



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de  
**MEDICINA**

CARACTERIZACIÓN DEL GEN  $\beta$ -tubulina DE AISLAMIENTOS  
AMBIENTALES DE *Aspergillus fumigatus* EN LA CIUDAD DE LIMA EN EL  
AÑO 2022-2023

CHARACTERIZATION OF THE  $\beta$ -tubulin GENE FROM ENVIRONMENTAL  
ISOLATES OF *Aspergillus fumigatus* IN LIMA 2022-2023

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO  
CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

AUTORES

MARILUZ BUSTAMANTE RAMIREZ

ANDHY CARRION INGA

MARIA EMILIA TITO TORRES

ASESOR

LIDIO EDGAR NEYRA VALDEZ

LIMA-PERÚ

2025



## **JURADO**

Presidente: DOC. JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

Vocal: MSC. MARIA DEL CARMEN QUISPE MANCO

Secretario: LIC. DIEGO BERNHARD CUICAPUZA ARTEAGA

Fecha de Sustentación: 22 de febrero de 2025

Calificación: Aprobado

**ASESOR DE TESIS**

**ASESOR**

MSC. LIDIO EDGAR NEYRA VALDEZ

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE TECNOLOGÍA MÉDICA

ORCID: 0000-0003-2086-7245

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser nuestra guía y fortaleza para concluir con este proyecto. A nuestros padres y hermanos por el apoyo incondicional que nos brindaron a lo largo de esta etapa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos de forma muy especial:

A nuestro asesor MSc. Lidio Edgar Neyra Valdez, por su paciencia, calidad y apoyo incondicional en el asesoramiento de todo el proceso, desarrollo y culminación de nuestra tesis.

Al Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) de la facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y al laboratorio de Micología Clínica del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” por brindarnos el material, las herramientas y la información necesarias para poder desarrollar nuestra investigación.

## **DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS**

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de  
**MEDICINA**

CARACTERIZACIÓN DEL GEN  $\beta$ -tubulina DE AISLAMIENTOS  
AMBIENTALES DE *Aspergillus fumigatus* EN LA CIUDAD DE LIMA EN EL  
AÑO 2022-2023

CHARACTERIZATION OF THE  $\beta$ -tubulin GENE FROM ENVIRONMENTAL  
ISOLATES OF *Aspergillus fumigatus* IN LIMA 2022-2023

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO  
CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

### AUTORES

MARILUZ BUSTAMANTE RAMIREZ

ANDHY CARRION INGA

MARIA EMILIA TITO TORRES

### ASESOR

LIDIO EDGAR NEYRA VALDEZ

LIMA-PERÚ

2025



## 11% Similitud estándar

### Fuentes

Mostrar las fuentes solapadas ⓘ

1 Internet

repositorio.upch.edu.pe

8 bloques de texto 143 palabras

2 Internet

hdl.handle.net

3 bloques de texto 33 palabras

3 Internet

moam.info

3 bloques de texto 25 palabras

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
Resumen	
Abstract	
I. Introducción	1
II. Objetivos	5
III. Material y métodos	6
IV. Resultados	10
V. Discusión	14
VI. Conclusiones	19
VII. Limitaciones	20
VIII. Recomendaciones	21
IX. Referencias Bibliográficas	22
X. Tablas, figuras y gráficos	28
Anexos	

## RESUMEN

**Antecedentes:** La aspergilosis es una de las principales causas de enfermedades fúngicas en humanos, especialmente en individuos inmunocomprometidos. *Aspergillus fumigatus* es relevante por su alta producción de conidios, que se liberan al ambiente, y es causante de infecciones respiratorias no invasivas. El uso de herramientas moleculares y bioinformáticas permite una mejor identificación y caracterización de su patogenicidad. **Objetivo:** Caracterización del gen  $\beta$ -tubulina de aislamientos ambientales de *A. fumigatus* colectados durante los años 2022 y 2023. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, con 33 aislamientos de *A. fumigatus*, identificados por características fenotípicas y moleculares. Las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina se obtuvieron del Laboratorio de Micología Clínica del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt. Se utilizaron el BLAST, SEQUENCHER y MEGA para la caracterización del gen  $\beta$ -tubulina. **Resultados:** Se analizaron 33 secuencias, encontrando 2 clados: el clado I que representa el 84.85% (n=28) de las secuencias distribuidos en 4 subclados y el clado II con un 15.1% (n=5). Al comparar con secuencias de GenBank, se reforzó la presencia de los 2 clados, agrupándolos en subclados Ia (Chile, EE. UU. y México) y Ic (Brasil) del clado I. No se encontró relación entre las variantes y el origen geográfico. **Conclusiones:** Se encontró que existe variabilidad en los aislamientos, identificándose 2 clados de *A. fumigatus* distribuidos en los distritos de Lima. Este estudio resalta la necesidad de monitorear aislamientos locales de *A. fumigatus* para detectar mutaciones asociadas a resistencia antifúngica y comprender su evolución en función de las condiciones geográficas.

Palabras clave: Hongos, *Aspergillus fumigatus*,  $\beta$ -tubulina, ambiental, tipificación molecular.

## ABSTRACT

**Background:** Aspergillosis is one of the main causes of fungal diseases in humans, especially in immunocompromised individuals. *Aspergillus fumigatus* is relevant for its high production of conidia, which are released into the environment, and it causes non-invasive respiratory infections. The use of molecular and bioinformatics tools allows a better identification and characterization of its pathogenicity.

**Objective:** Characterization of the  $\beta$ -tubulin gene from environmental isolates of *A. fumigatus* collected during the years 2022 and 2023. **Materials and methods:** A

descriptive cross-sectional study was carried out with 33 *A. fumigatus* isolates, identified by phenotypic and molecular characteristics. The  $\beta$ -tubulin gene sequences were obtained from the Clinical Mycology Laboratory of the Alexander Von Humboldt Institute of Tropical Medicine. BLAST, SEQUENCHER and MEGA were used to characterize the  $\beta$ -tubulin gene. **Results:** 33 sequences were analyzed, finding 2 clades: clade I, which represents 84.85% (n=28) of the sequences distributed in 4 subclades, and clade II with 15.1% (n=5). When comparing with GenBank sequences, the presence of the 2 clades was reinforced, grouping them into subclades Ia (Chile, USA and Mexico) and Ic (Brazil) of clade I. No relationship was found between the variants and the geographic origin.

**Conclusions:** It was found that there is variability in the isolates, identifying 2 clades of *A. fumigatus* distributed in the districts of Lima. This study highlights the need to monitor local isolates of *A. fumigatus* to detect mutations associated with antifungal resistance and understand its evolution depending on geographical conditions.

Keywords: Fungi, *Aspergillus fumigatus*,  $\beta$ -tubulin, environmental, molecular typing.

## I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas pulmonares son enfermedades infrecuentes pero graves y potencialmente letales con una alta morbimortalidad (1). Las muertes por infección de hongos representan el 6,8 % de todas las muertes mundiales convirtiéndose en un problema de salud pública y en un desafío para los profesionales de la salud (2). Las infecciones fúngicas en la piel, las uñas y el cabello afectan a casi 100 millones de personas, mientras que más de 150 millones de personas sufren de enfermedades fúngicas graves, las cuales pueden tener un impacto significativo en sus vidas o incluso ser mortales. Estas cifras subrayan la importancia de la atención médica y el tratamiento adecuados para estas condiciones (3).

*Aspergillus* es el agente causal de diversas presentaciones clínicas que abarcan desde la colonización de cavidades preexistentes, la aspergilosis broncopulmonar alérgica, afectación cutánea, otomicosis y hasta una aspergilosis invasiva, siendo *Aspergillus fumigatus* el principal agente patógeno responsable de esta micosis en humanos (4,5).

*A. fumigatus* es un hongo filamentoso muy común y ampliamente distribuido en el ambiente. Produce una gran cantidad de conidios, que son esporas de dispersión, caracterizados por su pequeño tamaño (2-3  $\mu\text{m}$ ). Debido a esto, los conidios pueden permanecer suspendidos en el aire durante períodos prolongados y viajar largas distancias impulsados por el viento. Esta capacidad de dispersión hace que *A. fumigatus* pueda contaminar fácilmente superficies expuestas al aire (6). Este hongo puede crecer en una variedad de hábitats, incluyendo plantas, materia orgánica en

descomposición, suelo y aire. También se puede encontrar en ambientes acuáticos, tanto marinos como de agua dulce. Además, *A. fumigatus* puede colonizar espacios cerrados como superficies de edificios, electrodomésticos, polvo doméstico e incluso en el agua potable (7,8).

La ubicuidad de los conidios de *Aspergillus* en el ambiente representa una preocupación significativa, ya que estos pueden ser inhalados por individuos en diversas circunstancias. Personas con condiciones médicas subyacentes como cáncer, VIH, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cirrosis hepática, y aquellos que han recibido trasplantes de órganos sólidos o tejido hematopoyético, están particularmente en riesgo de desarrollar aspergilosis invasiva, una forma severa de infección que puede alcanzar una mortalidad significativa de hasta un 80% (7).

El uso limitado de herramientas moleculares en el diagnóstico de micosis por *Aspergillus* se debe principalmente al alto costo en equipamiento y en personal capacitado necesario para su implementación y mantenimiento (9). Esto ha llevado a que la mayoría de laboratorios clínicos dependan de métodos de identificación tradicionales para caracterizar las especies de *Aspergillus*.

En estos laboratorios, la identificación tradicional se basa principalmente en criterios macro-morfológicos. Esto incluye observar las características de crecimiento de las colonias en medios específicos de agar y examinar microscópicamente los conidióforos y esporas del hongo. Sin embargo, existen limitaciones en estos enfoques tradicionales. Pueden no ser completamente precisos en casos donde los aislados de *Aspergillus* muestran una esporulación lenta o pertenecen a especies menos comunes y crípticas (10,11).

En el estudio de Bejar y col. se evaluaron 20 cepas de *A. fumigatus sensu lato* ("en sentido amplio") que fueron identificadas por su fenotipo y características macroscópicas. Estas cepas fueron aisladas de muestras seriadas de esputo, biopsias de tejido pulmonar y aspirados bronquiales de pacientes con diagnóstico clínico de aspergilosis invasiva. Para confirmar su identificación, las cepas fueron analizadas mediante qPCR, revelando que sólo el 50% de las cepas identificadas correspondían a *A. fumigatus sensu stricto* ("en sentido estricto") (12).

Won-Bok y col. desarrollaron un método de identificación molecular por qPCR para la identificación de las principales secciones de *Aspergillus* y ascomicetos filamentosos de aislados clínicos y ambientales basado en el gen  $\beta$ -tubulina teniendo como resultado reducción de tiempo de diagnóstico libre de reacciones cruzadas, que son deficiencias de la identificación molecular basada en ITS (13). Por otro lado; Lee y col. en un estudio realizado entre el año 2021 y 2022 investigaron el rendimiento diagnóstico de un ensayo de qPCR para *Aspergillus* basado en el gen  $\beta$ -tubulina en el líquido de lavado broncoalveolar el cual identificó 4 especies de *Aspergillus* (*A. fumigatus* 100%, *A. niger* 98.32%, *A. flavus* 96.64% y *A. terreus* 100%), incluidas una especie críptica (*A. tubingensis* 100%), que recientemente han demostrado ser clínicamente significativa (14).

Adicionalmente, Yang y col. reportó mutaciones puntuales en el gen de  $\beta$ -tubulina del hongo *Fusarium asiaticum* asociado con la resistencia a carbendazim. Siendo muy probable que este tipo de mutaciones esté presente también en *A. fumigatus* (15).

Por lo expuesto, es importante emplear técnicas moleculares para realizar una mejor caracterización del gen de  $\beta$ -tubulina que podría ayudar tanto en la identificación precisa como en la identificación de cepas resistentes a antifúngicos de *A. fumigatus*.

## **JUSTIFICACIÓN**

*A. fumigatus* es la principal especie causante de las diversas Aspergilosis principalmente en inmunosuprimidos y pacientes con VIH. Es un hongo que se encuentra ampliamente distribuido a nivel ambiental. En la actualidad no existen reportes de estudios moleculares de *A. fumigatus* en Lima y existe evidencia que el uso de los azoles en la agricultura es un factor de selección de varias cepas resistentes al tratamiento, si bien existen algunos trabajos realizados a partir de aislamientos en muestras clínicas es importante conocer si existen variantes o subespecies de *A. fumigatus* a nivel ambiental.

A manera de estudio exploratorio, una primera aproximación sería la caracterización molecular del gen de  $\beta$ -tubulina siendo el gen más ampliamente utilizado para la identificación de este hongo. Al ser el primer estudio de aislamientos ambientales en la ciudad de Lima, nuestros resultados ayudarán a conocer las variantes presentes, para poder brindar una información actualizada y se puedan tomar medidas de prevención y control de aspergilosis en pacientes inmunosuprimidos. Es por ello que planteamos la siguiente pregunta: ¿La caracterización del gen  $\beta$ -tubulina puede ayudar a identificar variantes moleculares de *Aspergillus fumigatus* en la ciudad de Lima?

## **II. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el gen  $\beta$ -tubulina procedentes de aislamientos ambientales de *Aspergillus fumigatus* en la ciudad de Lima colectados durante los meses de junio del 2022 a junio del 2023.

### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

1. Explorar variantes moleculares del gen  $\beta$ -tubulina procedente de aislamientos ambientales de *Aspergillus fumigatus*.
2. Comparar las secuencias obtenidas de *Aspergillus fumigatus* con datos públicos disponibles en el NCBI para contextualizar los hallazgos.
3. Explorar la distribución geográfica de las variantes moleculares del gen de  $\beta$ -tubulina de *Aspergillus fumigatus*.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **DISEÑO DE ESTUDIO**

Se desarrolló un estudio descriptivo de corte transversal.

#### **LUGAR DE ESTUDIO**

El estudio se realizó en la Unidad de Genómica de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias e Ingeniería, en colaboración con el laboratorio de Micología Clínica del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt.

#### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

**Inclusión:** Aislamientos de *A. fumigatus* procedentes de la ciudad de Lima, que fueron recolectados por el proyecto: Latin American *Aspergillus fumigatus* Azole Resistance Survey in 12 countries, 20 laboratories (SIDISI 206525).

**Exclusión:** Aislamientos de *A. fumigatus* que no cuenten con secuencias completas del gen  $\beta$ -tubulina recolectados por el proyecto: Latin American *Aspergillus fumigatus* Azole Resistance Survey in 12 countries, 20 laboratories (SIDISI 206525).

#### **MUESTREO**

Durante el 2022 y 2023 se realizó el proyecto: Latin American *Aspergillus fumigatus* Azole Resistance Survey in 12 countries, 20 laboratories (SIDISI 206525) en el que se colectaron muestras ambientales de *A. fumigatus* de 16 distritos de Lima. La recolección de esporas de hongos fue realizada a través un adhesivo de aire durante un periodo entre 8 - 12 horas en los días que coinciden con

los equinoccios y solsticios estacionales del hemisferio norte. Los adhesivos con muestras de polvo fueron enviadas al laboratorio de Micología Clínica del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”. Estas fueron sembradas en agar Sabouraud Dextrosa con cloranfenicol (ASD) y colocadas a 37 °C por 7 días, las colonias compatibles con *Aspergillus*, fueron resembradas en ASD y colocadas a 43 °C. Las colonias que crecieron fueron evaluadas macroscópicamente y microscópicamente para realizar la identificación de *A. fumigatus sensu lato*, ver Anexo 1.

Se reunieron 35 aislamientos de *A. fumigatus* que se identificaron por características fenotípicas y moleculares. La identificación molecular se realizó mediante el secuenciamiento del gen de  $\beta$ -tubulina (14).

## **TAMAÑO MUESTRAL**

Para el presente estudio, se trabajó con las 33 secuencias que cumplieron los criterios de inclusión. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del Laboratorio de Micología Clínica del Instituto de Medicina Tropical “Alexander Von Humboldt”.

## **DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES**

En el presente trabajo contamos con tres co-variables, los cuales se especifican mejor la definición operacional de cada una de ellas en la tabla 1

## **PROCEDIMIENTOS**

### **Alineamiento de secuencias de ADN**

Se inició con la revisión de las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina correspondientes a los pares de cebadores universales (Bt2a y Bt2b), posteriormente se eliminó las regiones que no tienen picos claros de nucleótidos y se alinearon las secuencias consenso mediante el uso del Software Sequencher 5.4.6. (<https://genecodes.com/>); generando productos de PCR con tamaño de 475 pb.

### **Verificación de la identificación molecular en la base de datos de genes**

Se realizó la comparación de las secuencias consenso del gen de  $\beta$ -tubulina de los aislamientos mediante análisis Nucleotide BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BLASTSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BLASTSearch&LINK_LOC=blasthome)) y se consideró el porcentaje de identidad. Así mismo se utilizó la base de datos Mycobank (<https://www.mycobank.org/>) a manera de base de datos complementaria.

### **Caracterización del gen de $\beta$ -tubulina**

La comparación de las secuencias se produjo mediante el uso del Software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; <https://megasoftware.net/>). Con los polimorfismos que se encontraron, se realizó el método de máxima verosimilitud con el modelo UPGMA para generar un árbol de similitud con 1000 réplicas Bootstrap. Los métodos de Bootstrap son un análisis estadístico que otorga intervalos de confianza a un árbol filogenético. En este caso se crea una gran cantidad de copias de las muestras y toma una cantidad de eventos, creando grupos del mismo tamaño de la muestra original con la esperanza de encontrar la distribución original de la población de la cual fue tomada la muestra (16).

## **ASPECTOS ÉTICOS**

Se solicitó la exoneración de revisión y supervisión por el Comité institucional de Ética en Investigación (CIE).

## **PLAN DE ANÁLISIS**

Para realizar la caracterización del gen  $\beta$ -tubulina de *A. fumigatus* se utilizó los programas como: Sequencher, Blast y MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; <https://megasoftware.net/>) descritos en la sección procedimientos.

La información que se adquirió durante el estudio se registró en Microsoft Excel 2016 para elaborar la base de datos los cuales fueron exportados al programa estadístico Stata 18.0.

En el programa Stata 18.0 se realizó un análisis univariado donde se resumieron las variables categóricas en términos de frecuencia relativas, absolutas y proporciones.

#### **IV. RESULTADOS**

##### **Porcentajes de similitud y de cobertura de las secuencias del gen $\beta$ -tubulina de *Aspergillus fumigatus* con la base del Genbank.**

En el estudio, el análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) reveló altos niveles de porcentaje de similitud y cobertura para las 33 secuencias evaluadas. El análisis reveló que 33 secuencias presentaron un porcentaje de cobertura  $\geq$  a 95%, siendo 30 de ellas con 100% y 3 con 99%. De igual manera se obtuvo un 93.9% (n=31) de las secuencias con un porcentaje de similitud entre 95% y 100%, y 6.1% (n=2) de las secuencias con un porcentaje de similitud de 94.22% y 89.87% respectivamente, indicando una concordancia perfecta entre las secuencias de referencias y las obtenidas. Entre las secuencias destacadas con un 100% de similitud y cobertura, se incluyen aquellas procedentes de diferentes distritos: Cercado de Lima, Los Olivos, Comas, Callao, San Juan de Miraflores, San Borja, San Miguel, San Martín de Porres, Villa María del Triunfo, La Victoria, Ate, Santiago de Surco y Lince (Tabla 2). En 3 secuencias se observaron ligeras diferencias en los porcentajes de similitud. La secuencia 635.3.1 del Rímac mostró un 89.87 % de similitud y un 99% de porcentaje de cobertura, del mismo modo las secuencias 955.4.2 y 1058.4.1 de Cercado de Lima presentaron similitudes de 96.23% y 94.22% respectivamente, y ambas mantuvieron un alto porcentaje de cobertura de 99%, ver tabla 2.

##### **Variantes moleculares**

Se generó un árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud con el modelo UPGMA en el software MEGA. Las secuencias utilizadas fueron las del

gen  $\beta$ -tubulina de *A. fumigatus* con 1000 repeticiones de “bootstrap” y también como grupo externo se utilizó la secuencia del gen  $\beta$ -tubulina de *Aspergillus flavus* AF036804.1 para evidenciar una mejor distribución de las variantes en el árbol filogenético; en este árbol (Figura 1) se observó que diferentes secuencias del gen  $\beta$ -tubulina de *A. fumigatus* se agruparon en grupos específicos, lo cual sugiere que entre las secuencias que conforman cada clado existe una relación evolutiva cercana entre ellas. Estos grupos formados generan 2 clados que se agrupan de acuerdo con su similitud genética con un alto soporte estadístico de bootstrap: donde el clado I con 84.85% (n=28) se dividió en 4 subclados, el subclado Ia con 20 secuencias (distribuidos en Cercado de Lima, Los Olivos, Comas, San Martín de Porres, San Borja, Villa María del Triunfo, Santiago de Surco y Lince), el subclado Ib con 4 secuencias (distribuidos en Cercado de Lima, San Martín de Porres, Comas y San Juan de Miraflores), el subclado Ic con 2 secuencias (distribuidos en Santiago de Surco y Callao), el subclado Id con 2 secuencias (distribuidos en Los Olivos y Rímac); el clado II con 5 (distribuidos en Cercado de Lima, San Miguel y Ate) y la secuencia de referencia externa del gen  $\beta$ -tubulina de *Aspergillus flavus* AF036804.1, se ubicó claramente separada del resto de los aislados de *A. fumigatus* ayudando esto a una mejor interpretación y organización de los clados, ver tabla 3.

### **Mutaciones**

Al desarrollar la traducción de las secuencias a nivel de exones, se encontraron los cambios a nivel de aminoácidos en 6 secuencias (635.3.1, 1075.4.1, 955.4.1, 955.4.1, 940.4.2 y 1058.4.1) siendo la mutación más común la sustitución de W4C,

en el que un triptófano (W) sustituye a la cisteína (C) en la posición 4 de la proteína, ver Tabla 4.

### **Comparación de secuencias externas**

Se realizó el análisis filogenético de máxima similitud mediante el uso del Software MEGA, comparando las secuencias del gen de  $\beta$ -tubulina procedentes de países de Latinoamérica como Brasil, Chile, México y EE.UU ubicadas en el Genbank con las secuencias de nuestro estudio. En el árbol de similitud generado se observó que las secuencias de las bases del gen  $\beta$ -tubulina se agrupó en 2 clados; el clado I conformado por 5 subclados, el subclado Ia con (n=22) secuencias donde se ubican las secuencias de los países de México (GenBank número de acceso OM892865.1), Chile (GenBank número de acceso OM400563.1) y EE.UU (GenBank número de acceso AF057315.2), el subclado Ib con (n=3) secuencias), el subclado Ic con (n=4) secuencias, en donde se observó la agrupación de la secuencia de Brasil (GenBank número de acceso MW478819.1), el subclado Id con (n=2) secuencias, el subclado Ie con (n=1) secuencia y el clado II constituido por 5 secuencias (Figura 2).

## **Distribución geográfica**

En la exploración de las secuencias de *A. fumigatus* según su distribución geográfica se obtuvieron que 30.3% (n=10) pertenecen a Cercado de Lima, 12.1% (n=4) a San Martín de Porres, 9.1% (n=3) a Los Olivos, 6.1% (n=2) a Villa María del Triunfo, 9.1% (n=3) a Santiago de Surco, 6.1% (n=2) a San Borja, 6.1% (n=2) a Comas, y La Victoria, San Miguel, Lince, Ate, San Juan de Miraflores, Rímac y Callao con 3.0% (n=1) respectivamente cada distrito (Gráfico 1). En la zonificación de los aislados se obtuvo un mayor porcentaje entre las zonas de Lima centro con 19 aislados (57.6%) y Lima norte con 9 aislados (27.3%), seguidos de Lima sur con 3 aislados (9.1%), Lima este con 1 aislados (3%) y Callao con 1 aislados (3%) (Gráfico 2) (Tabla 3). Como resultado de esta exploración no se encontró una relación directa entre la formación de los clados y su origen geográfico.

## V. DISCUSIÓN

Más del 95% de las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina presentaron un 100% de similitud y 100 % de porcentaje de cobertura, lo que sugiere una alta calidad en las secuencias obtenidas y un correcto emparejamiento con las secuencias de referencia en la base de datos establecida en Genbank (BLAST) (tabla 1). Este nivel de concordancia implica que las secuencias identificadas con el gen  $\beta$ -tubulina corresponden con precisión a *A. fumigatus*, confirmando la pureza y autenticidad de las muestras. Nuestros resultados muestran relación con el estudio de Zarrin M y col. en el cual se secuenciaron los productos del gen  $\beta$ -tubulina de los aislados de *A. fumigatus* y el análisis BLAST demostró que los productos de PCR del gen  $\beta$ -tubulina exhibieron una homología del 100 % con las secuencias asociadas en el GenBank (17).

Según investigaciones previas, el análisis del gen  $\beta$ -tubulina ha sido una herramienta común para estudiar la filogenia en *A. fumigatus*. Trabajos como los de Samson y col. y Balajee y col, han usado el gen  $\beta$ -tubulina para diferenciar especies dentro del género *Aspergillus*, concluyendo que este gen es un buen marcador para distinguir variaciones a nivel de especie, debido a sus tasas de mutación moderadas y su relevancia evolutiva (11,18)

### **Variantes moleculares**

El presente estudio ha permitido explorar la distribución geográfica de las variantes moleculares del gen de  $\beta$ -tubulina en aislamientos de *A. fumigatus* recolectadas de diferentes distritos de Lima, utilizando un enfoque filogenético. Los resultados obtenidos del análisis mediante el software MEGA revelaron una clara

diferenciación entre las secuencias, formando 2 clados lo que demostró la utilidad del gen  $\beta$ -tubulina para encontrar variantes moleculares.

Los cambios observados en las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina de *A. fumigatus* de nuestro estudio podrían estar asociados con la resistencia a antifúngicos. La resistencia a los azoles en *A. fumigatus* se adquiere a través de presión selectiva, que puede desarrollarse bajo dos condiciones diferentes: resultantes del tratamiento con fármacos antifúngicos a largo plazo o el uso generalizado de fungicidas en la agricultura (19).

En el estudio de Gonzalez JI et al. se describe 2 mutaciones a nivel de aminoácido E198A Y F200Y (sustitución de un ácido glutámico por una alanina y la sustitución de una fenil alanina por una tirosina) del gen  $\beta$ -tubulina de aislamientos ambientales de *A. fumigatus* cuyas cepas que mostraron estas sustituciones fueron resistentes a azoles (20). Las mutaciones que se han encontrado en nuestro estudio son diferentes a las encontradas por Gonzalez JI et al. cuyo significado y la importancia deben ser verificadas por secuenciación de ARNm y caracterización de proteínas, para ver si existe algún cambio en la estructura de la proteína del gen  $\beta$ -tubulina.

Si bien es cierto los estudios de variantes moleculares del gen  $\beta$ -tubulina de *A. fumigatus* son muy pocos, también existen mutaciones en el mismo gen en otras especies de *Aspergillus* como por ejemplo en *Aspergillus nidulans* en el cual se identificó una mutación a nivel de aminoácido V165A (sustitución de una valina por una alanina) que le confiere resistencia a tiabendazol (21). Así como también en otro tipo de hongos; tal es el caso de un estudio realizado en Japón en cultivos agrícolas de arroz sobre el hongo *Fusarium fujikuroi* el cual mostró mutaciones

E198K y F200Y en el gen  $\beta$ -tubulina que le confieren resistencia a benzimidazol (22). Las mismas mutaciones se presentaron en el hongo *Botrytis cinerea* aislado de cultivos agrícolas en China dándole resistencia a carbamatos de metil benzimidazol (23).

Actualmente no han sido reportados estudios de mutaciones del  $\beta$ -tubulina de *A. fumigatus* en muestras clínicas, pero sí se registran mutaciones en el gen CYP51A. Álvarez et al. dio a conocer el primer aislamiento clínico de *A. fumigatus* resistente a azoles en Chile, utilizaron el gen  $\beta$ -tubulina para el análisis filogenético y además se reportaron mutaciones en el gen *cyp51A* (TR34/L98H) dando resistencia a voriconazol e itraconazol/posaconazol (24). Las mismas mutaciones se identificaron en un estudio realizado en Ciudad de México para detectar resistencia a azoles en pacientes que tenían aspergilosis invasiva uno tenía mieloma múltiple y el otro era un receptor de trasplante de hígado, ambos sufrieron enfermedad progresiva y no respondieron al tratamiento con voriconazol (25).

Por otro lado en Perú, los resultados del estudio de Bustamante et al. el cual fue la primera evaluación de la resistencia a los azoles y las mutaciones responsables de en el gen *cyp51A*, (TR34) en la región promotora del gen y una sustitución de leucina 98 por histidina (L98H) (26). Nuestro estudio sugiere que además de estudiarse este gen *cyp51A* para estudios de resistencia, se incluya también al gen de  $\beta$ -tubulina.

### **Comparación de las secuencias**

En nuestro estudio se demostró que las secuencias extranjeras del gen  $\beta$ -tubulina extraídas del Genbank, se agruparon con los aislamientos ambientales de la ciudad

de Lima pertenecientes a nuestro estudio, lo cual indicaría que no existe una diferencia significativa con respecto al origen geográfico. Este resultado es similar al descrito por Takashi y col. quienes realizaron un estudio filogenético basado en el análisis de secuencias del gen  $\beta$ -tubulina de *A. fumigatus* en el que se observó que los aislamientos de los diferentes países Japón, USA, Alemania, Francia, India y Finlandia se agruparon en el mismo clado, demostrando una gran similitud entre ellas. (27).

Por otro lado, Valencia y col. realizaron un análisis filogenético de las secuencias de aislamientos de *A. fumigatus* de muestras clínicas y ambientales identificados mediante el gen  $\beta$ -tubulina provenientes de Argentina, Cuba y México en el cual se observó un alto grado de similitud, agrupándolos en un mismo clado (28).

### **Distribución geográfica**

Ashu y col. realizaron un estudio a nivel global en el que evalúan la variabilidad genética de *A. fumigatus* y el análisis de secuencias realizados evidenció que el flujo genético dentro de poblaciones geográficas de *A. fumigatus* es poco variables mientras que entre poblaciones geográficas la variabilidad es solo un poco mayor a lo descrito dentro de las poblaciones geográficas. La limitada variabilidad genética observada en las poblaciones geográficas puede atribuirse a la dispersión de esporas facilitada por el viento y a intervenciones humanas. *A. fumigatus* tiene la capacidad de reproducirse de manera sexual y asexual, generando una gran cantidad de ascosporas y conidiosporas que son fácilmente transportadas por el aire y dispersadas por corrientes de viento. Esto se condice con los resultados de nuestro estudio al encontrar un alto porcentaje de similitud y una baja variabilidad genética

entre los aislados evaluados en los diversos distritos de Lima y Callao. La escasa variabilidad genética entre aislados de *A. fumigatus* puede darse por varias razones interrelacionadas como la predominancia de la reproducción asexual; las condiciones ambientales similares dado que los aislados de áreas geográficas cercanas; flujos genéticos limitados por barreras físicas o climáticas lo que impide la mezcla de poblaciones (29).

## VI. CONCLUSIONES

En la exploración de las secuencias obtenidas del gen  $\beta$ -tubulina de *Aspergillus fumigatus* a partir de muestras recolectadas en distintos distritos de Lima y Callao, podemos concluir lo siguiente:

- Se evidenció la existencia de variantes moleculares del gen  $\beta$ -tubulina identificándose dos clados, el clado I se dividió en cuatro subclados y el clado II constituyó un único grupo.
- La comparación de las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina de este estudio con las secuencias obtenidas del Genbank (Brasil, Chile, México y EE.UU) mostraron que estas se agruparon en el clado I confirmando la alta distribución de este clado.
- El clado II agrupó solo cepas locales, además fue el que mostró el mayor número de sustituciones, siendo la sustitución más común un triptófano por una cisteína en la posición W4C de la proteína.
- En la exploración geográfica de los aislamientos, no se encontró una relación directa entre la zonificación o los distritos de origen y las variantes moleculares identificadas. Los distritos de Cercado de Lima y San Martín de Porres se encuentran distribuidos en ambos clados, siendo el clado I el de mayor distribución en los distritos de Lima.

## **VII. LIMITACIONES**

Dentro de las limitaciones que se nos presentó, fue no disponer de mucha información y datos publicados sobre la caracterización del gen  $\beta$ -tubulina en aislamientos de *A. fumigatus* que puedan influir en una mejor interpretación de resultados e interpretación del árbol filogenético.

Este estudio no ha realizado pruebas de susceptibilidad in vitro a fluconazol y voriconazol, sería importante evaluar si estas mutaciones encontradas en el gen de  $\beta$ -tubulina podrían estar asociadas con resistencia a los azoles.

Los aislados de nuestro estudio fueron recolectados sólo en algunos distritos de

Lima y la Provincia constitucional del Callao, es por esta razón que los resultados no son representativos para toda la población de Lima.

## VIII. RECOMENDACIONES

Los resultados hallados en este estudio sugieren la importancia de implementar el uso de pruebas moleculares en los laboratorios para todas las muestras aisladas de pacientes, el cual permitirá una identificación más precisa de *Aspergillus* a nivel de especies, asegurando un esquema de tratamiento más adecuado y efectivo.

Debido a la variabilidad existente en las secuencias de *A. fumigatus*, se resalta la necesidad de investigar más detalladamente y monitorear si las mutaciones encontradas en el gen de  $\beta$ -tubulina están asociadas con la resistencia a los azoles u otros antifúngicos, ya que en este estudio no se realizó pruebas de susceptibilidad *in vitro* a fluconazol y voriconazol. Asimismo, se podría revisar si existen mutaciones a nivel de aminoácidos que puedan alterar la estructura y función de las proteínas, lo cual podría tener implicaciones significativas en la patogenicidad y resistencia del hongo.

Por último, para comprender mejor la evolución de los aislamientos, tanto ambientales como clínicos, sería fundamental realizar este análisis con aislamientos recolectados en diversas regiones geográficas y condiciones climáticas del Perú.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fuente A, Astorga F, Arancibia F, Gutiérrez R, Andino P. Infecciones fúngicas respiratorias: experiencia del Instituto Nacional del Tórax, Santiago de Chile. Respirar [Internet]. 2021 [citado 29 de junio de 2024];13(2):55-64. Disponible en: <https://respirar.alatorax.org/index.php/respirar/article/view/73>
2. Bajpai VK, Khan I, Shukla S, Kumar P, Rather IA, Park YH, et al. Invasive Fungal Infections and Their Epidemiology: Measures in the Clinical Scenario. Biotechnology and Bioprocess Engineering [Internet]. 1 de junio de 2019 [citado 7 de mayo de 2024];24(3):436-44. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-018-0477-0>
3. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. Journal of Fungi [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 29 de junio de 2024];3(4). Disponible en: [/pmc/articles/PMC5753159/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35753159/)
4. Nasri T, Hedayati MT, Abastabar M, Pasqualotto AC, Armaki MT, Hoseinnejad A, et al. PCR-RFLP on  $\beta$ -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. J Microbiol Methods. 1 de octubre de 2015;117:144-7.
5. Etienne KA, Berkow EL, Gade L, Nunnally N, Lockhart SR, Beer K, et al. Genomic diversity of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the united states. mBio [Internet]. 1 de agosto de 2021 [citado 10 de mayo de 2024];12(4). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.01803-21>

6. 6Álvarez Ayala L. Tipificación molecular de aislados ambientales de *Aspergillus fumigatus* presentes en dos hospitales de la Ciudad de México [Internet]. [Mexico]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015 [citado 11 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://ru.dgb.unam.mx/handle/20.500.14330/TES01000725639>
7. Arevalo Casapia S. Especificación molecular de cepas aisladas de Aspergilosis pulmonar identificadas erróneamente como *Aspergillus fumigatus* según sus características fenotípicas [Internet] [Tesis de Bachiller]. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2021 [citado 11 de mayo de 2024]. Disponible en: [https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNMS\\_d89b7323da7f3c6c3eac204dfa1ac07a/Details](https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNMS_d89b7323da7f3c6c3eac204dfa1ac07a/Details)
8. Vargas MJ, Vélez AJ, Fernando VJ, Chalela BN. *Aspergillus*, un asesino desconocido. Acta Neurológica Colombiana [Internet]. 23 de mayo de 2021 [citado 10 de mayo de 2024];37(1 Supl 1):112-6. Disponible en: <https://www.actaneurologica.com/index.php/anc/article/view/1087>
9. Duarte E, Frías María, Martínez E, Acosta G, de Paz E, Reséndiz J, et al. Identification of CSP Types and Genotypic Variability of Clinical and Environmental Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Different Geographic Origins. Microorganisms [Internet]. 1 de mayo de 2020 [citado 19 de octubre de 2024];8(5):688. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7284390/>
10. Cardoza IJ. Especies de *Aspergillus* de cepas aisladas del aire de la ciudad de Piura - Perú entre julio y octubre del 2017 [Internet]. [Piura]: Universidad

Nacional de Piura; 2019 [citado 10 de mayo de 2024]. Disponible en:  
<https://core.ac.uk/download/pdf/286136904.pdf>

11. Samson A, Visagie M, Houbraeken J, Hong B, Hubka V, Klaassen W, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 1 de junio de 2014;78(1):141-73.
12. Béjar V, Villanueva F, León R., Guevara J, Uribe A, Vergaray G, et al. Identificación molecular de *Aspergillus fumigatus* aislados de pacientes con aspergilosis invasiva. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 13 de mayo de 2019;36(1):81-6.
13. Kim WB, Park C, Cho SY, Chun HS, Lee DG. Development of multiplex real-time PCR for rapid identification and quantitative analysis of *Aspergillus* species. *PLoS One* [Internet]. 2020 [citado 29 de junio de 2024];15(3):e0229561. Disponible en:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0229561>
14. Lee R, Kim WB, Cho SY, Nho D, Park C, Yoo IY, et al. Clinical Implementation of  $\beta$ -Tubulin Gene-Based *Aspergillus* Polymerase Chain Reaction for Enhanced *Aspergillus* Diagnosis in Patients with Hematologic Diseases: A Prospective Observational Study. *Journal of Fungi* [Internet]. 1 de diciembre de 2023 [citado 30 de junio de 2024];9(12). Disponible en:  
[/pmc/articles/PMC10744750/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41811111/)
15. Yang Y, Li MX, Duan YB, Li T, Shi YY, Zhao DL, et al. A new point mutation in  $\beta$ 2-tubulin confers resistance to carbendazim in *Fusarium asiaticum*. *Pestic Biochem Physiol.* 1 de febrero de 2018;145:15-21.

16. Efron B, Tibshirani R. Bootstrap Methods for standard Errors, Confidence Intervals, and Other Measures of Statistical Accuracy. *Statistical Science* [Internet]. 1986 [citado 4 de julio de 2024];1(1):54-77. Disponible en: <https://www.nielsen.sites.oasis.unc.edu/soci709/cdocs/efron.pdf>
17. Zarrin M RZ, Faramarzi S, Harooni L. Rapid Identification of *Aspergillus Fumigatus* Using Beta-Tubulin and RodletA Genes. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 15 de diciembre de 2017 [citado 19 de octubre de 2024];5(7):848. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5771284/>
18. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong SB, Yaghuchi T, Varga J, et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud Mycol* [Internet]. 2007 [citado 19 de octubre de 2024];59:39. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2275201/>
19. Garcia RRo, Gonzalez JI, Lucio J, Mellado E. *Aspergillus fumigatus* Cross-Resistance between Clinical and Demethylase Inhibitor Azole Drugs. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1 de marzo de 2021 [citado 6 de enero de 2025];87(5):e02539-20. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8090891/>
20. Gonzalez JI, Garcia Rubio R, Monzon S, Lucio J, Cuesta I, Mellado E. Multiresistance to nonazole fungicides in *aspergillus fumigatus* TR34/L98H Azole-resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 de septiembre de 2021 [citado 20 de octubre de 2024];65(9). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00642-21>

21. Jung MK, Oakley BR. Identification of an amino acid substitution in the benA,  $\beta$ -tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. Cell Motil Cytoskeleton [Internet]. 1 de enero de 1990 [citado 6 de enero de 2025];17(2):87-94. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cm.970170204>
22. Li FJ, Komura R, Nakashima C, Shimizu M, Kageyama K, Suga H. Molecular Diagnosis of Thiophanate-Methyl-Resistant Strains of *Fusarium fujikuroi* in Japan. Plant Dis [Internet]. 1 de febrero de 2022 [citado 3 de marzo de 2025];106(2):634-40. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-07-21-1501-RE>
23. Fan F, Li XB, Yang Y Y, Zhang JY, Zhu YX, Yin WX, et al. Benzimidazole-Resistant Isolates with E198A/V/K Mutations in the  $\beta$ -Tubulin Gene Possess Different Fitness and Competitive Ability in *Botrytis cinerea*. Phytopathology [Internet]. 1 de noviembre de 2022 [citado 3 de marzo de 2025];112(11):2321-8. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-04-22-0120-R>
24. Álvarez Duarte E, Cepeda N, Miranda J. Azole resistance in a clinical isolate of *Aspergillus fumigatus* from Chile. Rev Iberoam Micol. 1 de enero de 2024;
25. Gonzalez LM, Roman MC, Diaz LP, Rangel CA, Valenzuela MO, Ponce LA, et al. Azole resistance and cyp51A mutation screening in *Aspergillus fumigatus* in Mexico. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Internet]. 1 de julio de 2019 [citado 3 de marzo de 2025];74(7):2047-50. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz121>

26. Bustamante B, Illescas L, Posadas A, Campos P. Azole resistance among clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* in Lima-Peru. *Med Mycol* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 6 de enero de 2025];58(1):54-60. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/mmy/myz032>
27. Yaguchi T, Horie Y, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K. Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* [Internet]. 2007 [citado 20 de octubre de 2024];48(1):37-46. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17287721/>
28. Valencia O, Castro C, Duarte E, Frías M, Reyes M. Selection of Polymorphic Patterns Obtained by RAPD-PCR through Qualitative and Quantitative Analyses to Differentiate *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi* [Internet]. 1 de marzo de 2022 [citado 20 de octubre de 2024];8(3):296. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8949193/>
29. Ashu EE, Hagen F, Chowdhary A, Meis JF, Xu J. Global Population Genetic Analysis of *Aspergillus fumigatus*. *mSphere* [Internet]. 22 de febrero de 2017 [citado 20 de octubre de 2024];2(1):e00019-17. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5288565/>

## TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICOS

**TABLA 1: Caracterización y definición operacional de las variables.**

<b>VARIABLES</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Indicador</b>
Variante molecular	Cambio en la secuencia de ADN de un gen.	Se realizó la comparación de las secuencias consenso mediante análisis Nucleotide BLAST y el Software MEGA.	Cualitativa Nominal	Presencia Ausencia
Origen geográfico	Lugar de procedencia.	Se obtuvo de la base de datos del Laboratorio de Micología Clínica del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt.	Cualitativa Nominal	Lima sur Lima norte Lima centro Lima este Callao
Porcentaje de similitud	Nivel de igualdad en las secuencias consenso del gen de $\beta$ -tubulina	Se realizó la comparación de las secuencias consenso mediante análisis de Nucleotide BLAST.	Cuantitativa Continua	85-90% 90-95% 95%-100%

**TABLA 2: Comparación del gen  $\beta$ -tubulina utilizando el BLAST**

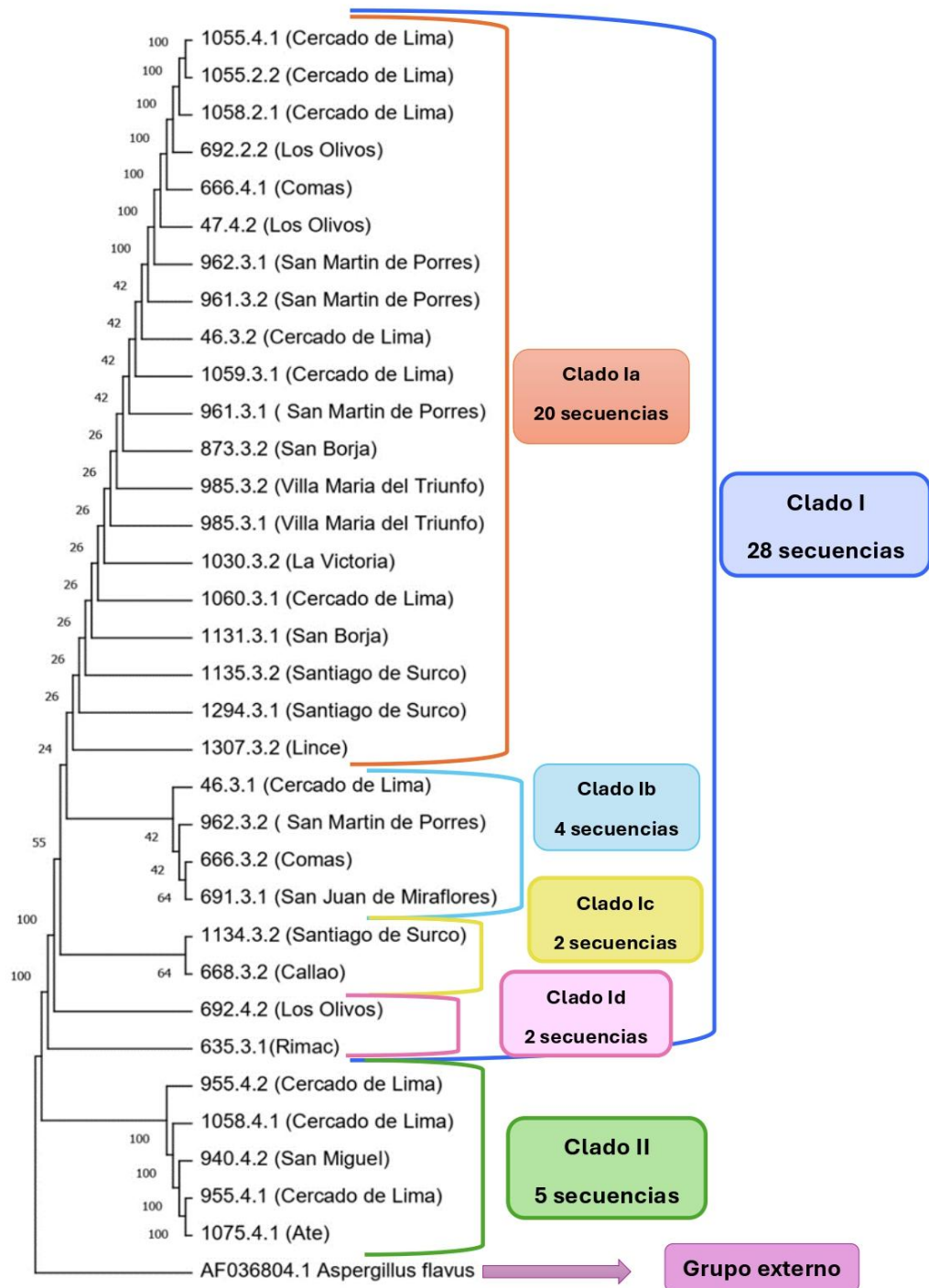
<b>Código de laboratorio</b>	<b>Porcentaje de similitud</b>	<b>Porcentaje de cobertura</b>	<b>Distrito de origen</b>
46.3.1	100 %	100 %	Cercado de Lima
46.3.2	100 %	100 %	Cercado de Lima
47.4.2	100 %	100 %	Los Olivos
635.3.1	89.87 %	99 %	Rímac
666.3.2	99.75 %	100 %	Comas
666.4.1	100 %	100 %	Comas
668.3.2	100 %	100 %	Callao
691.3.1	100 %	100 %	San Juan de Miraflores
692.2.2	100 %	100 %	Los Olivos
692.4.2	100 %	100 %	Los Olivos
873.3.2	99.75 %	100 %	San Borja
940.4.2	100 %	100 %	San Miguel
955.4.1	100 %	100 %	Cercado de Lima
955.4.2	96.23 %	99 %	Cercado de Lima
961.3.1	100 %	100 %	San Martín de Porres
961.3.2	100 %	100 %	San Martín de Porres
962.3.1	100 %	100 %	San Martín de Porres
962.3.2	100 %	100 %	San Martín de Porres
985.3.1	100 %	100 %	Villa María del Triunfo
985.3.2	100 %	100 %	Villa María del Triunfo
1030.3.2	99.75 %	100 %	La Victoria
1055.2.2	100 %	100 %	Cercado de Lima
1055.4.1	100 %	100 %	Cercado de Lima
1058.2.1	100 %	100 %	Cercado de Lima
1058.4.1	94.22 %	99 %	Cercado de Lima
1059.3.1	100 %	100 %	Cercado de Lima
1060.3.1	100 %	100 %	Cercado de Lima
1075.4.1	100 %	100 %	Ate
1131.3.1	100 %	100 %	San Borja
1134.3.2	100 %	100 %	Santiago de Surco
1135.3.2	100 %	100 %	Santiago de Surco
1294.3.1	100 %	100 %	Santiago de Surco
1307.3.2	100 %	100 %	Lince

**TABLA 3: Características genéticas y geográficas de aislamientos de *Aspergillus fumigatus***

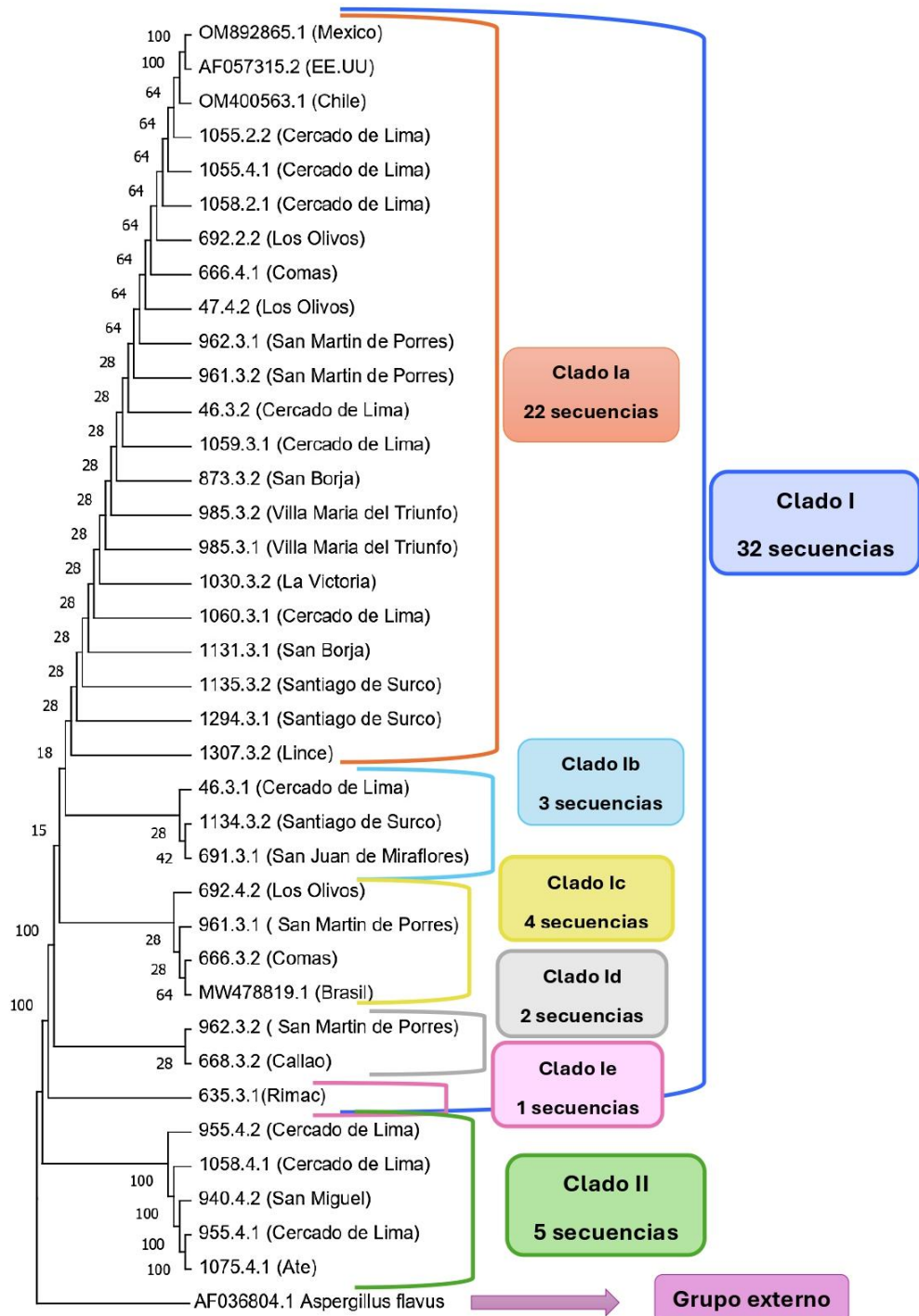
<b>Características biológicas y geográficas</b>	<b>N (%)</b>
<b>Clado</b>	
Ia	20 (60.61)
Ib	4 (12.12)
Ic	2 (6.06)
Id	2 (6.06)
II	5 (15.15)
<b>Porcentaje de cobertura</b>	
≥ 95 %	33 (100)
< 95 %	0 (0)
<b>Porcentaje de Similitud</b>	
100 - 95 %	31 (93.94)
95 - 90 %	1 (3.03)
90 - 85 %	1 (3.03)
<b>Distrito</b>	
Ate	1 (3.03)
Callao	1 (3.03)
Cercado de Lima	10 (30.30)
Comas	2 (6.06)
La Victoria	1 (3.03)
Lince	1 (3.03)
Los Olivos	3 (9.09)
Rímac	1 (3.03)
San Borja	2 (6.06)
San Juan de Miraflores	1 (3.03)
San Martín de Porres	4 (12.12)
San Miguel	1 (3.03)
Santiago de Surco	3 (9.09)
Villa María del Triunfo	2 (6.06)
<b>Zonas de Lima</b>	
Callao	1 (3.03)
Lima centro	19 (57.58)
Lima este	1 (3.03)
Lima norte	9 (27.27)
Lima sur	3 (9.09)



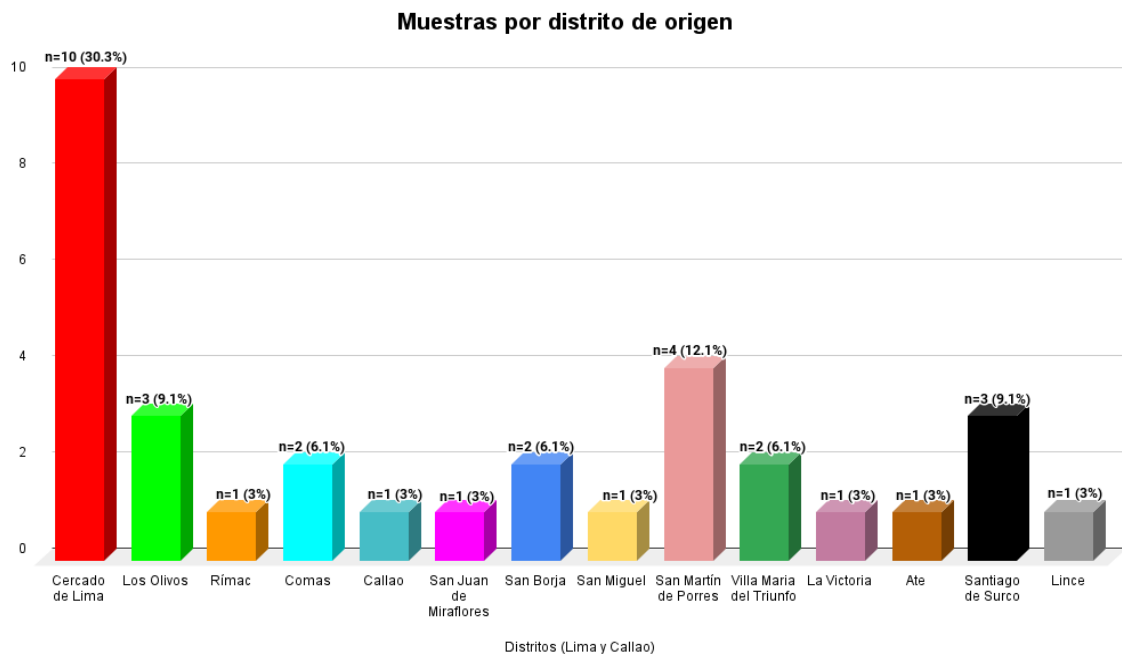
**FIGURA 1: Árbol filogenético de las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina de *Aspergillus fumigatus*.**



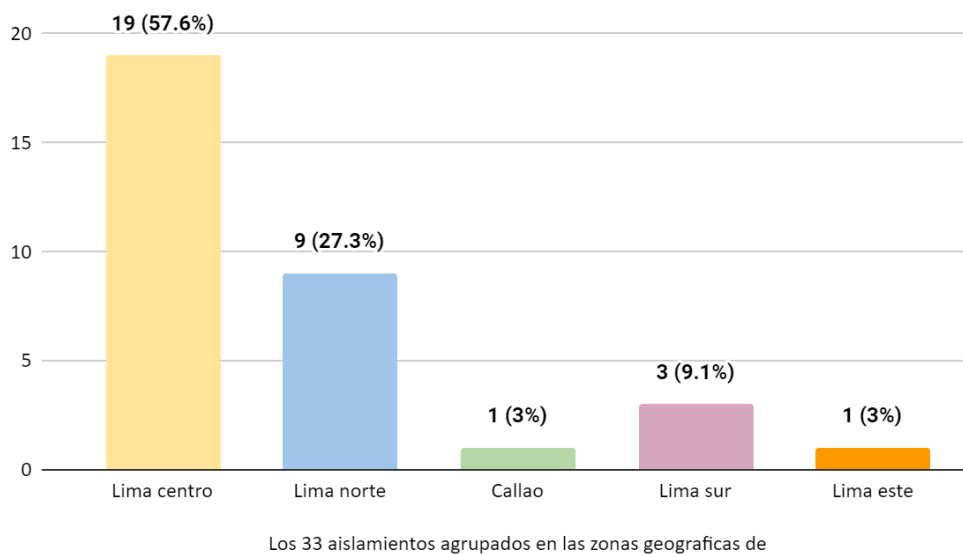
**FIGURA 2: Árbol filogenético del gen  $\beta$ -tubulina junto a las especies del GenBank: México (OM892865.1), Chile (OM400563.1) y EE. UU (AF057315.2), Brasil (MW478819.1)**



**GRÁFICO 1: Aislamientos de *Aspergillus fumigatus* por distrito de origen.**



**GRÁFICO 2: Aislamientos ambientales por zonas geográficas de Lima y Callao.**



## **ANEXOS**

### **ANEXO 1**

#### **TOMA DE MUESTRA DE AISLAMIENTOS AMBIENTALES**

- 1.- Identificar una repisa al aire libre de una ventana en la planta baja del hogar y en un parque cercano.
- 2.- Orientar el muestreador de aire de manera que la etiqueta (lamina blanca) esté en la parte superior y el lado transparente con la patafix hacia abajo.
- 3.- Asegurar el muestreador de aire a la ventana con el patafix.
- 4.- Despegar y conservar la etiqueta (lamina blanca) y dejar el muestreador de aire con el lado pegajoso hacia arriba durante 6-8 horas.
- 5.- Luego volver a colocar la etiqueta (lamina blanca) y retirar el muestreador de aire del lugar.
- 6.- Finalmente colocar los dos muestreadores dentro del sobre de devolución, en un lugar fresco y oscuro hasta que pueda ser recogido por el personal del laboratorio.

#### **CULTIVO DE LA MUESTRA**

1. Preparar el agar Sabouraud, en las condiciones que el inserto mande.
2. Colocar el adhesivo en el agar preparado.
3. Llevarlo a la incubadora a 37°C por 48 horas.
4. Se elegirán las colonias de las *A. fumigatus* que hayan proliferado.
5. Llevarlo a la incubadora a 43°C por 48 horas.
6. Se deben seleccionar 5 colonias de cada cultivo con las características de la *A. fumigatus* (colonias algodonosas o polvorientas finas que son azul verdosas o grisáceas).

7. Se raspa la colonia proliferada con una asa de siembra y se lleva al tubo de ensayo.

8. Luego de haber obtenido la muestra, se procede a realizar la extracción del ADN.

### **EXTRACCIÓN DEL ADN**

1.-Agregar 100mg de Glass bead y una perla de acero (5mm) a cada muestra.

2. Llevar la muestra a triturar en el equipo Tissue Lyser II por un periodo de 40 segundos, colocarlo al frío por unos segundos y volver a triturar por 40 segundos más.

3.-Agregar rápidamente 700 ul de buffer CTAB 2X y 4ul de 2-mercaptoetanol. Llevar al vortex.

4. Colocar los tubos a 65°C en el Thermomixer durante 1h. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

5.-Agregar 700ul de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Llevar al vortex.

6.-Centrifugar a 14000rpm por 10 minutos, transferir la parte acuosa superior a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2ml.

7.-Agregar 50ul de CTAB 10X (Utilizar tips con punta cortada). Llevar al vortex.

8.-Repetir los pasos 5 y 6.

9.-Agregar un volumen igual de isopropanol (400-500ul) a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejar a -20C° toda la noche.

10.-Centrifugar a 14000rpm por 20 minutos. Descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el pellet.

11.-Lavar el pellet con 1ml de etanol al 80% y centrifugar a 14000rpm por 10 minutos. Retirar el sobrenadante con ayuda de una pipeta. Luego lavar con etanol al 90% y centrifugar a 14000rpm. Retirar el etanol y dejar secar toda la noche.

12.-Responder con agua NFW (100ul) cada tubo.

### **CUANTIFICACIÓN, VISUALIZACIÓN Y DILUCIÓN DEL ADN**

El ADN genómico deberá ser cuantificado por espectrofotometría usando un Biofotómetro D30 Eppendorf®. La concentración en ng/uL en base a la absorbancia a la longitud de onda perteneciente (260nm). La relación de absorbancias 260/280, para determinar el nivel de pureza de las muestras y la contaminación de tipo proteica.

### **ELECTROFORESIS EN AGAROSA**

Luego de cuantificar las muestras y determinar el nivel de pureza, se realizará la electroforesis con el fin de visualizar el estado del ADN genómico y de esa manera evaluar su integridad.

- 1.-Preparar agarosa al 1% (1g de agarosa con 100ml de TAE1X).
- 2.-Calentar por 1 minuto aproximadamente.
- 3.-Dejar enfriar y agregar 1ul de GelRed, verter a la cubeta con el peine ya colocado.
- 4.-Dejar enfriar hasta que se solidifique.
- 5.-Sumergir el gel en la cámara de electroforesis y retire el peine.
- 6.-Agregue suficiente TAE1X para cubrir el gel.
- 7.-Preparar las muestras de ADN a analizar agregándoles el buffer de carga.
- 8.-Aplicar en cada pocillo las muestras preparadas.

9.-Tapar la cámara de electroforesis y conectar los electrodos.

10.-Aplicar un voltaje de 90V por 45 aprox.

11.-Desconectar la fuente de poder, sacar el gel de la bandeja y observar en un transiluminador UV.

Finalmente, se procederá a diluir las muestras con agua libre de nucleasas (NFW, Nuclease-Free Water).

### PCR Y SECUENCIAMIENTO DE MUESTRAS

Para las reacciones de PCR del complejo *Aspergillus fumigatus* se usara el Kit KOD Hot Start Master Mix con un volumen final de 25ul, incluyendo: PCR Grade Water, Sense (5')Primer (10uM), Anti-Sense (3')Primer(10uM), Temple DNA, KOD Hot Start Master Mix DNA Polymerase (0.04U/ul). Las muestras estarán diluidas a 20 ng/ul.

#### PCR - MARCADORES

MARCADORES		SECUENCIA
<b>BETA-TUBULINA</b>	Forward	Bt2a 5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'
	Reverse	Bt2b 5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'

## **CONDICIONES DE LAS REACCIONES DE PCR**

Todos los ensayos de PCR fueron realizados en termocicladores Mastercycler® Pro de Eppendorf.

1. Pre-Desnaturalización 1 ciclo, 95°C por 5 minutos
2. Desnaturalización 34 ciclos, 94°C por 30 segundos
3. Hibridación 55°C por 40 segundos
4. Elongación 72°C por 1 minuto
5. Elongación Final 1 ciclo, 72°C por 8 minutos
6. Conservación 1ciclo, 15°C Indefinido

Los productos de PCR serán visualizados en geles de agarosa al 1.5% en TBE 1X y se correrán a 90V por 50 minutos. Se utiliza como marcador de peso molecular GeneRuler100bp DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific TM. Finalmente fueron fotografiados mediante un fotodocumentador.