de asociación ( $I_A$ )<sup>30</sup>, implementado en el programa LIAN versión 3.5<sup>18</sup>, que mide el grado de asociación no aleatoria entre los alelos de diferentes loci (desequilibrio de ligamiento).

## Resultados

Todos los aislamientos de *A. flavus* incluidos en el estudio presentaron la macro y micromorfología típica descrita para la especie. La identificación se confirmó a través de PCR, donde con los aislamientos de *A. flavus* se amplificó la banda esperada de 500 pb, mientras que los aislamientos de *A. fumigatus* y *A. niger* fueron negativos (fig. 1).

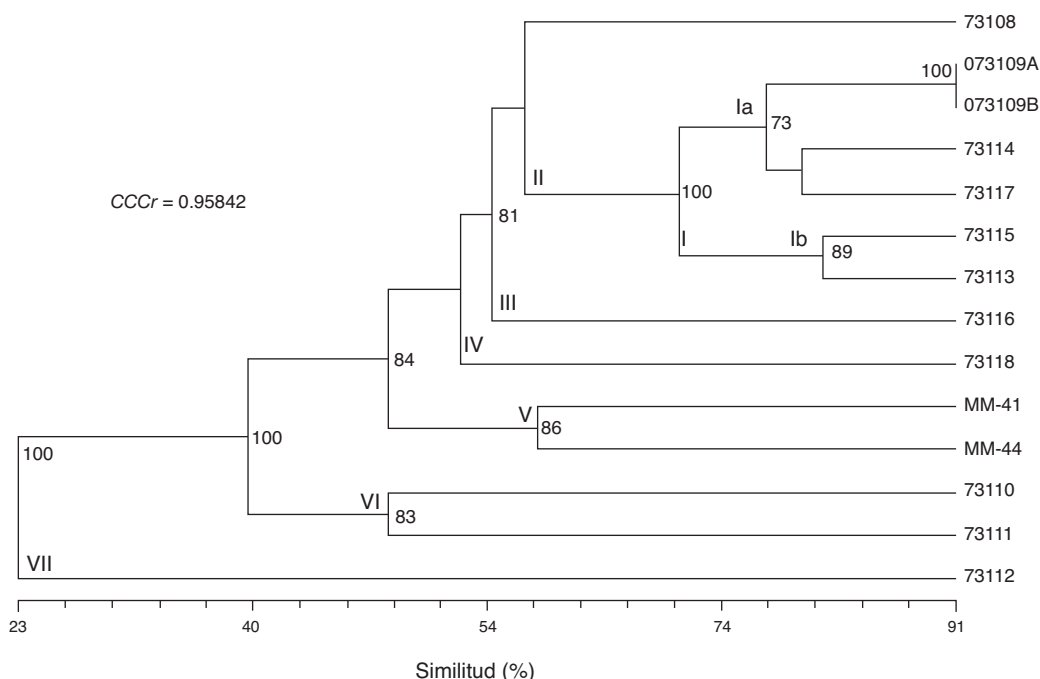
El número de bandas obtenidas por RAPD fue de 9 con cada uno de los oligonucleótidos probados y el número de marcadores obtenidos en cada amplificación selectiva del AFLP fue de 69, 60, 100, 97, 35 y 32 para las combinaciones  $E+AC/M+CAC$ ,  $E+AA/M+CAC$ ,  $E+AA/M+CTC$ ,  $E+AA/M+CAT$ ,  $E+AC/M+CAT$  y  $E+AC/M+CTC$ , respectivamente. La matriz de datos binarios estuvo integrada por un total de 411 marcadores RAPD y AFLP. La figura 2 muestra los porcentajes de similitud entre los 14 aislamientos estudiados, los cuales se asociaron en 7 grupos. El primero se formó con 4 aislamientos clínicos



**Figura 1.** Identificación molecular de los aislamientos fenotípicamente identificados como *A. flavus*, con los oligonucleótidos FLA1 y FLA2, específicos para la especie. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. C(-): testigo negativo; M: marcador de tamaño molecular DNA Ladder 100 pb; MM-41 y MM-44: testigos positivos.

y 2 ambientales, y este grupo, a su vez, se subdividió en 2 grupos. El subgrupo Ia incluyó 4 aislamientos, 2 provenientes de diferentes muestras biológicas del paciente 1 (biopsia de seno maxilar e hisopado nasal) y los otros 2 provenientes de muestras ambientales de la habitación 22. El subgrupo Ib estaba constituido por 2 aislamientos clínicos del paciente 1 (biopsia de fosa nasal e hisopado nasal). El grupo II incluyó un aislamiento del ambiente interno de la habitación 10. El grupo III estaba constituido por un aislamiento del paciente 1 (biopsia de fosa nasal). El grupo IV estaba formado por un aislamiento obtenido del paciente 2 (lavado broncoalveolar). El grupo V estaba formado por 2 aislamientos clínicos de México (broncoaspirado y biopsia pulmonar). El grupo VI, por 2 aislamientos ambientales (vereda y patio del hospital). Finalmente, el grupo VII estaba formado por un aislamiento ambiental (pasillo que conduce al quirófano). Los valores de *bootstrap* en los diferentes grupos formados presentaron valores superiores al 73% (fig. 2). El valor del CCCr ( $r=0,95842$ ;  $p=0,0004$ ) indica que el dendrograma es una buena representación de la relación genética de los aislamientos.

Los diferentes estimadores de variabilidad genética indican que los aislamientos ambientales de *A. flavus* son más variables que los aislamientos clínicos de Argentina y México. Los estimadores de



**Figura 2.** Dendrograma generado por UPGMA, a partir de los perfiles polimórficos obtenidos por RAPD-PCR y AFLP, utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard. Los números en los nodos del dendrograma muestran los porcentajes de *bootstrap* obtenidos después de 1.000 remuestreos (ver apartado de Materiales y métodos).

**Tabla 2**  
Estimadores de diversidad genética de aislamientos clínicos y ambientales de *A. flavus*

Poblaciones	P (%)	$n_e$	$I$	$h$
Ambientales (AR)	85,16	1,5049 ± 0,0988	0,4470 ± 0,0666	0,2976 ± 0,0490
Clínicos (AR)	49,15	1,3358 ± 0,1162	0,2764 ± 0,0866	0,1883 ± 0,0611
Clínicos (MX)	20,92	1,1480 ± 0,0830	0,1265 ± 0,0709	0,0867 ± 0,0486

AR: Argentina;  $h$ : heterocigosidad;  $I$ : índice de diversidad genética de Shannon; MX: México;  $n_e$ : número efectivo de alelos; P: polimorfismo.

diversidad genética ( $P$ ,  $n_e$ ,  $I$ , y  $h$ ) fueron más altos para los aislamientos ambientales que para los clínicos de Argentina y México (tabla 2).

Por último, el  $I_A$  calculado con todos los aislamientos de *A. flavus* incluidos en el presente trabajo sugiere que estos han experimentado eventos de recombinación ( $I_A = 0,033$ ;  $p < 0,05$ ).

## Discusión

La aspergilosis nosocomial se asocia con una morbilidad significativa entre los pacientes inmunocomprometidos, lo que tiene implicaciones importantes en el manejo adecuado de los enfermos. Actualmente, *A. flavus* es la segunda especie más importante del género *Aspergillus*, causante de infección invasiva, sinusitis y endoftalmítis<sup>19,34,44</sup>, por lo que existe una necesidad trascendental de llevar a cabo estudios de tipificación molecular para conocer la prevalencia del hongo en ambientes nosocomiales dada su ubicuidad<sup>17</sup>. Todos los aislamientos estudiados fueron identificados como *A. flavus* con base en sus características fenotípicas y genotípicas.

Los resultados de la tipificación molecular mostraron que 4 de los 5 aislamientos del paciente 1 están relacionados con los aislamientos de la habitación 22 (grupo I) en un 73% de similitud, mientras que el aislamiento 073116, del mismo paciente, fue incluido en el grupo III. Este resultado muestra que no se trató de una infección nosocomial, debido a la baja similitud entre estos aislamientos, lo que permite inferir que el paciente 1 tuvo una infección múltiple, probablemente con 5 genotipos diferentes. Asimismo, la ubicación del aislamiento 073118 (paciente 2) en el grupo IV del dendrograma sugiere que el paciente no fue infectado durante su hospitalización, porque su genotipo fue diferente al de los aislamientos ambientales, o bien, que no se aisló el genotipo causante de la infección. Los resultados obtenidos con los aislamientos del paciente 1 apuntan a que un mismo paciente puede albergar diferentes genotipos de *A. flavus* debido a que el hongo puede sufrir cambios durante su adaptación a los diferentes sitios de colonización<sup>43</sup>. Al respecto, Leslie et al.<sup>27</sup> han propuesto que la duración de la colonización de *A. fumigatus* en el huésped puede ser un factor importante en la producción y/o selección de cepas, ya que las condiciones microambientales de diferentes sitios anatómicos favorecen o limitan cambios fenotípicos y genotípicos en el hongo. También, este tipo de infección por *Aspergillus* está documentada en enfermos que presentan marcadas alteraciones de las vías respiratorias (fibrosis quística, cavidades pulmonares, bronquiectasias, etc.), por lo que de Valk et al.<sup>9</sup> proponen que el tracto respiratorio puede ser colonizado por genotipos diferentes de *A. fumigatus*, pero que solo uno de ellos puede invadir tejidos adyacentes y subsecuentemente diseminarse a pulmón y otros órganos<sup>31</sup>.

Por otro lado, los aislamientos obtenidos de las áreas externas del nosocomio y del pasillo del quirófano presentaron baja similitud con los aislamientos de las habitaciones 10 y 22, lo que sugiere que se trata de genotipos diferentes. Estos resultados son apoyados por los estimadores de diversidad genética (tabla 2), el  $I_A$  y por la presencia de la fase sexual de este hongo<sup>20</sup>, así como por la fuerte presión selectiva a la que están sometidos los hongos en el medio ambiente.

## Conclusiones

Los resultados del presente estudio muestran que los pacientes 1 y 2 no se infectaron con los aislamientos del ambiente hospitalario. Sin embargo, la presencia de *A. flavus* en el ambiente hospitalario debe ser considerada como un factor de riesgo importante para los pacientes.

## Declaración de los autores

Los autores declaran que el contenido de este artículo es original y que no ha sido previamente publicado, y que todos los autores han leído y aprobado este manuscrito.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) DGAPA-UNAM-IN224706-3.

## Bibliografía

1. Amaike S, Keller NP. *Aspergillus flavus*. Annu Rev Phytopathol. 2011;49:107–33.
2. Aufauvre-Brown A, Cohen J, Holden DW. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 1992;30:2991–3.
3. Balajee SA, Marr KA. Phenotypic and genotypic identification of human pathogenic aspergilli. Future Microbiol. 2006;1:435–45.
4. Bagyalakshmi R, Therese KL, Madhavan HN. Nucleotide polymorphisms associated with Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of ocular isolates of *Aspergillus flavus*. J Microbiol Methods. 2007;68:1–10.
5. Baptista PP, Santos JF, Oliveira NT, Pires AP, Motta CM, Luna-Alves Lima EA. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. Genet Mol Res. 2008;7:706–17.
6. Birch M, Nolard N, Shankland GS, Denning DW. DNA typing of epidemiologically related isolates of *Aspergillus fumigatus*. Epidemiol Infect. 1995;114:161–8.
7. Choudhary SV, Koley S, Mallick S, Bose S, Basak S. Proximal subungual onychomycosis caused by *Aspergillus flavus* in a HIV-positive patient. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2009;75:410–2.
8. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis. 2008;46:1813–21.
9. De Valk HA, Meis JF, de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CH. Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 2007;45:1415–9.
10. Denning DW, Clemons KV, Hanson LH, Stevens DA. Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of *Aspergillus fumigatus* isolates of geographically and epidemiologically diverse origin. J Infect Dis. 1990;162:1151–8.
11. Díaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Gaztelurrutia L, Villante Navarro JI, Rodríguez Tudela JL. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. J Clin Microbiol. 2000;38:2419–22.
12. Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Nava Ramírez O, Córdoba S, Refojo N, Arenas R, et al. Population structure and diversity in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolates from different sources and geographic origins. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:427–33.
13. Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. Syst Appl Microbiol. 2005;28:442–53.

14. González-Salgado A, González-Jaén T, Vázquez C, Patiño B. Highly sensitive PCR-based detection specific to *Aspergillus flavus*. *Methods Mol Biol.* 2011;739: 211–6.
15. Gordon G, Giddings NA. Invasive otitis externa due to *Aspergillus* species: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1994;19:866–70.
16. Guarro J, Sole M, Castany R, Cano J, Teixidó A, Pujol I, et al. Use of random amplified microsatellites to type isolates from an outbreak of nosocomial aspergillosis in a general medical ward. *Med Mycol.* 2005;43:365–71.
17. Hadrich I, Makni F, Sellami H, Cheikhrouhou F, Sellami A, Bouaziz H, et al. Invasive aspergillosis: epidemiology and environmental study in haematology patients (Sfax, Tunisia). *Mycoses.* 2010;53:443–7.
18. Haubold B, Hudson RR. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics.* 2000;16:847–8.
19. Heinemann S, Symoens F, Gordts B, Jannes H, Nolard N. Environmental investigations and molecular typing of *Aspergillus flavus* during an outbreak of postoperative infections. *J Hosp Infect.* 2004;57:149–55.
20. Horn BW, Moore GG, Carbone I. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia.* 2009;101:423–9.
21. Kameswaran M, al-Wadei A, Khurana P, Okafor BC. Rhinocerebral aspergillosis. *J Laryngol Otol.* 1992;106:981–5.
22. Khairallah SH, Byrne KA, Tabbara KF. Fungal keratitis in Saudi Arabia. *Doc Ophthalmol.* 1992;79:269–76.
23. Klich MA, Pitt JI. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, NSW, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing; 1988.
24. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. *Mycoses.* 2009;52: 206–22.
25. Lee CZ, Liou GY, Yuan GF. Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section *Flavi*. *Microbiology.* 2006;152:161–70.
26. Legendre P, Legendre L. Numerical ecology. Amsterdam: Elsevier; 1998.
27. Leslie CE, Flannigan B, Milne LJR. Morphological studies on clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Vet Mycol.* 1988;26:335–41.
28. Lin D, Lehmann PF, Hamory BH, Padhye AA, Durry E, Pinner RW, et al. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1596–601.
29. Manly BFJ. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. London: Chapman and Hall; 1997.
30. Maynard-Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:4384–8.
31. Menotti J, Waller J, Meunier O, Letscher-Bru V, Herbrecht R, Candolfi E. Epidemiological study of invasive pulmonary aspergillosis in a haematology unit by molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Hosp Infect.* 2005;60:61–8.
32. Montiel D, Dickinson MJ, Lee HA, Dyer PS, Jeenes DJ, Roberts IN, et al. Genetic differentiation of the *Aspergillus* section *Flavi* complex using AFLP fingerprints. *Mycol Res.* 2003;107:1427–34.
33. Moody SF, Tyler BM. Use of nuclear DNA restriction fragment length polymorphisms to analyze the diversity of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:2453–61.
34. Myoken Y, Sugata T, Fujita Y, Kyo T, Fujihara M, Kohara T, et al. Molecular epidemiology of invasive stomatitis due to *Aspergillus flavus* in patients with acute leukemia. *J Oral Pathol Med.* 2003;32:215–8.
35. Pavlíček A, Hrdá S, Flegr J. Free tree–freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol (Praha).* 1999;45:97–9.
36. Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia.* 2008;100:205–26.
37. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co; 1965.
38. Reyes-Montes MR, Bobadilla-del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, et al. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1404–8.
39. Rigo K, Varga J, Toth B, Teren J, Mesterhazy A, Kozakiewicz Z. Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *J Gen Appl Microbiol.* 2002;48:9–16.
40. Rinyu E, Varga J, Ferenczy L. Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2567–75.
41. Rodriguez E, Symoens F, Mondon P, Mallie M, Piens MA, Lebeau B, et al. Combination of three typing methods for the molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* infections. European Research Group on Biotype and Genotype of *Aspergillus*. *J Med Microbiol.* 1999;48:181–94.
42. Rohlf FJ. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Setauket, NY: Exeter Publications; 1998.
43. Rudramurthy SM, de Valk HA, Chakrabarti A, Meis JF, Klaassen CH. High resolution genotyping of clinical *Aspergillus flavus* isolates from India using microsatellites. *PLoS One.* 2011;6:e16086.
44. Thio CL, Smith D, Merz WG, Streifel AJ, Bova G, Gay L, et al. Refinements of environmental assessment during an outbreak investigation of invasive aspergillosis in a leukemia and bone marrow transplant unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000;21:18–23.
45. Tran-Dinh N, Carter D. Characterization of microsatellite loci in the aflatoxigenic fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mol Ecol.* 2000;9:2170–2.
46. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:4407–14.
47. Yeh FC, Boyle TJ. Population genetics analysis of codominant markers and dominant markers and qualitative traits. *Belgium J Bot.* 1999;129:157.
48. Yuan GF, Liu CS, Chen CC. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:2384–7.