

¿Tienen utilidad las técnicas moleculares para la vigilancia y el control de la aspergilosis?

Manuel Cuenca-Estrella y Emilia Mellado

Unidad de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

El aumento de la prevalencia de la aspergilosis, las dificultades para su diagnóstico y el mal pronóstico que presentan muchos casos han aumentado el interés por desarrollar estrategias que permitan controlar esta micosis. En la última década, numerosos trabajos han demostrado que la incidencia de la aspergilosis invasiva ha aumentado entre cinco y diez veces, que su mortalidad se aproxima al 80% y que dos terceras partes de los enfermos no reciben tratamiento antifúngico, siendo la infección diagnosticada en los estudios necrópsicos¹⁻³.

Todos los expertos coinciden en señalar que las técnicas de tipificación molecular se han convertido en las herramientas más adecuadas para realizar estudios epidemiológicos microbiológicos⁴. De esta forma, es posible conocer la cadena de infección y diseñar estrategias eficaces para prevenir y disminuir la incidencia de las enfermedades infecciosas. En el ámbito de la micología médica, estas técnicas han empezado a utilizarse en los últimos años y en el caso concreto de la aspergilosis han ayudado a descubrir la complejidad de esta infección y las dificultades que existen para diseñar estrategias de control.

El trabajo de Treviño-Castellano et al¹, publicado en este número de ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, refleja a la perfección el interés por diseñar técnicas moleculares que ayuden al diagnóstico y al control de la aspergilosis. Los autores proponen un método molecular, el *touchdown* PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para identificar cepas de *Aspergillus fumigatus* y la técnica de RAPD (polimorfismo derivado de la amplificación aleatoria de ADN) para la tipificación subespecífica. El estudio confirma los resultados obtenidos por otros autores en la última década, apoyando la idea de que la taxonomía molecular y el genotipificado podrían emplearse con más frecuencia en el análisis de las infecciones fúngicas⁵⁻⁷.

La taxonomía molecular se está convirtiendo en uno de los principales métodos de identificación de las especies fúngicas. La introducción de estas técnicas está originando reclasificaciones taxonómicas continuas y ayudando a identificar especies que hasta hace unos años sólo podían clasificarse al nivel de género. La mayoría de los grupos emplean métodos de identificación basados en la digestión genómica con enzimas de restricción (RFLP, polimorfismo derivado del corte con enzimas de

restricción)⁴, aunque cada vez con más frecuencia se utilizan técnicas de PCR, que amplifican determinadas zonas del genoma, habitualmente ADN ribosómico o ADN mitocondrial. Últimamente se está utilizando con éxito, la amplificación de pequeños fragmentos de ADN ribosómico (ITS, *internal transcribed spacer*) para identificar algunas especies⁸. Además la difusión de la PCR en tiempo real ofrece la posibilidad de utilizar métodos taxonómicos moleculares en los laboratorios asistenciales, por lo general en aquellos que disponen de personal con experiencia en estas técnicas.

En lo que se refiere a la aplicación de la tipificación subespecífica deben tenerse en cuenta tres consideraciones. En primer lugar, existen dudas sobre si la infección por *Aspergillus* es monoclonal o policlonal o quizá pueda ser de ambos tipos. En segundo término se cree que la aspergilosis es una infección nosocomial, pero casi nunca se consigue identificar una fuente de infección hospitalaria. Por último, la variabilidad individual de *Aspergillus* es tan elevada que, aunque las técnicas de tipificación no suelen tener problemas para discriminar entre las cepas, en pocas ocasiones se consigue documentar molecularmente un brote de infección por estas especies.

Respecto al asunto de la policlonalidad o monoclonalidad de la infección, en los últimos años se han publicado varios estudios muy ilustrativos. En términos generales existe la creencia de que los pacientes con aspergilosis invasivas están infectados por un solo genotipo. No obstante, algunos grupos de enfermos que presentan marcadas alteraciones de las vías respiratorias (fibrosis quística, cavidades pulmonares, bronquiectasias, etc.) pueden infectarse o colonizarse por varios genotipos de *Aspergillus*⁹. Así, por ejemplo, en algunos enfermos con fibrosis quística se han llegado a detectar hasta nueve genotipos distintos en muestras tomadas del tracto respiratorio. Pero además, algunos estudios realizados con un número limitado de pacientes con aspergilosis invasiva han apuntado que la infección policlonal es más frecuente de lo que se cree. Según estos trabajos, el porcentaje de infección policlonal podría establecerse en el 50-75% de los casos y en algunos enfermos pueden detectarse hasta cinco genotipos diferentes^{10,11}. Por último, un trabajo publicado recientemente y realizado en granjas de pavos, un animal para el que *A. fumigatus* puede ser patógeno primario, ha demostrado que todos los animales adultos portan diferentes combinaciones de genotipos en su tracto respiratorio¹².

Existe la opinión generalizada de que la aspergilosis invasiva tiene un origen nosocomial. Muchos estudios han comprobado que los brotes hospitalarios se relacionan con obras o reformas, movimiento de

Correspondencia: Dr. M. Cuenca-Estrella.
Unidad de Micología. Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III.
Ctra. de Majadahonda-Pozuelo, km 2. 28220 Majadahonda. Madrid. España.
Correo electrónico: mcuenca-estrella@isciii.es

Manuscrito recibido el 25-06-2003; aceptado el 03-07-2003.

mobiliario o manipulaciones de los sistemas de aire acondicionado y calefacción^{4,13}. Estas maniobras aumentan el número de conidias circulantes, lo que unido a la presencia de una población susceptible, produce un brote de infección nosocomial. La instalación de medidas de prevención como sistemas de flujo laminar en las habitaciones hospitalarias y la utilización de filtros HEPA (*high-efficiency particulate filters*) reducen la exposición de los enfermos susceptibles y, por lo tanto, la posibilidad de que aparezca un brote^{4,14}. Sin embargo, los estudios que se han diseñado para comparar las cepas aisladas en el ambiente hospitalario y las cepas procedentes de enfermos con aspergilosis han proporcionado datos sorprendentes. Entre éstos destaca que sólo un 40% de los casos de aspergilosis parecen tener un origen nosocomial, ya que en un 60% de las aspergilosis no se encuentra coincidencias entre los genotipos hospitalarios y los que proceden de los enfermos¹⁰. Incluso cuando se produce una acumulación temporal-espacial de casos de aspergilosis en una institución sanitaria, las técnicas de tipificación suelen demostrar que no existe relación genotípica entre las cepas causantes de los casos y que además, no es posible hallar el foco ambiental responsable del brote^{6,15,16}. No obstante, algunos brotes pueden estar causados por cepas genéticamente relacionadas. Estos brotes suelen afectar a un número reducido de enfermos y, generalmente, están asociadas con exposiciones puntuales en un lugar concreto de la institución sanitaria, como quirófanos, salas de cuidados intensivos o unidades de diálisis^{4,17}. Otro aspecto destacable es que en los brotes causados por especies no *fumigatus*, las técnicas de tipificación suelen determinar que existe un posible origen común en los casos de infección. Esta coincidencia se ha demostrado en algún brote originado por *A. flavus*⁵.

Varios autores creen que la falta de coincidencia genética entre las cepas hospitalarias y las que originan casos de aspergilosis invasivas se debe a limitaciones a la hora de recoger las muestras ambientales¹⁴. En primer lugar, los sistemas empleados para cuantificar esporas en suspensión en el medio hospitalario no han demostrado que tengan demasiada utilidad. En muchas ocasiones, un aumento de casos de aspergilosis no se ha visto acompañado por un incremento en la detección de esporas ambientales¹³. Estos hallazgos cuestionan la necesidad de realizar muestreos periódicos en el ambiente hospitalario. Sin embargo, en otras ocasiones, el control del número de esporas en el aire o en el agua de un centro sanitario se ha relacionado con un descenso en la exposición a *A. fumigatus* y quizá, con una disminución en el número de infecciones, aunque la mayoría de los trabajos no muestran datos definitivos a este respecto^{4,18,19}.

Pero como se indicó anteriormente, la falta de concordancia genética entre las cepas ambientales y las clínicas puede explicarse por la enorme variabilidad individual que muestran las cepas de *Aspergillus*, sin necesidad de recurrir a otras razones.

El ser humano inhala cada día varios cientos de esporas de *A. fumigatus*²⁰. Estudios de tipificación realizados con centenares de cepas ambientales han demostrado que el 85% de las cepas tienen genotipos diferentes y que sólo un 15% de las cepas se aíslan dos o más veces²¹. Además, la población cambia con el tiempo y sólo excepcionalmente

se aísla la misma cepa durante varios meses. Esta extrema variabilidad no se ha descrito para otros microorganismos, lo que ha llevado a especular con la posibilidad de que las cepas de *A. fumigatus* pudieran realizar recombinaciones genéticas parasexuales. Sin embargo, la mayoría de los autores prefieren emplear otras hipótesis, como la existencia de formas sexuales no conocidas o la posibilidad de que la variabilidad se produjera por recombinaciones sexuales mucho tiempo atrás, en la época en que *A. fumigatus* se seleccionó como especie²². Algunos metaanálisis realizados con análisis de conglomerados e índices de asociación han mostrado que las cepas que tienen relación geográfica son más parecidas genéticamente que aquellas que no la tienen. Este hallazgo apoya la hipótesis de que la variabilidad se debe a una recombinación antigua y que ha existido cierta presión selectiva²².

La variabilidad de *A. fumigatus* se hace patente por la facilidad con que las técnicas de tipificación distinguen unas cepas de otras. Existen técnicas de tipificación de *Aspergillus* desde hace más de 20 años. Se han empleado entre otras, técnicas de isoenzimas, diferentes métodos de RFLP y técnicas basadas en la PCR, como el de RAPD, el SSDP (*sequence-specific DNA primers*) o el PMM (*polymorphic microsatellite markers*)^{7,11,23,24}. Algunas discriminan sólo entre subespecies, pero los tres métodos que utilizan la PCR y la RFLP con hibridación con RDS (*repeated DNA sequences*) son capaces de distinguir entre cepas individuales. Hasta la fecha los mejores resultados se han obtenido con la técnica de RAPD y especialmente con el cebador R108⁶. Sin embargo, existen problemas de interpretación y de reproducibilidad debido a las bajas temperaturas que suelen emplearse para realizar la PCR. Por eso, la mayoría de los expertos recomiendan utilizar dos técnicas de tipificación o dos cebadores diferentes a la hora de tipificar cepas relacionadas con un brote de aspergilosis.

A modo de conclusión debería resaltarse que las técnicas moleculares tienen un papel limitado en la prevención y control de la aspergilosis. La identificación de cepas al nivel de especie mediante métodos basados en la taxonomía molecular puede convertirse en la técnica de referencia en los próximos años, sobre todo en las infecciones causadas por especies raras, que son difíciles de identificar mediante pruebas convencionales. Sin embargo, la tipificación subespecífica sólo parece tener utilidad en ciertas ocasiones como en brotes producidos en quirófanos o causados por especies no *fumigatus*. En otros brotes las infecciones se producen por inhalación de conidias de diferentes cepas y, además, la infección policlonal es muy frecuente, lo que complica la tipificación de los casos. Por otra parte, el muestreo del aire y del agua del hospital puede ayudar a prevenir la infección, ya que si se reduce el número de esporas, desciende el riesgo de exposición. Pero debe indicarse que no se conoce cuál es la concentración de conidias a la que el riesgo de aspergilosis empieza a aumentar, a excepción de los quirófanos, donde este número debe tender a cero.

En caso de que se produzca un brote de aspergilosis en un centro sanitario debería procederse a tomar muestras ambientales. Tras ello deberían tipificarse las cepas clínicas y ambientales empleando al menos dos sistemas de análisis. No obstante, debe insistirse en que no puede

excluirse el origen hospitalario de la infección, aunque las técnicas de tipificación demuestren que las cepas clínicas y las ambientales son diferentes, ya que la extrema variabilidad individual de *Aspergillus* y las rápidas fluctuaciones que se producen en la concentración de esporas reducen la utilidad de los estudios de genotipificación.

Bibliografía

1. Treviño M, Rodríguez-Nóvoa S, Llovo J, García-Zabarte A, García-Riestra C, Regueiro BJ. Uso combinado de amplificación aleatoria de polimorfismo del ADN (RAPD) y reacción en cadena de la polimerasa ("Touch Down" PCR) en el estudio epidemiológico de *Aspergillus fumigatus*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:472-6.
2. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 1996;33:23-32.
3. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, et al. Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. 13 *Aspergillus* Study Group. *Medicine (Baltimore)* 2000;79: 250-60.
4. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:310-50.
5. Díaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Gaztelurrutia L, Navarro JI, 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.
6. Mellado E, Díaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Buendía V, Aspa J, Prieto E, et al. Characterization of a possible nosocomial aspergillosis outbreak. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:543-8.
7. Rinyu E, Varga J, Ferenczy L. Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 1995;33:2567-75.
8. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000;38:2302-10.
9. 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.
10. Bart-Delabesse E, Cordonnier C, Bretagne S. Usefulness of genotyping with microsatellite markers to investigate hospital-acquired invasive aspergillosis. *J Hosp Infect* 1999;42:321-7.
11. Bertout S, Renaud F, Barton R, Symoens F, Burnod J, Piens MA, et al. Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: Investigation using multiple typing methods. *J Clin Microbiol* 2001;39:1731-7.
12. Lair-Fullerger S, Guillot J, Desterke C, Seguin D, Warin S, Bezille A, et al. Differentiation between isolates of *Aspergillus fumigatus* from breeding turkeys and their environment by genotyping with microsatellite markers. *J Clin Microbiol* 2003;41:1798-800.
13. Leenders AC, Van Belkum A, Behrendt M, Luijendijk A, Verbrugh HA. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. *J Clin Microbiol* 1999;37:1752-7.
14. Rath PM, Ansorg R. Value of environmental sampling and molecular typing of *Aspergilli* to assess nosocomial sources of aspergillosis. *J Hosp Infect* 1997;37:47-53.
15. Leenders A, Van Belkum A, Janssen S, De Marie S, Kluytmans J, Wielenga J, et al. Molecular epidemiology of apparent outbreak of invasive aspergillosis in a hematology ward. *J Clin Microbiol* 1996;34:345-51.
16. 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.
17. Panackal AA, Dahlman A, Keil KT, Peterson CL, Mascola L, Mirza S, et al. Outbreak of invasive aspergillosis among renal transplant recipients. *Transplantation* 2003;75:1050-3.
18. Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Summerbell RC, Rex JH, Monson TP, et al. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: A 3-year prospective study. *Clin Infect Dis* 2002;34:780-9.
19. Arvanitidou M, Kanellou K, Constantinides TC, Katsouyannopoulos V. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Lett Appl Microbiol* 1999;29:81-4.
20. Herr CE, Zur NA, Jankofsky M, Stilianakis NI, Boedeker RH, Eikmann TF. Effects of bioaerosol polluted outdoor air on airways of residents: A cross sectional study. *Occup Environ Med* 2003;60:336-42.
21. 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.
22. Varga J. Mating type gene homologues in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 2003;149(Pt 4):816-9.
23. Bart-Delabesse E, Sarfati J, Debeaupuis JP, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Bretagne S, et al. Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39:2683-6.
24. 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.