

Molekularne metode za tipizacijo glive *Aspergillus fumigatus* in njihova uporaba

Molecular methods for typing of *Aspergillus fumigatus* and their use

Tjaša Cerar, Romina Kofol, Tadeja Matos

Inštitut za mikrobiologijo
in imunologijo,
Medicinska fakulteta,
Univerza v Ljubljani,
Zaloška 4,
1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

doc. dr. Tadeja Matos,
dr. med. spec. klin.
mikrobiol., Inštitut
za mikrobiologijo in
imunologijo, Medicinska
fakulteta v Ljubljani,
Zaloška 4,
1000 Ljubljana,
tel.: 01-543-74-22,
e-mail: tadeja.matos@
mf.uni-lj.si

Ključne besede:

A. fumigatus, tipizacija,
razlikovalna moč, kratka
ponavljajoča se zaporedja
DNK, epidemiologija

Key words:

A. fumigatus, typing,
discriminatory power,
microsatellites,
epidemiology

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2011;
80: 586–92

Prispelo: 31. avg. 2010,
Sprejeto: 12. apr. 2011

Izvleček

Aspergillus fumigatus je povsod prisoten (ubikvitaren) mikroorganizem. Spore se nahajajo v zraku, prsti, vodi in na razpadajočem organskem materialu. Povzroča težke okužbe, ki lahko ogrozijo življenje, posebno pri imunsko oslabilih bolnikih. Označuje ga izredna pestrost genotipov. S tipizacijskimi metodami lahko pridobimo pomembne epidemiološke podatke o raznolikosti in pogostosti pojavljanja posameznih sevov, kar nam lahko pomaga pri iskanju vira okužbe pri izbruhih bolezni in pri načrtovanju načinov za njihovo preprečevanje. V prispevku navajamo najpogostejše metode, ki jih uporabljamo za genotipizacijo glive *A. fumigatus*. Opisujemo njihove prednosti in slabosti ter izsledke novjših genotipizacijskih raziskav.

Uvod

Aspergillus fumigatus je saprofitna gliva, ki se nahaja v zemlji, vodi, razpadajočem rastlinju in organskem materialu. Spore aspergilusa se razširjajo z zrakom, zato so jim ljudje nenehno izpostavljeni. Vdihovanje spor lahko vodi do nastanka različnih oblik alergijskih odzivov, posebno so jim izpostavljeni ljudje z bronhialno astmo in s cistično fibrozo. Plesen lahko kolonizira dihalne poti ali zunanji sluhovod in povzroči kronično vnetje. V obliki aspergiloma se lahko naseli v obnosnih sinusih ali že obstoječih votlinah v pljučih. Najtežje oblike okužb povzroča pri hudo imunsko oslabilih osebah; najbolj ogrožene skupine so nevtropenični bolniki po presaditvi krvotvornih matičnih celic in drugih čvrstih organov, posebno jeter, pljuč in srca. Invazivna aspergiloza se redkeje lahko razvije tudi pri nenevtropeničnih

Abstract

Aspergillus fumigatus is a ubiquitous microorganism. Spores can be found in the air, soil, water and decomposing organic material. It causes severe life-threatening infections especially in immunocompromised patients. Great diversity of genotypes is characteristic for this microorganism. Using typing methods, relevant epidemiological data regarding the diversity and frequency of the strains can be obtained, which can be useful for determining the source of infection in outbreaks and ways for its prevention. This paper presents the most frequently used methods for genotyping of *A. fumigatus*, pointing out their advantages and disadvantages with a review of recent study results.

bolnikov, posebno pri tistih, ki se zdravijo v enotah za intenzivno zdravljenje in imajo pogosto prisotnih več dejavnikov tveganja za nastanek oportunističnih okužb.

Kljub temu, da so aspergiloze pomemben del mikoz (5–10 % pri hematoloških bolnikih po neobjavljenih podatkih), objavljenih podatkov za Slovenijo ni.

Za *A. fumigatus* je značilna izredna pestrost genotipov, ki nam včasih onemogoča razumevanje poti širjenja in iskanja virov okužbe. To je še posebej težavno, saj ne vemo, ali predhodna kolonizacija dihalne sluznice vpliva na pojav invazivne bolezni ob padcu imunske odpornosti in v kolikšni meri.

Tipizacija izolatov *A. fumigatus* je pomembna za pridobitev epidemioloških podatkov o različnosti in pogostosti patogenih genotipov in pri določevanju vira okužbe pri izbruhih bolezni. S tipizacijo izolatov

lahko izboljšamo razumevanje genetskih in epidemioloških povezav med okoljskimi in kliničnimi izolati ter tako predvidimo poti širjenja. Poznavanje poti širjenja pa je pomembno pri načrtovanju načinov preprečevanja okužb.

Za genotipizacijo *A. fumigatus* so na voljo številne metode, ki se razlikujejo v hitrosti, enostavnosti izvedbe, ponovljivosti, tolmačenju rezultatov in sposobnosti metode, da z njo določimo genotip vsakega seva. Zelo pomemben dejavnik je razlikovalna moč. Z njo ocenimo, v kolikšni meri tipizacijska metoda lahko razlikuje med preiskovanimi izolati. Razlikovalna moč tipizacijske metode predstavlja verjetnost, da bosta dva naključno izbrana nesorodna izolata, izbrana iz testne populacije, določena kot različna. Izračunamo jo z uporabo Simpsonovega indeksa različnosti (*angl.* diversity, D); vrednost D 1,0 pomeni, da je s tipizacijsko metodo možno razlikovati med vsemi izolati, vrednost 0,0 pa, da so vsi izolati identičnega tipa.¹

Trenutno smernice za opredelitev genotipa še niso izoblikovane, zato je tolmačenje rezultatov subjektivno in lahko privede do napak pri določitvi genotipa. Subjektivno tolmačenje rezultatov je pogosto pri tehnikah, ki vključujejo analizo fragmentov (RAPD, RFLP, AFLP), pri katerih ni natančno določeno, kakšna razlika v vzorcu pomeni nov podtip in kakšna nov tip. Z uporabo natančnih genotipizacijskih tehnik (MLST, StrAf), pri katerih je tarča natančno določena in so tako začetniki zelo specifični, se tako lahko delno izognemo subjektivni razlagi. Dodatna prednost analize kratkih ponavljajočih se zaporedij DNK, ki je v zadnjem času ena izmed najbolj uporabljenih metod, je visoka ponovljivost. Ta omogoča epidemiološko analizo velikega števila izolatov v daljšem časovnem obdobju.

Naključno pomnožena polimorfna DNK (*angl.* random amplification of polymorphic DNA, RAPD)

Pri tej molekularni metodi uporabljamo oligonukleotidni začetnik dolžine 8 do 20

baznih parov z naključnim nukleotidnim zaporedjem ter nizko temperaturo prilaganja. Pod temi pogoji se lahko oligonukleotidni začetnik nespecifično veže na številne dele genoma. Pomnožene dele genoma ločimo z gelsko elektroforezo, pri kateri dobimo večje število fragmentov različnih velikosti. Nesorodni izolati se razlikujejo v številu in velikosti pomnoženih fragmentov genoma.² Če se profili izolatov razlikujejo v enem fragmentu, jih uvrstimo v različne genotipe.³ Glavne prednosti metode so hitra in enostavna izvedba, nizka cena ter pomnoževanje tarče, za katero ne poznamo nukleotidnega zaporedja. Slabosti metode so omejena razlikovalna moč in ponovljivost ter težave pri tolmačenju in medlaboratorijski izmenjavi rezultatov.⁴

V raziskavah so za določanje različnosti med sevi *A. fumigatus* uporabili številne oligonukleotidne začetnike (R151, NS3, R108, UBC69, RP4–2 in UBC90), med katerimi so z R108 dosegli najvišjo razlikovalno moč.^{4–12}

Tehnika RAPD je ena izmed najbolj uporabljenih, predvsem zaradi hitre in enostavne izvedbe, vendar se je potrebno zavedati njene majhne razlikovalne moči in slabe ponovljivosti.

Kratka ponavljajoča se DNK zaporedja pri *A. fumigatus* (*angl.* short tandem repeats for *A. fumigatus*, test StrAf)

Kratka ponavljajoča se DNK zaporedja pogosto najdemo v genomih evkariontov, včasih pa tudi pri prokariontih.¹³ Kratka zaporedja z 2 do 4 bazami so zaporedno ponovljena 10- do 100-krat. Izolate razlikujemo glede na število ponovitev kratkega zaporedja. Kratka ponavljajoča se zaporedja pomnožimo z verižno reakcijo s polimerazo. Oligonukleotidni začetniki vsebujejo zaporedja obrobni delov kratkih ponavljajočih se zaporedij DNK. Eden od oligonukleotidnih začetnikov je označen s fluorescentnim barvilom. Po končanem pomnoževanju produkta ločujemo s kapilarno elektroforezo, za katero sta značilni visoka ločljivost in občutljivost. Omogoča namreč ločevanje odsekov, ki se med seboj v dolžini razlikujejo le

Tabela 1: Pregled lastnosti tipizacijskih metod.⁶

Tipizacijska metoda	Razlikovalna moč	Ponovljivost	Zahtevnost	Vrstna specifičnost	Tolmačenje
RAPD	omejena	omejena	enostavna	ne	srednja
Kratka ponavljajoča se zaporedja DNK	visoka	odlična	srednja	da	lahka
RFLP brez hibridizacije	omejena	omejena	srednja	ne	težavna
Afut1-RFLP	visoka	dobra	težavna	da	težavna
MLST	dobra	odlična	srednja	da	lahka
AFLP	visoka	dobra	srednja	ne	težavna

za en nukleotid. Rezultate podajamo v obliki elektroferograma, iz katerega razberemo velikost in relativno koncentracijo analiziranih alelov. Iz velikosti odsekov lahko izpeljemo število ponovitev, ki predstavljajo genotip posameznega izolata. V raziskavi Bart-Delabesse in sod. so analizirali 4 različna kratka ponavljajoča se zaporedja DNK (A, B, C in D). Kratko ponavljajoče se zaporedje DNK A dolžine 108–158 bp je lahko vsebovalo 16–41 ponovitev zaporedja CA, kratko ponavljajoče se zaporedje DNK B dolžine 102–134 bp, 9–25 ponovitev zaporedja CA, kratka ponavljajoča se zaporedja DNK C (165–183 bp) in D (76–134 bp) pa 7–16 oziroma 7–36 ponovite zaporedja CA.¹⁴ Skupna razlikovalna moč med 100 izolati plesni *A. fumigatus* z uporabo vseh štirih ponavljajočih se zaporedji DNK je dosegla 0,994.¹³

De Valk in sod. so določali 9 različnih ponavljajočih se zaporedij DNK, po tri z dvonukleotidnimi ponovitvami, trinukleotidnimi in štirinukleotidnimi ponovitvami.¹⁵ Analizirali so 100 izolatov *A. fumigatus*. Z analizo rezultatov, pridobljenih na vseh 9 odsekih, so dosegli razlikovalno moč 0,9994.¹⁵

Metoda ima visoko moč razlikovanja, je dobro ponovljiva, srednje zahtevna za izvedbo ter vrstno specifična.¹³

Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism, RFLP), določen s elektroforezo v utripajočem električnem polju

Pri metodi RFLP uporabljamo restrikcijske encime, ki cepijo celokupno genomsko DNK izolata s prepoznavanjem zaporedja velikosti 6 baznih parov. Prednost imajo encimi, ki prepoznajo malo restrikcijskih mest. Z rezanjem genoma *A. fumigatus* lahko pridobimo do 10.000 odsekov, odvisno od restrikcijskega encima. Pri analizi se omejimo na odseke velikosti 10–50 kilobaznih parov, ker manjših od 10 kilobaznih parov ne zmoremo ločiti med sabo. Izolati *A. fumigatus* se razlikujejo v restrikcijskih vzorcih. Razlike so posledica zamenjave, vstavitve ali delecije nukleotidov v prepoznavnem zaporedju encima.¹³

V raziskavi Denning in sod. so preizkusili številne restrikcijske encime, med katerimi sta encima *XhoI* in *SalI* izkazala najvišjo stopnjo razlikovanja.¹⁶

Različica metode je RFLP s hibridizacijo, pri kateri ločene odseke prenesemo na najlonsko membrano po t. i. postopku southern blot. Na specifične odseke nato hibridiziramo označene lovke. S tem analiziramo le specifično podskupino restrikcijskih fragmentov. Ponavljajoče se sekvence DNK, ki jih uporabljajo kot lovke, predstavljajo eno izmed boljših orodij za tipizacijo sevov. Med temi so se za tipizacijo *A. fumigatus* izkazale za najustreznejše naslednje lovke: Afut1,

Afut 2, Af4, Af4A in Tafi. Te hibridizirajo z restrikcijskimi fragmenti, ki vsebujejo ponavljajočo DNK.¹⁷ Za razlikovanje izolatov *A. fumigatus* so uporabili številne kombinacije restrikcijskih encimov in lovč. Najpogosteje uporabljena kombinacija je restrikcijski encim *EcoR1* ter lovka imenovana Afut1.¹⁸ Metoda ima visoko moč razlikovanja, je ponovljiva, vrstno specifična, vendar sta izvedba metode in tolmačenje rezultatov težavna.¹³

Omenjeno metodo so v raziskavi uporabili Lasker in sod.⁴ V raziskavi so tipizirali 49 izolatov *A. fumigatus*, ki so jih pridobili v štirih bolnišničnih izbruhih. Z metodo *AfuI* RFLP so določili 40 tipov, metoda pa je imela v primerjavi s klasično RFLP analizo višjo razlikovalno moč in ponovljivost.

Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. multilocus sequence typing, MLST)

Metoda MLST primerja nukleotidni polimorfizem med regijami s petimi do sedmimi geni (navadno vzdrževalnimi; angl. house-keeping), ki se zaradi svoje pomembne funkcije v času le malo spreminjajo.¹⁹ Metoda vključuje pomnoževanje teh genov (navadno sedmih), ki jim zatem določimo nukleotidno zaporedje. Po določitvi nukleotidnega zaporedja dobimo alelni profil izolata, ki predstavlja kombinacijo alelnih različic sekveniranih genov. Iz alelnega profila določimo sekvenčni tip izolata. Polimorfizmi, ki vodijo v nastanek alelnih različic, so shranjeni v bazo podatkov in tvorijo sekvenčni tip izolata (angl. sequence type, ST). Sheme MLST številnih mikroorganizmov so dostopne na spletu (<http://www.mlst.net>). Metoda ima dobro razlikovalno moč, je ponovljiva, primerljiva med laboratoriji, srednje zahtevna ter vrstno specifična.¹³

Razmerje med izolati določamo s primerjavo alelnih profilov: sorodni izolati imajo enake oziroma podobne ST, nesorodni pa različne ST.

V raziskavi so Bain in sod. določali nukleotidno zaporedje 7 delov različnih genov *A. fumigatus* (ANXC4, BGT1, CAT1, LIP, MATI-2, SODB in ZRF2). Podrobnosti sis-

tema MLST so na voljo na spletu (<http://pubmlst.org/afumigatus>). Z opisano metodo so med 100 izolati določili 30 ST in dosegli razlikovalno moč 0,93.²⁰

Metoda MLST ni uporabna za tipizacijo *A. fumigatus* med preiskavami izbruhov, temveč za sledenje sorodnosti med genotipi.

Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. amplified fragment length polymorphism, AFLP)

Za razlikovanje med sevi *A. fumigatus* uporabljamo tudi novejšo metodo, ki temelji na določanju polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov. Metoda vključuje rezanje celokupne genomske DNK z dvema restrikcijskima encimoma, med katerima eden reže s povprečno, drugi pa z visoko frekvenco. Na lepljive konce restrikcijskih fragmentov vežemo adapterje. Restrikcijske fragmente pomnožimo z verižno reakcijo s polimerazo; eden od oligonukleotidnih začetnikov je označen s fluorescentnim barvilom. Pridelke ločimo s kapilarno elektroforezo.²¹ Tako dobimo visoko informativni skupek fragmentov DNK, velikostnega razreda 50 do 500 baznih parov. Razlike med različnimi izolati izhajajo iz razlik v številu in mestu prepoznavnih mest restrikcijskih encimov v genomu.

Metoda ima veliko moč razlikovanja, je ponovljiva, srednje zahtevna za izvedbo, vendar je tolmačenje rezultatov zahtevno in tudi ni vrstno specifično.¹³

Uporaba molekularnih tipizacijskih metod

Genotipska raznolikost

Spore aspergilov predstavljajo 0,1- do 22,0-odstotni delež vseh spor v zraku. Koncentracije nihajo glede na vremenske razmere in lokalne dejavnike. Koncentracije spor *A. fumigatus* se gibljejo od približno 5/m³ do več kot 30/m³.²² Obsežnost genetske raznolikosti so dokazali z analizo *Afut1*-RFLP približno 900 kliničnih in okoljskih izolatov *A. fumigatus*. Opredelili so kar 424 različnih

genotipov in iz različnih geografskih področij dokazali le 14 identičnih sevov. Med genotipi in geografskimi področji niso ugotovili nobene povezanosti.²³ V drugi raziskavi so analizirali 700 izolatov iz bolnišničnega okolja, med katerimi se je 85 % genotipov pojavilo samo enkrat, 15 % genotipov pa je bilo v bolnišničnem okolju prisotnih dlje.²⁴ Dokazali so, da lahko obstanejo v bolnišničnem okolju tudi več mesecev. Tako se lahko bolniki iz različnih delov bolnišnice okužijo z istim sevom. Lee in sodelavci so dokazali, da notranje okolje nudi ugodnejše razmere za preživetje spor v zraku v primerjavi zunanjim okoljem.²⁵

Tudi z analizo RFLP niso ugotovili razlik med kliničnimi in okoljskimi izolati *A. fumigatus*, kar kaže na to, da je lahko pogojno patogen vsak sev.²⁶

Viri okužbe

Glavni viri spor aspergilov v zraku so lončnice, razpadajoče rastlinje, drugi organski material in gradbišča. Od tu se v okolico sprošča veliko spor, ki jih vdihavamo.^{27,28} Poleg spor aspergilov v zraku so se kot pomemben vir bolnišničnih okužb z aspergili izkazali tudi aerosoli vode. V raziskavi so Warris in sodelavci preiskovali 96 kliničnih in okoljskih izolatov *A. fumigatus*. Genom so rezali z restrikcijskima encimoma *EcoRI* in *MseI*. Glede na rezultate so okoljske izolate razvrstili v dve skupini, ki sta vsebovali izolate iz vode in zraka. Genetska sorodnost kliničnih in okoljskih izolatov nakazuje, da so bili bolniki z invazivno aspergilozo okuženi s sevi iz vode in tudi iz zraka.²⁹

Z molekularnimi genotipizacijskimi metodami lahko ugotovimo, ali se je bolnik okužil v bolnišnici ali zunaj nje. Ujemanje genotipov iz okolja, kjer je bil bolnik hospitaliziran, in iz kliničnih vzorcev bolnika kaže na možnost bolnišnične okužbe. Ker je raznolikost genotipov *A. fumigatus* velika, je verjetnost, da je bolnik okužen z istim genotipom, kot ga najdemo v domnevnem viru, majhna.³⁰ Chalazet in sodelavci so pri 30 od 73 bolnikov z invazivno aspergilozo dokazali bolnišnični vir okužbe. Pri njih so namreč dokazali identični sev iz kliničnih vzorcev dveh bolnikov ali iz kliničnega vzorca bol-

nika in bolnišničnega okolja.²⁵ V literaturi najdemo tudi številne druge raziskave, ki skušajo pojasniti bolnišnični vir okužbe z *A. fumigatus*. Uporabljamo različne metode, kot so analiza kratkih ponavljajočih se zaporedij DNK, RAPD, RAPD, kombinirana z analizo SSDP, ali SSDP in MLEE.³¹⁻³³

Klinično-epidemiološke raziskave

Tipizacija kliničnih izolatov nam lahko daje tudi vpogled v raznolikost sevov *A. fumigatus* pri različnih skupinah bolnikov. Bolniki s cistično fibrozo so stalno kolonizirani z več genotipi *A. fumigatus* hkrati. V raziskavi so Cimon in sodelavci pokazali, da lahko pri pred kratkim koloniziranih bolnikov s cistično fibrozo najdemo več različnih genotipov kot pri bolnikih, ki so kronično kolonizirani in pri katerih lahko osamimo le omejeno število genotipov, med katerimi prevladuje en genotip. Tudi bolniki z invazivno aspergilozo so pogosto okuženi z več genotipi. Chalazet in sodelavci so pri 27 od 73 bolnikov z invazivno aspergilozo osamili številne izolate (od dva do šest), ki so pripadali različnim genotipom.²⁴

Tipizacijske metode omogočajo prepoznavanje novih vrst, ki do sedaj še niso bile opisane. Novo opisana patogena vrsta je *Aspergillus lentulus*, ki je morfološko podobna *A. fumigatus* in so jo na novo opisali z uporabo sekvenčne analize in analize RFLP mitohondrijske DNK.³⁴⁻³⁶ Osamili so jo iz različnih geografskih področij. Kasneje so ugotovili, da se od *A. fumigatus* sensu stricto loči po tem, da ni sposobna rasti na 48 °C in ima različne profile sekundarnih metabolitov. To je klinično pomembno predvsem zato, ker so vsi doslej osamljeni izolati *A. lentulus* in vitro slabše občutljivi za antimikotike kot *A. fumigatus*.^{36,37}

V Tabeli 1 združeno prikazujemo značilnosti posameznih tipizacijskih metod.¹³

Zaključek

Tipizacija izolatov je pokazala veliko genetsko raznolikost sevov *A. fumigatus*, zato moramo pri tipizaciji uporabljati metode z visoko razlikovalno močjo, kot sta metodi

RFLP – *Afut1* in AFLP ter analiza kratkih ponavljajočih se zaporedij DNK.¹³

Literatura

1. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465–6.
2. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7213–8.
3. Verweij PE, Meis JF, Sarfati J, Hoogkamp-Korstanje JA, Latge JP, Melchers WJ. Genotypic characterization of sequential *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2595–7.
4. Lasker BA. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2886–92.
5. Raclaský V, Trtková J, Rusková L, Buchta V, Bolehovská R, Vacková M, et al. Primer R108 performs best in the RAPD strain typing of three *Aspergillus* species frequently isolated from patients. *Folia Microbiol (Praha)* 2006; 51: 136–40.
6. Baddley JW, Pappas PG, Smith AC, Moser SA. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5525–9.
7. Lass-Flörl C, Grif K, Kontoyiannis DP. Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates collected in Houston, Texas, and Innsbruck, Austria: evidence of great genetic diversity. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2686–90.
8. Rath PM, Petermeier K, Verweij PE, Ansorg R. Differentiation of *Aspergillus ustus* strains by random amplification of polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2231–3.
9. 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.
10. 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.
11. Hong SB, Kim DH, Park IC, Choi YJ, Shin HD, Samson R. Re-identification of *Aspergillus fumigatus* sensu lato based on a new concept of species delimitation. *J Microbiol* 2010; 48: 607–15.
12. Vanhee LM, Symoens F, Jacobsen MD, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple typing methods for *Aspergillus fumigatus*. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 643–50.
13. de Valk HA, Klaassen CH, Meis JF. Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses* 2008; 51: 463–76.
14. Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2413–8.
15. de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4112–20.
16. 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.
17. Varga J. Molecular typing of aspergilli: Recent developments and outcomes. *Medical Mycology* 2006; 44: 149–161.
18. Girardin H, Latge JP, Srikantha T, Morrow B, Soll DR. Development of DNA probes for fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1547–54.
19. Taylor JW, Fisher MC. Fungal multilocus sequence typing—it's not just for bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 351–6.
20. Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NA, et al. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1469–77.
21. 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.
22. Mullins J, Harvey R, Seaton A. Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clin Allergy* 1976; 6: 209–17.
23. Debeaupuis JP, Sarfati J, Chazalet V, Latge JP. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1997; 65: 3080–5.
24. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, et al. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1494–500.
25. Lee T, Grinshpun SA, Martuzevicius D, Adhikari A, Crawford CM, Reponen T. Culturability and concentration of indoor and outdoor airborne fungi in six single-family homes. *Atmos Environ* 2006; 40: 2902–2910.
26. Bart-Delabesse E, Latge JP. Ecology and genetics diversity of *Aspergillus fumigatus*. In: JE D, GS K, eds. *The Mycota. Xii. Human Fungal Pathogens*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2003. p. 23–36.
27. Warris A, Voss A, Verweij PE. Hospital sources of *Aspergillus*: New routes of transmission? *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 156–62.
28. Woodcock AA, Steel N, Moore CB, Howard SJ, Custovic A, Denning DW. Fungal contamination of bedding. *Allergy* 2006; 61: 140–2.
29. Warris A, Klaassen CH, Meis JF, 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: 4101–6.
30. Symoens F, Burnod J, Lebeau B, Viviani MA, Piens MA, Tortorano AM, et al. Hospital-acquired *Aspergillus fumigatus* infection: can molecular typing methods identify an environmental source? *J Hosp Infect* 2002; 52: 60–7.
31. Guarro J, Sole M, Castany R, Cano J, Teixido A, Pujol I, et al. Use of random amplified microsatellites to type isolates from an outbreak of nosocomial

- mial aspergillosis in a general medical ward. *Med Mycol* 2005; 43: 365–71.
32. 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.
33. Cimon B, Symoens F, Zouhair R, Chabasse D, Nollard N, Defontaine A, et al. Molecular epidemiology of airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 2001; 50: 367–74.
34. Varga J, Vida Z, Toth B, Debets F, Horie Y. Phylogenetic analysis of newly described *Neosartorya* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000; 77: 235–9.
35. Varga J, Toth B, Rigo K, Debets F, Kozakiewicz Z. Genetic variability within the *Aspergillus viridinutans* species. *Folia Microbiol (Praha)* 2000; 45: 423–8.
36. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 625–32.
37. Larsen TO, Smedsgaard J, Nielsen KF, Hansen MA, Samson RA, Frisvad JC. Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section *Fumigati*. *Med Mycol* 2007; 45: 225–32.