



INFORME BREVE

Aislamiento de *Aspergillus tritici* desde ambiente interno (Chile): alcances ecológicos y clínicos



Peggy Vieille Oyarzo*, Rodrigo Cruz Choappa y Eduardo Piontelli Laforet

Laboratorio de Micología, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

Recibido el 16 de agosto de 2017; aceptado el 10 de noviembre de 2017

Disponible en Internet el 30 de marzo de 2018

PALABRAS CLAVE

Aspergillus tritici;
Sección Candidi

Resumen Los ambientes internos son un hábitat protector importante, donde el hombre reside o trabaja la mayor parte de su tiempo. Muchos de estos ambientes carecen de buena ventilación, lo que influye en la composición de sus comunidades microbianas y, en especial, de la fúngica. El objetivo de este estudio es comunicar la presencia de *Aspergillus* de la sección Candidi en ambientes internos de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso, Chile, y destacar su rol ecológico y su importancia en micología médica. Se efectuó la clasificación morfofisiológica y molecular de dichos aislamientos. Se realizó un muestreo no volumétrico ambiental en agar papa glucosado (PDA) mediante la exposición de 2 placas en 10 diferentes ambientes internos para seleccionar las especies de *Aspergillus*. Se efectuaron subcultivos en agar Czapek con extracto de levadura (CYA), agar extracto de malta (MEA) y agar creatina sacarosa (CREA) solo para las especies de esporas blancas, para su identificación morfofisiológica y posteriormente molecular. De 20 muestras analizadas, en solo una se aisló un miembro de *Aspergillus* perteneciente a la sección Candidi. Sobre la base de sus características morfológicas y moleculares, se clasificó a este aislamiento como *Aspergillus tritici* Mehrotra & Basu. Se describe su ecología y se discute su importancia médica.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Aspergillus tritici;
Section Candidi

Isolation of *Aspergillus tritici* from internal environment (Chile): Ecological and clinical scope

Abstract Indoor environments provide important protective habitats for humans, who live or work in them most of the time. Many of these environments lack ventilation, which affects the composition of microbial communities, especially that of the fungal community. The aim of

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: peggy.vieille@uv.cl (P. Vieille Oyarzo).

this study is to report the isolation of *Aspergillus* section Candidi from indoor environments of the School of Medicine at Universidad de Valparaíso, Chile, and identification through morpho-physiological and molecular approaches. Their ecological and clinical features were highlighted. An environmental non-volumetric sampling was performed on PDA medium; 2 petri dishes were exposed in 10 different places to select the *Aspergillus* samples. Subcultures were performed on agar Czapek with yeast extract (CYA), malt extract agar (MEA) and creatin sacarose agar (CREA) media only for the morpho-physiological and later the molecular identification of white spore species. Of the 20 samples analyzed, one *Aspergillus* belonging to Candidi section was isolated. Based on its morphology and molecular features, it was classified as *Aspergillus tritici* Mehrotra & Basu. Its ecology and medical relevance are reviewed and discussed.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Los ambientes internos son un hábitat protector importante, donde el hombre reside o trabaja la mayor parte de su tiempo. Muchos de estos ambientes carecen de buena ventilación, lo que influye en la composición de sus comunidades microbianas y, en especial, de la fúngica, que se adapta con el tiempo a su temperatura, humedad y sustratos orgánicos diversos, como materiales de construcción, textiles, productos alimenticios, polvo, etc.¹². Al crecer activamente en estos sustratos, los hongos dispersan una gran cantidad de propágulos (especialmente mitosporas) al aire, que pueden afectar a los humanos, ya sea por ser alérgenos, productores de micotoxinas, patógenos o patógenos oportunistas (en individuos con compromiso inmune), o bien por ser capaces de alterar los alimentos, así como de causar problemas en la agricultura y daños estructurales en los materiales edilicios^{3,4,12}.

Los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Talaromyces* (Eurotiomycetes) son los hongos más comunes de ambientes internos^{12,15}, a menudo asociados a sustratos específicos en los cuales producen gran cantidad de conidios, situación que facilita su aislamiento en diversos medios de cultivo.

Entre los representantes de género *Aspergillus* (que incluye más de 350 especies)¹³ comunes en ambientes internos, se aísla frecuentemente *Aspergillus niger*, *Aspergillus calidoustus*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*, entre otros. Estos organismos son capaces de producir micotoxinas y diversas micosis humanas, en especial los dos últimos^{4,9}.

La identificación morfológica de *Aspergillus* sigue principalmente los protocolos de Samson et al.¹³ y Houbraken et al.⁶. Las especies se agrupan en 4 subgéneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* y *Nidulantes*) y 20 secciones¹³. *Aspergillus tritici* es una especie perteneciente a la sección Candidi, que incluía una sola especie de esporas blancas: *Aspergillus candidus* Link. Dicho organismo se distribuye en zonas subtropicales y tropicales y es comúnmente encontrado en granos almacenados, semillas, especias, nueces y productos deshidratados (carne y frutas). Es morfológicamente muy similar a *A. niger*, excepto por la ausencia de coloración y la rugosidad de sus conidios⁵. *A. candidus* actúa disminuyendo la germinabilidad del grano

contaminado y produciendo componentes bioactivos con probable potencial tóxico⁸.

En la revisión de la sección Candidi de Varga et al.¹⁴, donde combinan datos de biología molecular, morfología, fisiología y perfiles de metabolitos secundarios, se establece que la sección comprende cuatro especies biseriadas de esporas blancas a amarillentas, moderadamente xerofílicas: *Aspergillus candidus*, *Aspergillus campestris*, *Aspergillus taichungensis* y *A. tritici*.

Todas estas especies producen terfenilinas y candidinas. La mayoría de estos compuestos son exclusivos de esta sección, por lo que son considerados como indicadores quimiotaxonómicos. Estos compuestos exhiben propiedades antioxidantes, citotóxicas, antimicrobianas e inmunosupresoras². Actualmente, la sección está compuesta por seis especies, dada la adición de *Aspergillus pragensis* y *Aspergillus subalbidus*¹⁵. La literatura reporta micosis, tanto superficiales como invasoras, atribuidas a *A. candidus*^{1,4,10}; sin embargo, esta especie no es capaz de crecer a 37 °C. Las únicas especies de la sección que poseen esta característica fisiológica son *A. tritici* y *A. taichungensis*, por lo que es probable que una de estas sea el agente causal de dichas infecciones, aunque también podrían estar provocadas por especies de esporas blancas mutantes de otras secciones, como *A. flavus*⁴.

Nuestro objetivo es comunicar el aislamiento de *Aspergillus* de la sección Candidi en ambientes internos de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso, así como destacar su rol ecológico y su importancia en micología médica.

Se realizó un muestreo ambiental, no volumétrico, que consistió en la exposición de dos placas de 10 cm de diámetro con agar papa dextrosa (PDA) expuestas al aire por 15 min en 10 diferentes ambientes internos (4 aulas, 4 oficinas, un auditorio, una hall de acceso). Posteriormente, se incubaron a 25 °C durante 10 días. Mediante el uso de una lupa estereoscópica se seleccionaron los desarrollos de *Aspergillus* en las placas; solo en una de las placas se destacó la presencia de una colonia de esporas blancas. El aislado se subcultivó en tres puntos de inoculación en placas de agar extracto de malta (MEA), agar Czapek con extracto de levadura (CYA) y

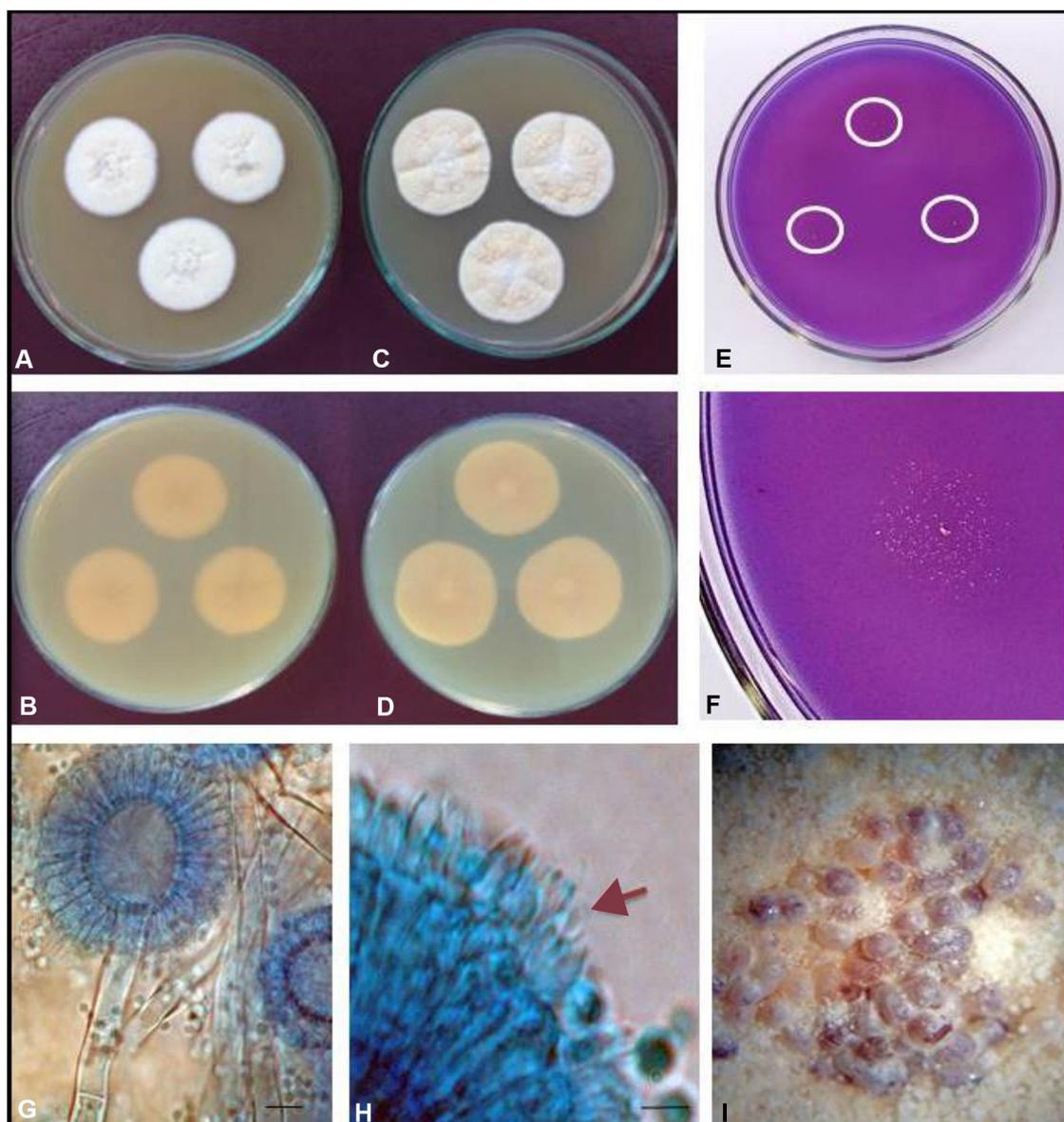


Figura 1 A,B) MEA (anverso, reverso) 25 °C. C,D) CYA 25 °C. E,F) CREA (anverso) 25 °C. En círculo, los puntos de crecimiento poco visibles. F) Detalle del escaso crecimiento a gran aumento. G) Conidióforo, métulas, fialides y conidios. H) Gran aumento de métulas y fialides. I) Esclerocios en CYA.

agar creatina sacarosa (CREA) a 25 °C y a 37 °C para evaluar el crecimiento y la posible producción de ácido. Se incubaron por espacio de 7 días. Desde uno de los cultivos puros obtenido en MEA se obtuvo un inóculo para sembrar en matraz Erlenmeyer con caldo de malta al 2% para la obtención de micelio y posterior extracción de ADN. Pasados 10 días de incubación en caldo, se filtró el micelio a través de papel de filtro y se lavó con solución fisiológica estéril tres veces, para retirar restos del medio de cultivo. Posteriormente y de manera aséptica, se traspasó a una placa Petri para el secado en estufa a 37 °C hasta que visiblemente se deshidrató en su totalidad. Una vez obtenido el micelio seco, se trituró mecánicamente con un bisturí de punta roma hasta obtener 200 mg de polvo de micelio, que se depositó en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml para seguir con el protocolo

de extracción del kit GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit, Thermo Scientific, según instrucciones del fabricante.

Se amplificaron por PCR convencional los genes codificantes de la calmodulina (cebadores Cmd5 y Cmd6) y la β -tubulina (Btb2a y Btb2b) y regiones ITS (ITS1 y 4) en termociclador T-100 de BioRad, con el siguiente protocolo por reacción: 12,5 μ l de DreamTaq M.Mix; 0,5 μ l de cada cebador [0,2 μ M]; 5 μ l de ADN para un volumen final de 25 μ l. Las condiciones fueron las siguientes: 95 °C inicial por 3 min y 35 ciclos de 95 °C por 1 min; 55,5 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 min, y una extensión final de 10 min. Para el paso de purificación se utilizó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Protocol (Promega) empleando el protocolo en gel. Los productos de la amplificación se

secuenciaron con un equipo 3730 xl/DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

Los análisis morfológicos mostraron a los 7 días de incubación colonias flocosas color crema, surcadas radialmente, con diámetros en MEA de 27 mm (25 °C) y 21 mm (37 °C), y en CYA de 32 mm (25 °C) y 27 mm (37 °C), con presencia de abundantes esclerocios color púrpura. Hubo poco crecimiento en CREA, sin producción de ácido. Se confirmó crecimiento hasta 40 °C. En los análisis microscópicos se observaron conidióforos lisos de 150 a 790 μm de largo por 5-9 μm de ancho, con algunos septos; vesículas radiadas, redondas a ovoides, de 15 a 23 μm de diámetro (variables en tamaño por presencia de cabezas diminutas), con métulas anchas de entre 9 y 17 μm por 5-7 μm y pequeñas filídes de entre 3-4 \times 2-3 μm , dando origen a conidios esféricos, lisos a finamente rugosos, de 2,5 a 3,5 μm de diámetro. Se observó gran variación en el tamaño de las estructuras conidiógenas. Sobre la base de estas características, se identificó morfológicamente a este hongo como *A. tritici* Mehrotra & Basu (fig. 1).

La identificación molecular de la especie se basó en la similitud de secuencias de regiones ITS del ADNr y de los genes de calmodulina y β -tubulina mediante la búsqueda en BLAST. Se comparó con las secuencias tipo depositadas en la base de datos GenBank. El aislamiento fue identificado como *A. tritici* con un 100% de identidad para β -tubulina y calmodulina, y con el 99% respecto del ITS de la cepa de referencia CBS 266.81. Se depositó en la base de secuencias con número de acceso a GenBank MG022438.1.

Los datos actuales indican que la sección Candidi incluye seis especies que comparten las siguientes características morfofisiológicas: crecimiento lento de sus colonias, con cabezas conidiales globosas, conidios hialinos o amarillos, conidióforos lisos, métulas que cubren entera la vesícula, con presencia de cabezas aspergilaes con grandes métulas y, a la vez, cabezas diminutas, en todas las especies; conidios lisos a finamente equinulados, subglobosos a ovoides, y presencia de esclerocios en tres especies (*A. candidus*, *A. taichungensis* y *A. tritici*)¹¹.

En un trabajo sobre polvo en ambiente interno en nueve países, Visagie et al.¹⁵ reportaron la presencia de 1160 especies de *Aspergillus*, entre ellas algunas de la sección Candidi, pero no hallaron *A. tritici*. Esto sugiere que la presencia en estos ambientes no es muy común.

La ecología de *A. tritici* es evidentemente similar a la de *A. candidus*, cuya presencia se asocia a granos y alimentos almacenados, así como a alimentos fermentados¹⁴. Su presencia en el aire puede derivar también de diversos materiales vegetales presentes en el suelo, que dispersan sus conidios en el aire. Esta situación ya fue registrada en ambientes externos de Santiago de Chile.

Dentro de la micología médica, la presencia de especies de la sección Candidi en cuadros clínicos es poco frecuente; sin embargo, los reportes incluyen desde onicomocosis hasta aspergilosis invasoras⁴.

Es muy probable que algunos de los informes que refieren micosis causadas por el grupo de *Aspergillus candidus* Link obedezcan en verdad a *A. tritici* o a algún otro integrante de la sección Candidi, tal como se discute en Hubka et al.⁷. Después de revisar 178 cepas clínicas de *Aspergillus* recuperadas de pacientes de la República Checa, estos autores reportan el primer caso de *A. tritici* asociado a onicomocosis (sobre la base de estudios de secuenciación) y sugieren que

podría tratarse del mismo agente asociado a *A. candidus* en reportes previos. En un estudio posterior del mismo grupo se estudiaron 9 cepas clínicas (seis de onicomocosis, una de otitis y dos de probables aspergilosis invasoras) que, sobre la base de la morfología, presumiblemente pertenecían a la sección Candidi. Los análisis por biología molecular (usando genes de β -tubulina, calmodulina y regiones ITS) mostraron que *A. candidus* fue el agente causal en la otitis, en tanto que de las dos muestras con probable aspergilosis invasora, una correspondió a *Aspergillus carneus* (sección Terrei) y la otra a *A. flavus* (sección Flavi). Tres aislados recuperados de uñas fueron identificados como *A. tritici* y uno como *A. candidus*. En ese trabajo se propone, además, una especie nueva dentro de la sección: *A. pragensis*, aislado de uña de pie⁸.

Ribeiro et al.¹⁰ reportaron un caso clínico de aspergilosis invasora por *A. candidus* en un paciente inmunocompetente que trabajó durante más de 15 años como agricultor, con constante exposición a molienda de granos. Dado que la clasificación de la especie la habían efectuado únicamente por morfofisiología, es probable que se tratara de algún otro miembro de la sección Candidi, ya que en ese mismo reporte se informa que hubo crecimiento a 37 °C. Estos resultados demuestran la necesidad de utilizar la identificación polifásica de miembros de *Aspergillus* relacionados con casos clínicos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Avanzini F, Bigoni A, Nicoletti G. A rare case of isolated aspergilloma of the sphenoid sinus. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 1991;11:483-9.
2. Cai S, Sun S, Zhou H, Kong X, Zhu T, Li D, Gu Q. Prenylated polyhydroxy-p-terphenyls from *Aspergillus taichungensis* ZHN-7-07. *J Nat Prod.* 2011;74:1106-10.
3. Chunduri J. Indoor fungal populations inhabiting cement structures remedial measures. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol.* 2014;8:19-24.
4. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi.* Utrecht/Reus: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2015.
5. Domsch KH, Gams W, Anderson TH. *Fungal monographs. En: Compendium of Soil Fungi.* Academic Press; 2007. p. 83-5.
6. Houbraeken J, de Vries RP, Samson RA. *Modern taxonomy of biotechnologically important Aspergillus and Penicillium species.* *Adv Appl Microbiol.* 2014;86:199-249.
7. Hubka V, Kubatova A, Mallatova N, Sedlacek P, Melichar J, Skorepova M, Mencl K, Lyskova P, Sramkova B, Chudickova M, Hamal P, Kolarik M. Rare and new etiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterized by molecular sequencing. *Med Mycol.* 2012;50:601-10.
8. Hubka V, Lyskova P, Frisvad JC, Peterson SW, Skorepova M, Kolarik M. *Aspergillus pragensis* sp. nov. discovered during molecular reidentification of clinical isolates belonging to *Aspergillus* section Candidi. *Med Mycol.* 2014;52:565-76.
9. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:310-50.

10. Ribeiro SC, Santana AN, Arriagada GH, Martins JE, Takagaki TY. A novel cause of invasive pulmonary infection in an immunocompetent patient: *Aspergillus candidus*. *J Infect.* 2005;51:e195–7.
11. Samson RA, Varga J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. En: Machida GK, editor. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Horizon Press; 2009. p. 19–40.
12. Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. *Food and Indoor Fungi*. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2010. p. 64–72.
13. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsube S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014;78:141–73.
14. Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. *Stud Mycol.* 2007;59:75–88.
15. Visagie CM, Hirooka Y, Tanney JB, Whitfield E, Mwange K, Meijer M, Amend AS, Seifert KA, Samson RA. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Stud Mycol.* 2014;78:63–139.