

Uso combinado de amplificación aleatoria de polimorfismo del ADN (RAPD) y reacción en cadena de la polimerasa (*touchdown* PCR) en el estudio epidemiológico de *Aspergillus fumigatus*

Mercedes Treviño-Castellano, Sonia Rodríguez-Nóvoa, José Llovo-Taboada, Ángeles García-Zabarte, Carlos García-Riestra y Benito José Regueiro-García

Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). A Coruña. España.

INTRODUCCIÓN. *Aspergillus fumigatus* es un hongo filamentoso que se comporta como patógeno oportunista y constituye una de las complicaciones infecciosas más importantes en los pacientes inmunocomprometidos. Los brotes nosocomiales de aspergilosis son cada vez más frecuentes, pero su identificación y caracterización epidemiológica es lenta y laboriosa.

OBJETIVO. Describir un método rápido, sensible y específico para la identificación de *A. fumigatus* y su caracterización genotípica dentro de las posibilidades diagnósticas habituales en un laboratorio clínico de microbiología.

MÉTODOS. Se utilizaron cepas de *A. fumigatus* procedentes de pacientes con aspergilosis invasivas (n = 4), medio ambiente hospitalario (n = 5) y colecciones de referencia (n = 1), así como otras especies fúngicas filogenéticamente próximas aisladas de pacientes (n = 1), del medio hospitalario (n = 6) o de colecciones de referencia (n = 1). La identificación de *A. fumigatus* se realizó tanto por métodos fenotípicos clásicos como mediante *touchdown* PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La caracterización genotípica se llevó a cabo por RAPD (polimorfismo derivado de la amplificación aleatoria de ADN), comparando distintos protocolos de amplificación y tipos de *primer* (OPZ-19 y R-108) en relación con su poder resolutivo y reproducibilidad.

RESULTADOS. Los resultados de la identificación fenotípica y molecular coincidieron plenamente. La caracterización molecular por RAPD presentó los mejores resultados, en cuanto a reproducibilidad y resolución se refiere, con el *primer* R-108 y tiempo prolongado de transición entre hibridación y elongación.

CONCLUSIÓN. El análisis por RAPD es un método seguro y rápido para la caracterización genotípica de *A. fumigatus* cuyos patrones de bandas son fáciles de interpretar y reproducir cuando se prolonga drásticamente el tiempo de transición entre la hibridación y la extensión. El uso combinado de *touchdown* PCR y análisis por RAPD constituye un método sensible y exacto para la resolución de brotes nosocomiales por *A. fumigatus*.

Palabras clave: *Aspergillus fumigatus*. RAPD. *Touchdown* PCR. *Aspergillus* fingerprint.

Combined used of RAPD and *touchdown* PCR for epidemiological studies of *Aspergillus fumigatus*

INTRODUCTION. *Aspergillus fumigatus* is a filamentous fungus that acts as an opportunistic pathogen and has emerged as a major problem in immunosuppressed patients. Nosocomial outbreaks of aspergillosis are becoming more frequent, but their identification and epidemiological characterization is slow and difficult.

OBJECTIVE. Description of a fast, sensitive, specific method to identify and fingerprint *A. fumigatus* using methodology available in clinical laboratories.

METHODS. We studied several strains of *A. fumigatus* isolated from patients with invasive aspergillosis (n = 4), the hospital environment (n = 5) and reference cultures (n = 1), as well as other close phylogenetic fungal species from patients (n = 1), hospital environment (n = 6) and reference cultures (n = 1). *A. fumigatus* was identified by both *touchdown* PCR and conventional phenotyping methods. Genotyping was performed with random amplification of polymorphic DNA (RAPD) analysis, comparing the results from two primers (OPZ-19 and R-108) and different amplification protocols with regard to band resolution and reproducibility.

RESULTS. *Touchdown* PCR and phenotype results were identical. Best RAPD results were obtained with the R-108 primer and considerably longer ramp times between annealing and extension.

CONCLUSION. RAPD analysis is a fast, reliable tool for DNA fingerprinting. Patterns may be easier to repeat and interpret when longer ramp times are used. *Touchdown* PCR combined with RAPD analysis is a sensitive, accurate method for managing clinical outbreaks of *Aspergillus fumigatus*.

Key words: *Aspergillus fumigatus*. RAPD. *Touchdown* PCR. *Aspergillus* fingerprint.

Correspondencia: Dra. M. Treviño-Castellano.
Cruceiro de Sar, 26, 2º B. 15702 Santiago de Compostela. España.
Correo electrónico: mercedes.trevino.castellano@sergas.es

Manuscrito recibido el 09-09-2002; aceptado el 09-01-2003.

Introducción

Aspergillus fumigatus, un hongo filamentoso causante de numerosas afecciones pulmonares, como aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma y aspergilosis invasiva, ha emergido como uno de los principales problemas en pacientes inmunodeprimidos¹. Los brotes nosocomiales de aspergilosis son cada vez más frecuentes y la identificación de los aislamientos recuperados en el laboratorio suele ser lenta, en espera del desarrollo de estructuras fúngicas con valor taxonómico, además de requerir gran experiencia en microscopía por parte del microbiólogo, para evitar errores en su clasificación.

El análisis del polimorfismo derivado de la amplificación aleatoria de ADN (RAPD) pone en evidencia, en una sola reacción de amplificación, las variaciones de secuencia en regiones cortas de ADN utilizando, para ello, un *primer* pequeño y condiciones poco restrictivas de hibridación². Además, el análisis por RAPD es técnicamente sencillo y, con frecuencia, demuestra diferencias entre cepas que son indistinguibles por el análisis de polimorfismo derivado del corte con enzimas de restricción (RFLP)^{3,4}. No obstante, este método está cayendo en desuso, debido a su mala reproducibilidad⁵. En 1999, Ellinghaus et al⁶ comunicaron el incremento en la eficiencia y reproducibilidad del RAPD prolongando el tiempo de aumento de temperatura entre la hibridación y la elongación en los ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Por otro lado, Brandt et al⁷ describieron un protocolo de amplificación conocido como *touchdown PCR*. Éste, usando los *primers* Z19-276 y Z19-660, identifica genéticamente a *A. fumigatus* de forma rápida, sensible y específica.

En este trabajo se investiga la utilidad del genotipado de *A. fumigatus* para su estudio epidemiológico validando, además la eficacia de *touchdown PCR* para la identificación molecular de *A. fumigatus*.

Métodos

Se utilizaron 16 aislamientos fúngicos de origen hospitalario, una cepa de control positivo (*A. fumigatus* ATCC 13073) y otra de control negativo (*A. niger* ATCC 1004). Los aislamientos se conservaron hasta su procesamiento a -70 °C en caldo cerebro-corazón con 10% de glicerol. Las colonias de trabajo se mantuvieron en agar Sabouraud a 4 °C y la clasificación taxonómica de todas ellas se hizo en función de sus características fenotípicas⁸.

Extracción del ADN

Se realizó por un método rápido que permite el procesamiento simultáneo de varias muestras. Brevemente, una placa de agar Sabouraud-dextrosa se inocula con conidios y se incuba a 37 °C durante 24 a 48 h. El micelio crecido se recoge con un bisturi estéril y se transfiere a un tubo de polipropileno con tapón de rosca de 1,5 ml con 6 bolas de cristal. El tubo se sumerge en nitrógeno líquido durante 10 s y se agita vigorosamente durante 30 s. Este tejido disgregado se procesa por el sistema EZNA (método de purificación mediante columnas, Omega Biotek, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN obtenida se estimó espectrofotométricamente.

Touchdown PCR

Se realizó en un termociclador 9600 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). Los reactivos para PCR fueron obtenidos de Perkin-Elmer. La PCR y las condiciones de amplificación se habían descrito previamente⁷. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final 50 µl con las siguientes concentraciones finales: 1× de tampón de reacción (Perkin Elmer), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 10 pmol de cada primer, 1 U de AmpliTaq, 50 ng de ADN. Para la amplificación del fragmento de 864 pb específico de *A. fumigatus* se escogieron los *primers*: Z19-276 (5'-TTGATCTGGCCC-TGGCTTGGG) y Z19-660 (5'-CAACATTGAAATCCAAGAGGC). El programa de amplificación consistió en un total de 31 ciclos, iniciándose todos ellos con una desnaturalización a 94 °C durante 1 min. La temperatura de hibridación comenzó a 65 °C durante 1 min en los tres primeros ciclos y fue reduciéndose de grado en grado cada tres ciclos hasta 61 °C, disminuyéndose de dos en dos grados de 59 a 55 °C, temperatura que se mantiene en los últimos 10 ciclos. En todos los ciclos se programó una extensión final a 72 °C durante 1 min. Para incrementar la eficiencia de amplificación se incorporó una elongación final de 10 min a 72 °C.

Genotipado por RAPD

Se llevó a cabo comparando la eficiencia de dos *primers*, OPZ19 (5'-GTGCGAGCAA) y R108 (5'-GTATTGCCCT). Las reacciones de amplificación se efectuaron en un volumen total de 50 µl conteniendo 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8,0); 1,5 mM MgCl₂; 100 µM de cada dATP, dCTP, dTTP, and dGTP (Perkin-Elmer), 0,2 µM cada *primer*; 50 ng de ADN genómico; y 2,5 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer). Se probaron dos protocolos diferentes de amplificación. El primero consistió en una desnaturalización de 5 min a 95 °C seguido de 45 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 34 °C y 2 min a 72 °C (relación temperatura/tiempo mínima) y, finalmente, una extensión de 10 min a 72 °C. Alternativamente se probaron otros protocolos similares incrementando el tiempo de transición térmica entre anillamiento y elongación de cada ciclo en 5 y 7 min, respectivamente. Los productos obtenidos en la amplificación se fraccionaron por electroforesis en agarosa NuSieve 3:1 al 1,8% (FMC Bioproducts, EE.UU.) utilizando tampón Tris-borato-EDTA al 0,5× en presencia de bromuro de etidio (0,5 mg/ml), se fotografiaron y se analizaron. Para estudiar la reproducibilidad se repitió el análisis de RAPD en dos extracciones distintas de ADN de cada una de las cepas, con una diferencia de 4 meses, y cada una de ellas por duplicado en distintos días y por distintos operadores. Las calles que correspondían a la misma muestra en diferentes series se compararon por superposición de sus perfiles de intensidad mediante el programa Quantity one vs. 4.0 (Bio-Rad, EE.UU.) y se calcularon sus coeficientes de similitud (S) según: $S = 2 N_{AB} / (N_A + N_B)^2$.

Resultados

Identificación fenotípica

De las 16 cepas fúngicas usadas, cuatro de ellas, procedentes de aislamientos clínicos, se identificaron como *A. fumigatus* (cepas n.º 1, 2, 3, 5) y una como *A. niger* (cepa n.º 6). De las cepas recuperadas del ambiente hospitalario, cinco se clasificaron como *A. fumigatus* (cepas n.º 7, 8, 9, 11, 13), dos como *A. niger* (n.º 14, 16), una como *Emericella quadrilineata* (n.º 10), una como *E. nidulans* (n.º 15), una como *Neosartorya pseudofischeri* (n.º 4) y una como *Eurotium repens* (n.º 17).

Touchdown PCR

Se obtuvo un producto de amplificación de 864 pb utilizando la pareja de *primers* Z19-276/Z19-660 en las cepas n.º 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 13 y en la cepa control del

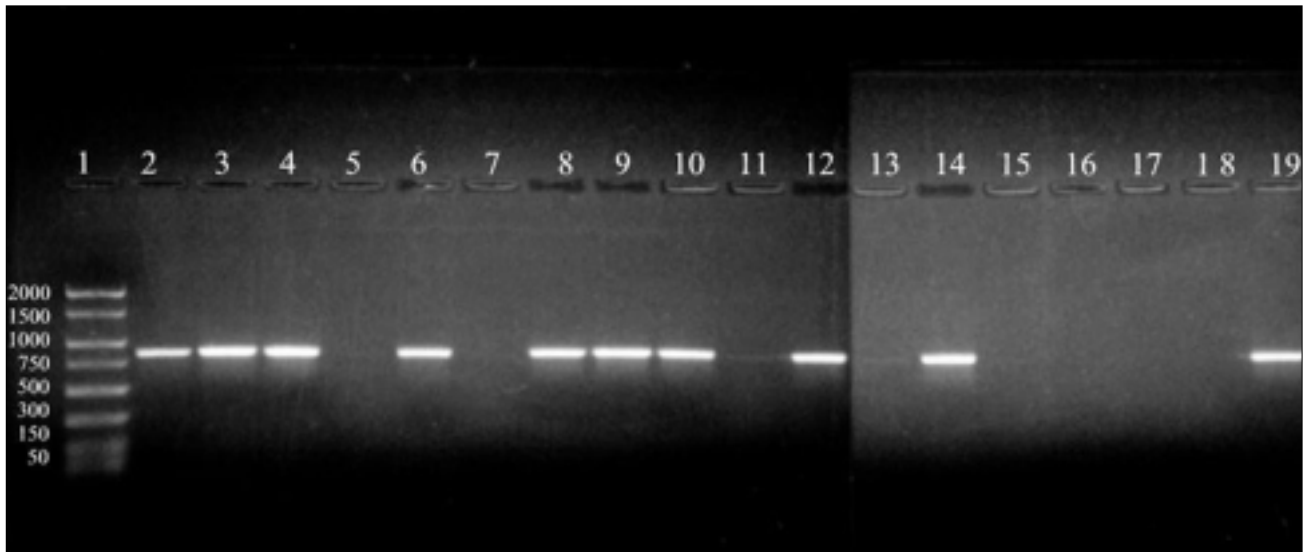


Figura 1. ADN de muestras fúngicas aisladas de pacientes y del medio hospitalario amplificadas con el par Z19-276, Z19-660 por *touchdown* PCR. Pocillos: 1, marcador de PCR (pares de bases); 2, 3, 4, 6, *A. fumigatus* de origen clínico (cepas n.º 1, 2, 3, 5); 5, *Neosartorya pseudofischeri* (cepa n.º 4); 7, *A. niger* de origen clínico (cepa n.º 6); 8, 9, 10, 12, 14, *A. fumigatus* de origen ambiental (cepas n.º 7, 8, 9, 11, 13); 11, *Emericella quadrilineata* (cepa n.º 10); 13, *A. niger* (ATCC 1004) (cepa n.º 12); 15, 17, *A. niger* de origen ambiental (cepas n.º 14, 16); 16, *E. nidulans* (cepa n.º 15); 18, *Eurotium repens* (cepa n.º 17); 19, *A. fumigatus* (ATCC 13073) (cepa n.º 18).

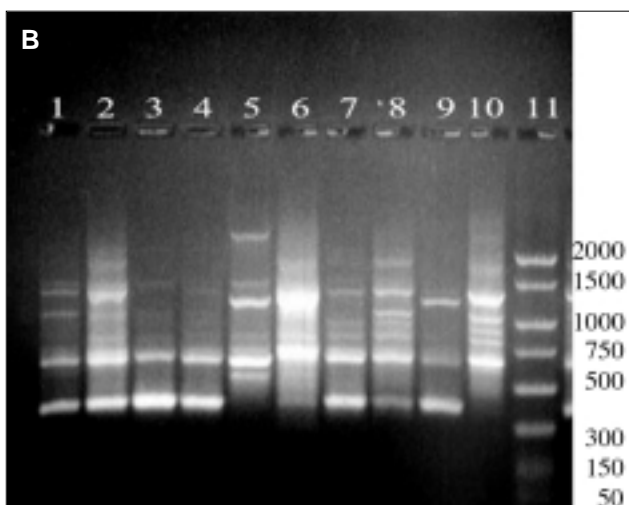
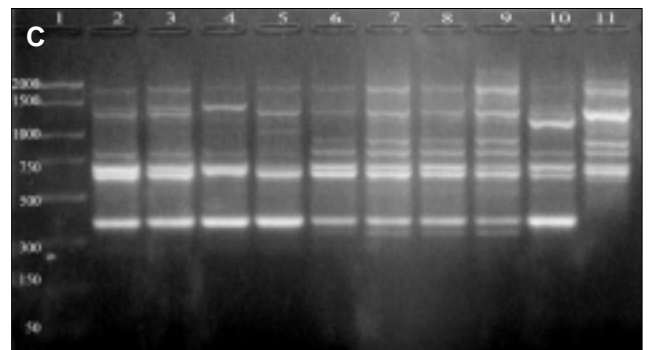
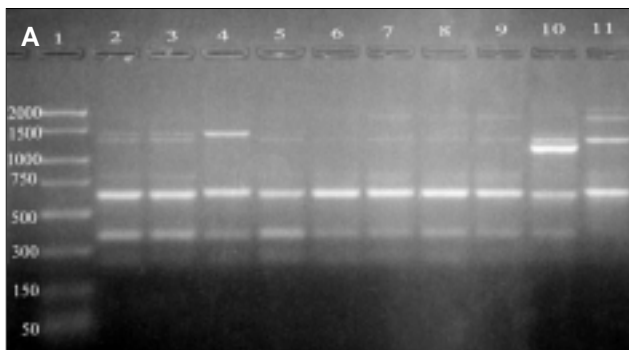


Figura 2. Perfiles de RAPD obtenidos con el primer R108. A) corresponde al intervalo de tiempo mínimo posible entre hibridación y elongación: pocillo 1, marcador de peso molecular (pares de bases); pocillos 2-10, *A. fumigatus* (cepas n.º 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 13); pocillo 11, *A. fumigatus* (ATCC 13073). B) Rampa de 5 min. Pocillos 1-9, *A. fumigatus* (cepas n.º 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 13); pocillo 10, *A. fumigatus* (ATCC 13073); pocillo 11, marcador de peso molecular. C) Rampa de 7 min. La numeración de los pocillos se corresponde con la numeración de A.

ATCC 13073, correspondiendo exactamente a las identificadas como *A. fumigatus* por métodos fenotípicos. No se observó ninguna banda de amplificación en el resto de las cepas clasificadas fenotípicamente como otras especies distintas de *A. fumigatus* (fig. 1).

Análisis por RAPD

Los extractos de ADN obtenidos a partir de todos los aislamientos, clínicos o ambientales, de *A. fumigatus* se sometieron a amplificación aleatoria usando

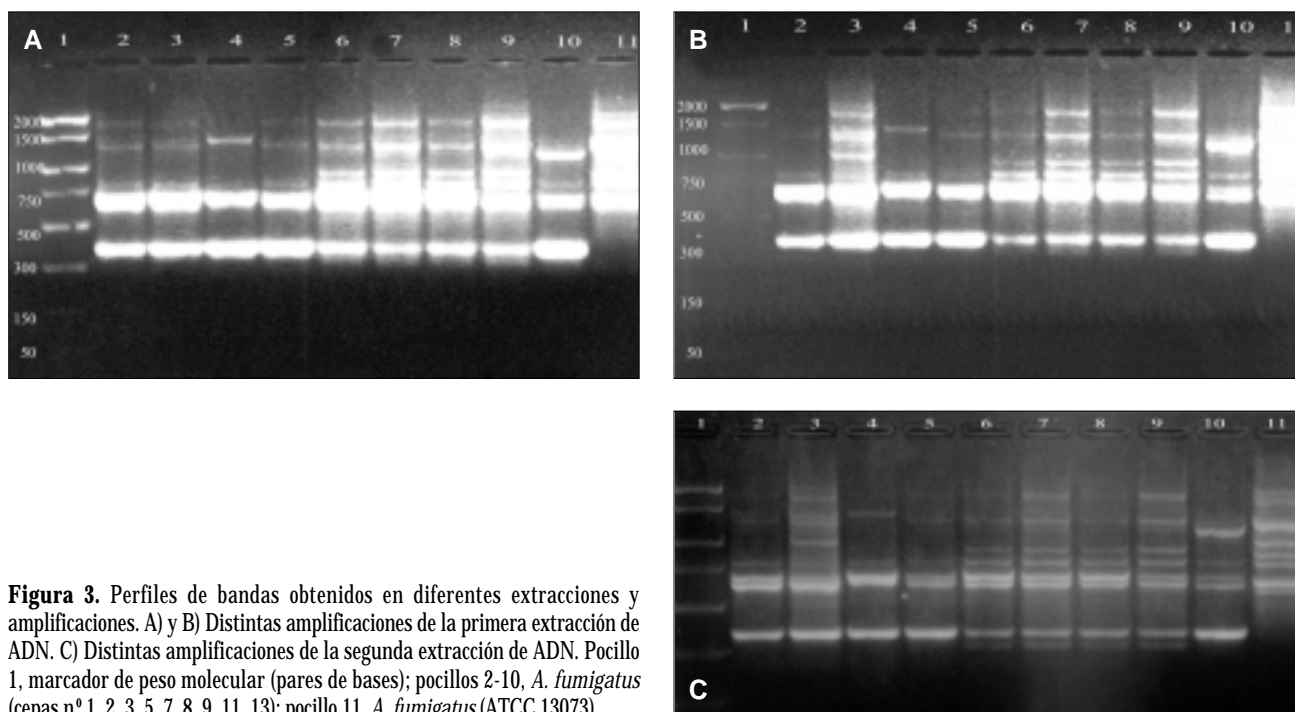


Figura 3. Perfiles de bandas obtenidos en diferentes extracciones y amplificaciones. A) y B) Distintas amplificaciones de la primera extracción de ADN. C) Distintas amplificaciones de la segunda extracción de ADN. Pocillo 1, marcador de peso molecular (pares de bases); pocillos 2-10, *A. fumigatus* (cepas n.º 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 13); pocillo 11, *A. fumigatus* (ATCC 13073).

TABLA 1. Valores del coeficiente de similitud entre diferentes series de trabajo según el tiempo de la rampa térmica en los distintos protocolos de RAPD ensayados

Tiempo de rampa (min)	S medio	Rango
0	0,56	0,22-1
5	0,83	0,66-1
7	0,98	0,92-1

S: coeficiente de similitud.

alternativamente el *primer* OPZ19 o el R108. Como puede verse en la figura 2, el *primer* R108 demostró mayor poder discriminatorio generando mayor variabilidad en los perfiles de bandas (6 tipos distintos). El aumento de los tiempos de rampa de ascensión térmica entre la hibridación y la elongación en cada ciclo de PCR también puso de manifiesto, no sólo una mayor capacidad de resolución, sino también mejor reproducibilidad (tabla 1) (fig. 3). Por el contrario, si bien la reproducibilidad con el *primer* OPZ19 fue aceptable, la capacidad resolutoria fue reducida en cualquiera de las condiciones de ensayo probadas (dos tipos de perfiles de bandas) (fig. 4).

Discusión

El protocolo de *touchdown* PCR, con el par Z19-276/660, amplificó y detectó sin dudas todas las cepas clasificadas fenotípicamente como *A. fumigatus*. Este resultado confirma la enorme utilidad para la identificación rápida y exacta de este hongo recuperado de muestras clínicas y ambientales. Esta consideración es de gran importancia, tanto para el diagnóstico como para el estudio epidemiológico de los brotes nosocomiales. No obstante,

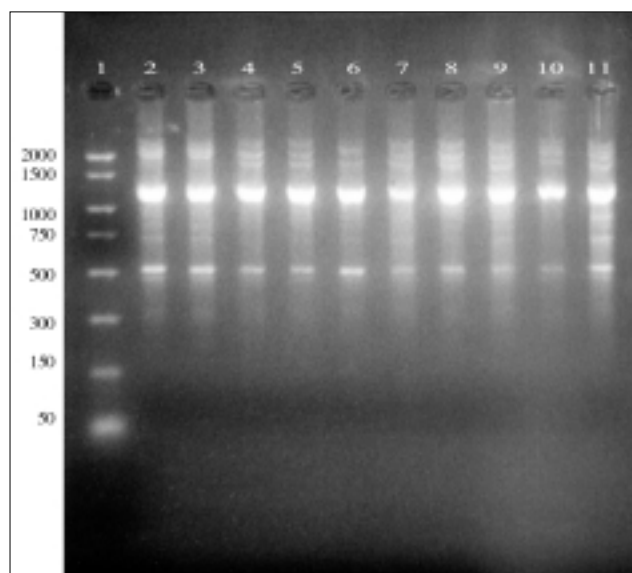


Figura 4. ADN de las cepas de *A. fumigatus* amplificado por el protocolo RAPD-PCR con el *primer* OPZ-19. Pocillos 1, marcador de PCR (pb); 2-10, *A. fumigatus* (cepas n.º 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 13); 11, *A. fumigatus* (ATCC 13073).

algunas variedades de *A. fumigatus* como var. *sclerotium* y las cepas no pigmentadas pueden mostrar bandas de amplificación muy débiles e, incluso, no amplificarse bajo las condiciones descritas en este trabajo⁷. De entre las múltiples técnicas que se han empleado con éxito en los estudios epidemiológicos de hongos, RAPD es la más sencilla desde el punto de vista técnico, además de ser más sensible en la detección de variabilidad que el análisis de RFLP¹⁰⁻¹². No obstante, hasta ahora se ha considerado un inconveniente su baja reproducibilidad. El *primer* R108,

usado con éxito en el análisis de RAPD por otros autores^{4,13}, demostró un elevado poder discriminatorio concordante con los resultados de otros estudios^{4,14}. De los aislamientos clínicos de *A. fumigatus*, sólo dos fueron indistinguibles. Éstos, procedían de pacientes que coincidieron, en un espacio corto de tiempo, en el mismo quirófano y planta siendo, pues, muy probable que estuvieran infectados por la misma cepa.

Aunque es aconsejable que el análisis de los perfiles de bandas se realice con varios *primers*, el uso de un iniciador con alto poder discriminatorio como R108 puede ser de gran utilidad en los estudios epidemiológicos de brotes nosocomiales, ya que es un método rápido y sencillo que puede evitar la necesidad de aplicar otros con el consiguiente ahorro de tiempo y coste económico¹⁵. En el presente trabajo, la prolongación del tiempo de rampa térmica (o reducción de la relación Δ temperatura/tiempo) entre el anillamiento y la extensión revierte en un aumento sustancial de la reproducibilidad y capacidad discriminatoria de los perfiles de bandas obtenidos con el *primer* R108, análogamente a los resultados obtenidos por Ellinghaus et al⁶ con *Candida* sp. Una explicación posible sería la estabilización del complejo *primer*-molde de ADN, que evitaría su separación prematura. La alta reproducibilidad conseguida mediante la modificación del análisis RAPD, descrita en este trabajo, permite considerarlo una herramienta útil y fiable en el estudio epidemiológico de *A. fumigatus*. Por otro lado, el análisis RAPD con OPZ19, un *primer* que hibrida con todas las cepas de *A. fumigatus* excepto las variantes no pigmentadas, demostró una repetibilidad aceptable en todos los tiempos de rampa ensayados. Este comportamiento podría deberse a su propia secuencia, ya que se sabe que la reproducibilidad e intensidad de las bandas de un análisis de este tipo puede estar en función de muchos parámetros, incluyendo la longitud y secuencia del *primer*¹⁶. Sin embargo, el aumento de los tiempos de rampa térmica no mejoró su rendimiento.

En conclusión, el análisis RAPD es una herramienta rápida y segura en el estudio del polimorfismo genómico de *A. fumigatus*, cuyos patrones de bandas pueden ser fáciles de interpretar y reproducir si se prolongan drásticamente los tiempos de rampa térmica entre el anillamiento y la elongación. El uso combinado de *touchdown* PCR y análisis RAPD constituye un método sensible y exacto para llevar a cabo estudios epidemiológicos de *A. fumigatus* con los medios habitualmente disponibles en un laboratorio clínico de microbiología.

Bibliografía

- Richardson MD, Warnock DW. Aspergillosis. En: Fungal infection. Diagnosis and management. United Kingdom: Blackwell Science, 1998; p. 113-30.
- Wetton JH, Royston EC, Parkin DT, Walters D. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 1987;326:147-9.
- Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:126-46.
- 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.
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:454-500.
- Ellinghaus P, Badehorn D, Blümer R, Becker K, Seedorf U. Increased efficiency of arbitrarily primed PCR by prolonged ramp times. *BioTechniques* 1999;26:626-30.
- Brandt ME, Padhye AA, Mayer LW, Holloway BP. Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and TaqMan automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2057-62.
- Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.
- Pfaller MA. Epidemiological typing methods for mycoses. *Clin Infect Dis* 1992;14:S4-S10.
- Loudon KW, Burni JP, Coke AP, Matthews RC. Application of PCR to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 1993;31:1117-21.
- Rath PM. Phenotypic and genotypic characterization of reference strains of the genus *Aspergillus*. *Mycoses* 2001;44:65-72.
- Pizeta Semighini C, Delmas G, Park S, Armstrong D, Perlin D, Goldman GH. New restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers for *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;31:15-9.
- Lin Lin D, Lehmann PF, Hamory BH, Padhye AA, Durry E, Pinner RW, et al. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1596-601.
- Anderson MJ, Gull K, Denning DW. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 1996;34:87-93.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research* 1990;18:7213-8.