



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares

Fabián Unda^{a,*}, Jesús Agüero^b, M. Carmen Fariñas^c y Luis Martínez-Martínez^a

^a Servicio de Microbiología Clínica y Parasitología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España

^b Universidad de Cantabria, Facultad de Medicina, Santander, España

^c Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 14 de septiembre de 2010

Aceptado el 27 de diciembre de 2010

On-line el 26 de febrero de 2011

Palabras clave:

Hongos

PCR

Identificación

R E S U M E N

Objetivo: Aplicar un método molecular, basado en la secuenciación, para la identificación de hongos de interés clínico, a nivel de especie.

Método: Se estudiaron de forma prospectiva 36 cepas de hongos que con métodos convencionales no se pudieron identificar a nivel de especie y 39 muestras clínicas obtenidas por métodos invasivos, los resultados se compararon con los del cultivo.

Resultados: Los métodos moleculares permitieron una identificación rápida y fiable de los organismos a nivel de especie, tanto a partir de cultivos como de muestras clínicas.

Conclusión: La identificación a nivel de especie y la reducción del tiempo de respuesta, así como el valor predictivo negativo son claras ventajas de estos métodos.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Identification of clinically relevant fungi using molecular techniques

A B S T R A C T

Objective: To apply a sequencing-based molecular method to identify clinically relevant fungi to species level.

Method: Thirty-six fungi not identifiable at a species level by a conventional approach and 39 invasive clinical samples were prospectively evaluated. The results were compared with those obtained by conventional methods.

Results: Molecular methods allowed rapid and reliable identification of fungi at species level, including both from organisms grown in culture and those in clinical samples.

Conclusion: Molecular methods show clear advantages for fungal identification, including rapid identification at species level and high negative predictive value.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Fungi

PCR

Identification

Introducción

En las últimas décadas se ha producido un notable incremento en la patología infecciosa de etiología fúngica en distintos grupos de pacientes, especialmente en inmunodeprimidos (incluyendo los que reciben trasplantes de progenitores hematopoyéticos o de órganos sólidos) y en enfermos críticos¹.

Aunque se han logrado importantes avances en la identificación de muchos de los hongos de importancia médica, aún existen dificultades para el adecuado reconocimiento de ciertos géneros y especies de este grupo de organismos. La identificación basada en

la morfología presenta en ocasiones un importante grado de dificultad, sobre todo para distinguir especies cercanas, en las que las características fenotípicas son muy similares. Por otra parte, la fiabilidad de la identificación basada en características morfológicas depende de la experiencia del observador y tiene un componente subjetivo. Además, en los casos en que se puede llegar a la identificación de especie, los procedimientos microbiológicos tradicionales llegan a requerir (especialmente en el caso de los hongos filamentosos) días o semanas. Estas circunstancias plantean la necesidad de desarrollar métodos alternativos, que ofrezcan mayor rapidez en la obtención de resultados y un mayor rango de microorganismos identificables de forma fiable. Las técnicas moleculares son una de las opciones que mejor podrían cumplir estos requisitos.

El objetivo de este trabajo fue aplicar un método molecular, basado en la secuenciación de regiones que permiten una

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fabiunda@yahoo.ca (F. Unda).

Tabla 1
Hongos identificados por técnicas moleculares

Número	Identificación	IDGenBank	Bases	Max Identidad	Iniciadores
1A	<i>Aspergillus tamarii</i>	EF661474.1	623	100%	β -tub
1B	<i>Aspergillus tamarii</i>	AY017540.1	892	100%	ITS1-4
2	<i>Aspergillus terreus</i>	GU594776.1	829	100%	ITS1-4
3	<i>Aspergillus terreus</i>	GC461911.1	1162	99%	ITS1-4
4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GU266273.1	838	99%	ITS1-4
5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GQ169480.1	838	99%	ITS1-4
6	<i>Aspergillus thermomutatus</i>	EU310861.1	825	100%	ITS1-4
7	<i>Aspergillus flavus</i>	AY017536.1	920	99%	β -tub
8	<i>Aspergillus flavus</i>	GU594738.1	828	100%	ITS1-4
9	<i>Aspergillus niger</i>	HQ589137.1	930	99%	ITS1-4
10	<i>Candida krusei</i>	FM199965	603	99%	ITS1-4
11	<i>Candida kefyr</i>	HQ396523.1	533	97%	ITS1-4
12	<i>Candida tropicalis</i>	HQ412611.1	668	98%	ITS1-4
13	<i>Candida dubliniensis</i>	HQ259078.1	930	100%	ITS1-4
14	<i>Candida guilliermondii</i>	DQ663480.1	946	99%	ITS1-4
15	<i>Candida parapsilosis</i>	GU373656.1	767	99%	ITS1-4
16	<i>Candida parapsilosis</i>	FN652300.1	767	99%	ITS1-4
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FN393995.1	825	99%	ITS1-4
18	<i>Trichosporon dermatitis</i>	HM802130.1	859	100%	IGS
19	<i>Trichophyton violaceum</i>	FJ479792.1	830	99%	ITS1-4
20	<i>Trychophyton violaceum</i>	FJ479792.1	948	100%	ITS1-4
21	<i>Trichophyton tonsurans</i>	AY213630.1	939	100%	ITS1-4
22	<i>Trichophyton verrucosum</i>	AB491473.1	1054	97%	ITS1-4
23	<i>Scedosporium apiospermum</i>	AB567759.1	1000	99%	ITS1-4
24	<i>Scedosporium apiospermum</i>	AY213682.1	980	100%	ITS1-4
25	<i>Alternaria triticina</i>	GU59473.1	899	99%	ITS1-4
26	<i>Alternaria alternata</i>	HQ343446.1	740	100%	ITS1-4
27	<i>Alternaria alternata</i>	HQ115732.1	856	100%	ITS1-4
28	<i>Fusarium oxysporum</i>	GU205444.1	1019	99%	ITS1-4
29	<i>Fusarium oxysporum</i>	HM057335.1	1097	99%	ITS-1-4
30	<i>Fusarium oxysporum</i>	HQ248198.1	899	100%	ITS-1-4
31	<i>Microsporium canis</i>	GU291265.1	879	100%	ITS1-4
32	<i>Microsporium canis</i>	GU291265.1	1132	100%	ITS1-4
33	<i>Penicillium commune</i>	EU833215.1	796	99%	ITS1-4
34	<i>Penicillium citrinigrum</i>	GQ999241.1	960	100%	ITS1-4
35	<i>Sporotrichum pruinosum</i>	EU543990.1	982	99%	ITS1-4
36	<i>Acremonium strictum</i>	EU520092.1	917	99%	ITS1-4

discriminación filogenética, para la identificación de hongos de interés clínico a nivel de especie.

Material y métodos

La región ribosomal ITS1-ITS2 (*Internal Transcriber Spacer*) fue amplificada por PCR y secuenciada, siguiendo los métodos descritos por White et al². Para la extracción del material genético se utilizó el reactivo PrepMan[®] Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Wilmington, Delaware, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, y la PCR se realizó con un ciclo inicial de 94° durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos (94 °C, 30 segundos; 56 °C, 45 segundos y 72 °C, 2 minutos) y una elongación final a 72 °C durante 5 minutos. Las secuencias obtenidas de los amplicones fueron editadas (programas Sequencher, 4.1.4. Gene Code Corporation, Ann Arbor, EE.UU. y Vector NTI, Invitrogen Corporation, Carisbad, California, EE.UU.) y comparadas (programa BLAST) en la base de datos GenBank del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank). Este método se complementó, en casos particulares, con la secuenciación de los genes de la β -tubulina³ y del factor de elongación 1 α ⁴, así como de la región IGS (*Intergenic Spacer region*)⁵.

La aplicación de las técnicas moleculares se adaptaron a los consensos publicados en este campo^{6,7}.

En una fase preliminar de validación de la técnica se estudiaron los siguientes hongos: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 14018, *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 14053, *C. albicans* 44203, *Candida krusei* (*C. krusei*) ATCC 625, *C. krusei* SEIMC M105, *Candida dubliniensis* SEIMC MO204, *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) ATCC 204305,

Aspergillus flavus ATCC 204304, *Issatchenkia orientalis* ATCC 24210, y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824. Estos 12 hongos fueron correctamente identificados a nivel de especie (datos no mostrados).

Posteriormente, entre septiembre de 2008 y agosto de 2009, se llevó a cabo la aplicación de la técnica, de forma prospectiva, en un doble estudio: 1) Por una parte, se analizaron 36 cepas de hongos procedentes de diversas muestras clínicas en las que el uso de métodos convencionales no había permitido la identificación a nivel de especie. Dicha identificación convencional se basó en cultivo en agar Sabouraud cloranfenicol y agar Sabouraud actidiona (Bio-Rad, Manres La Coquette, Francia), criterios morfológicos y microscópicos^{8,9} y API ID 32C (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia); 2) Por otro lado, se evaluaron 39 muestras clínicas obtenidas por procedimientos invasivos (10 lavados bronco-alveolares, 7 válvulas cardíacas, 5 cepillos bronco-alveolares, 8 biopsias articulares, 7 biopsias de pulmón y 2 biopsias cerebrales) procedentes de pacientes con sospecha de infección fúngica. El ADN se obtuvo directamente de las muestras clínicas y se compararon los resultados obtenidos por el método molecular y por técnicas convencionales.

En cada identificación se siguieron los siguientes pasos: extracción del DNA, amplificación del material genético por PCR, comprobación de la aparición de un amplicón mediante electroforesis en un gel de agarosa (utilizando controles negativo y positivo), purificación de productos PCR, nueva comprobación en gel de agarosa, secuenciación y análisis de la secuencia.

La presencia de inhibidores en las muestras clínicas se descartó por amplificación en dicha muestra del gen de la beta-globina. Las muestras en las que no amplificó este gen se descartaron para el

estudio, lo que ocurrió en dos muestras de material contenido en una lesión nodular.

Resultados

Las técnicas de amplificación y secuenciación permitieron la identificación a nivel de especie de todos los hongos en los que no se había logrado este objetivo mediante la aplicación de las técnicas convencionales (tabla 1).

En la mayoría de los casos los métodos convencionales llegaron a la identificación únicamente del género, bien porque la morfología no aportaba información adecuada o (en el caso de las levaduras) porque la galería API ID32C no ofrecía un porcentaje suficiente de identificación. Destacamos, entre ellos, cuatro casos particulares: en el primero, la galería API ID 32C identificó como *Cryptococcus laurenti* un *Trichosporon dermatis*; en el segundo caso, un hongo filamentoso identificado por criterios morfológicos como *Alternaria alternata* fue finalmente identificado con el método molecular como *Alternaria triticina*, y en otros dos casos (que correspondieron con el método molecular a *Fusarium oxysporum* y *Sporotrichum pruinosum*, respectivamente) no se llegó a ninguna identificación inicial con los métodos habituales. En la tabla 1 se ven también los números de ID del GenBank.

En lo referido al estudio con muestras clínicas, en 35 de las 39 muestras evaluadas se obtuvo un resultado negativo, tanto con las técnicas convencionales como con las técnicas moleculares. Respecto a las cuatro restantes, en una verruga cardíaca y en una válvula cardíaca del mismo paciente se identificó *Scedosporium apiospermum*, tanto por técnicas moleculares como por cultivo; el estudio histológico confirmó la existencia de infección valvular y de reacción granulomatosa. Asimismo, con el método molecular se identificó un *Aspergillus sidowii* en una biopsia pulmonar de una mujer de 58 años, diabética y EPOC severo, sometida a trasplante bipulmonar, a tratamiento con micofenolato, tacrólimus y prednisona que presentó un cuadro de tos y disnea con infiltrado perihiliar derecho en la Rx de tórax y negatividad de cultivos para bacterias. En el cultivo se identificó previamente un *Aspergillus* spp.

Finalmente, el método molecular permitió la identificación de un *A. fumigatus* en un lavado bronco-alveolar de un enfermo cardiológico sometido a importante estrés quirúrgico. El paciente presentó un cuadro de tos productiva, derrame pleural y disnea. En este último caso el cultivo fue negativo.

Los métodos moleculares permitieron la identificación de los organismos, tanto a partir de los cultivos, como a partir de las muestras clínicas, en un tiempo que osciló entre 48 y 72 horas, en contraposición con los resultados obtenidos por cultivo, que se obtuvieron entre los 7 y los 21 días.

Discusión

Los resultados de este estudio indican el enorme potencial de la técnica molecular empleada para definir a nivel de especie una amplia variedad de hongos que se habían obtenido de muestras clínicas, y cuya identificación convencional no había sido posible con un grado razonable de fiabilidad. Es de esperar, que el método muestre también su utilidad para identificar otros hongos que plantean menos dificultades de estudio en el laboratorio clínico.

En este estudio sólo consideramos la aplicación clínica del método molecular para muestras invasivas, en las que la posibilidad de contaminación debe ser reducida, y por tanto, el valor clínico esperable es muy alto. A pesar del limitado número de muestras consideradas con ese criterio, en ningún caso en el que el método molecular fue negativo, dio positivo el cultivo. Esta alta sensibilidad de los métodos moleculares exige la necesidad de interpretar los resultados obtenidos en un contexto clínico, para evaluar si

los microorganismos que puedan identificarse con esta metodología tienen valor etiológico o sólo representan una colonización o incluso una contaminación. En nuestro caso, con el método molecular se identificaron dos especies de *Aspergillus*, una de las cuales de otro modo hubiera pasado desapercibida y en las que los datos clínicos indican que representaban aislados de verdadero valor etiológico. La notable reducción en el tiempo requerido para llegar a la identificación con el método molecular (de incluso semanas) es otra clara ventaja del mismo con respecto a los métodos convencionales. Por otra parte, la rápida obtención de un resultado negativo ayudaría a reorientar el diagnóstico etiológico, al tiempo que puede hacer innecesario el uso de antifúngicos. Por último, una identificación definitiva a nivel de especie permitiría instaurar un tratamiento específico con mayor rapidez.

Es de esperar, que en un futuro cercano las técnicas de identificación molecular alcancen el consenso y la estandarización necesarios para convertirse en una herramienta aplicable en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica, tanto para el diagnóstico directo en muestras clínicas¹⁰ como para el reconocimiento de hongos que no puedan identificarse a nivel de especie mediante técnicas convencionales.

En nuestra opinión, en los centros en los que se disponga del equipamiento necesario es razonable considerar la identificación molecular de los hongos de interés médico, aunque cada laboratorio debe definir su estrategia para esta actividad. El coste de reactivos para llevar a cabo la técnica parece más que justificable considerando el impacto que los resultados pueden tener, entre otros aspectos, en el tratamiento antifúngico. Para quienes tienen una formación adecuada en las técnicas de microbiología molecular, el método no plantea grandes dificultades para su aplicación. Es de esperar, que en un futuro cercano se despejen algunas de las incógnitas que aún quedan sobre la identificación molecular de hongos de importancia médica (algoritmos a utilizar, bases de datos más depuradas), lo que ayudará a la implantación de esta metodología en los laboratorios de microbiología clínica. Para aquellos centros con mayor limitación de personal o técnica, el recurso a laboratorios de referencia pueden representar una opción adecuada para lograr, en todo caso, una identificación fúngica fiable y de calidad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al IFIMAV (Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla). Avda de Valdecilla, s/n. 39008 Santander, Cantabria. Tfno: 942 331 077. Fax: 942 344 000. Correo electrónico: Ifimav.secretaria@fmdv.org, por haber apoyado la realización del estudio y haber contribuido a su financiación.

Bibliografía

1. Warnock DW. Fungal diseases: an evolving public health challenge. *Med Mycol.* 2006;44:697-705.
2. White TD, Bruns TJ, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
3. Cruse M, Telerant R, Gallagher LT, Taylor J. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia.* 2002;94:814-22.
4. Kristensen R, Torp M, Kosiak B, Holst-Jensen A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1alpha gene sequences. *Mycol Res.* 2005;109:173-86.
5. Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1826-30.
6. Clinical Laboratory Standards Institute. Interpretative criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequence; Approved Standard. MM18-A. Clinical Laboratory Standards Institute, 200. Wayne, Pa.

7. Balajee S, Borman A, Brandt M, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence Based Identification of *Aspergillus Fusarium*, and *Mucorales* Species in the Clinical Mycology Laboratory: Where Are We and Where Should We Go from Here? *J Clin Microbiol.* 2009;47:877–84.
8. De Hoog GS, Guarro J, Figueras J, Gene J. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). The Netherlands; 2000.
9. Freydiere AM, Guinet R. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* 2001;39:9–33.
10. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group EORTC/MSG Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1813–21.