

Epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes de aspergilosis nosocomial

Josep Cano y María Soler

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Institut d'Estudis Avançats, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España

Resumen

Se enumeran y se discuten diferentes técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de las aspergilosis y a la tipificación de cepas de las principales especies patógenas. Las primeras, se basan mayoritariamente en la amplificación de un determinado fragmento de DNA mediante PCR y una posterior confirmación mediante *Southern-blot*. Para el tipado se utilizan principalmente los RAPD y en menor medida el análisis de microsatélites y la combinación de RFLPs con hibridaciones de DNA moderadamente repetitivo correspondiente al retrotransposon *Afut1*.

Palabras clave

Aspergillus spp, Aspergilosis, Epidemiología molecular, Métodos de tipificación

Molecular epidemiology for the detection of outbreaks of nosocomial aspergillosis

Summary

The most important molecular techniques used in the diagnosis of *Aspergillus* spp. and typing of the most pathogen species of this genus are described and discussed. The former, are mainly based in PCR amplification of a concrete DNA fragment and posterior confirmation with Southern-blot; RAPD techniques and less frequently microsatellite markers analysis and DNA-DNA hybridization to a moderately repeated, inactive, retrotransposon-like DNA *Afut 1* are used in typing clinical isolates.

Key words

Aspergillus spp, Aspergillosis, Molecular epidemiology, Typing methods

Las especies del género *Aspergillus* tienen una distribución cosmopolita, siendo sus conidios unos de los más ubicuos en el aire. La inhalación de los mismos por individuos inmunocompetentes, raramente tienen un efecto adverso, ya que son eliminados con relativa eficiencia por los mecanismos de inmunidad innata [1]. En los pacientes inmunocomprometidos, la situación es diferente, pudiendo determinar infecciones invasivas que en algunos casos pueden ser fatales. Según describen algunos autores, el riesgo de aspergilosis se incrementa con la duración de neutropenia, llegando a alcanzar hasta un 70% tras cinco semanas de neutropenia [2]. También se ha observado que la incidencia de las aspergilosis invasivas (A.I.), varía en función del órgano transplantado, observándose un riesgo de hasta el 18% en los trasplantes de corazón y pulmón [3].

A nivel diagnóstico, la ausencia de sintomatología específica así como de ensayos diagnósticos rápidos que detecten estas infecciones, han constituido uno de los mayores problemas en el tratamiento de estos pacientes. De todo lo expuesto, se desprende que un reconocimiento rápido y exacto de la infección invasiva fúngica, permitirá una terapia antifúngica apropiada, clave para reducir la mortalidad asociada con esta enfermedad diseminada [4].

Desgraciadamente, la identificación de los *Aspergillus* basándonos en métodos morfológicos requieren de un tiempo de incubación adecuado (5 días ó más) para evaluar las características, tanto de las colonias como las microscópicas; siendo necesarias unos mínimos conocimientos sobre la taxonomía del género *Aspergillus*, el cual comprende más de 130 especies, de las cuales, solo tres: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *A. terreus* provocan la mayoría de las A.I. [5].

De todo lo expuesto, se justifica la necesidad de abordar nuevas técnicas que nos permita la detección de *Aspergillus* spp. a partir de muestras ambientales y clínicas [6-8]. El objetivo de la presente revisión es dar a conocer algunas de las técnicas moleculares que se han propuesto para esta finalidad, así como otras que nos permiten la tipificación a nivel de cepa y por lo tanto la realización de estudios epidemiológicos y de seguimiento sobre el origen de un determinado brote de A.I.

Dirección para correspondencia:

Dr. J. Cano
Unitat de Microbiologia,
Facultat de Medicina,
C/ Sant Llorenç 21,
43201 Reus, España
Tel.: +34 977 759359; Fax: +34 977 759322
E-mail: jfcl@astor.urv.es

Tabla 1. Técnicas de PCR aplicadas en la detección de *Aspergillus* spp. (Extraída a partir de los datos de Brenier-Pinchart *et al.* (1999) p.18 [9]).

Autores (año)	Objetivo de la PCR	Especificidad	Condiciones específicas de la PCR y detección de los productos de la PCR	Técnica de confirmación
Spreadbury <i>et al.</i> (1993) [10]	Región espaciadora intergénica del rRNA 26s	<i>A. fumigatus</i>	Electroforesis en gel de agarosa (EGA)	<i>Southern blot</i> (Sb)
Tang <i>et al.</i> (1993) [11]	Genes de las proteasas alcalinas de <i>A. fumigatus</i> y <i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i>	EGA	Sb
Reddy <i>et al.</i> (1993) [12]	Cebadores basados en la secuencia de la proteína Asp1 de <i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> <i>A. restrictus</i>	EGA	Sb
Melchers <i>et al.</i> (1994) [13]	Gen del rRNA 18S de <i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Hot-start</i> PCR. EGA	Sb y posterior RFLP
Bretagne <i>et al.</i> (1995) [6]	DNA mitocondrial	<i>A. fumigatus</i>	PCR competitiva	Sb
Yamakami <i>et al.</i> (1996) [8]	Gen del rRNA 18S de <i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Nested-PCR</i> . EGA	Sb
Einsele <i>et al.</i> (1997) [7]	Gen del rRNA 18S de diferentes hongos patógenos	Hongos patógenos	EGA	Sb
Bretagne <i>et al.</i> (1998) [6]	DNA mitocondrial de <i>A. fumigatus</i> y <i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i>	PCR <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	Electroforesis en geles de acrilamida urea. Secuenciación

Técnicas moleculares de diagnóstico de *Aspergillus* spp.

La práctica totalidad de estas técnicas, se basan en la utilización de la PCR. Según Brenier-Pinchart *et al.* [9], y en base a los procedimientos que se siguen, podemos establecer dos grupos de técnicas diferentes. En el primero, se utilizarían cebadores específicos de *A. fumigatus* ó *Aspergillus* spp., y mediante una posterior hibridación se confirmaría la especificidad; en el segundo, el DNA fúngico es detectado mediante cebadores universales y a continuación se identificaría mediante hibridaciones especie-específica. Los mismos autores, han realizado un estudio comparativo de las técnicas utilizadas hasta ese momento, facilitando entre otros datos: las secuencias de los cebadores, las moléculas amplificadas (mayoritariamente correspondientes a genes ribosomales), la especificidad de la prueba (hongos patógenos, *Aspergillus* spp., *A. fumigatus*,...), las condiciones específicas de la PCR así como el procedimiento de detección de los productos de PCR y finalmente la técnica de confirmación, que mayoritariamente es el *Southern blot*. En la Tabla 1, se muestran de forma resumida, algunos de los datos facilitados de forma más extensa por Brenier-Pinchart *et al.* [9].

Otras técnicas más recientes, se han basado en poner en evidencia la diferente longitud de los amplicones del ITS-2 de las especies de *Aspergillus* mediante electroforesis capilar [14] o la secuenciación de los dos espaciadores intergénicos (ITS-1 y ITS-2) del espécimen problema y la posterior comparación (BLAST) con las secuencias depositadas en el GenBank [5].

Tipificación molecular de las cepas de *Aspergillus* spp.

Tal y como indica Latgé [1], las técnicas de RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) son las más utilizadas en la tipificación de las cepas de *A. fumigatus* [15-25]. Esta técnica se basa en la utilización de cebadores de

PCR con un reducido número de nucleótidos (10-12) y una baja temperatura de hibridación, generando bastantes fragmentos en una sola amplificación. El cebador que ha mostrado una mayor capacidad de discriminación es el R108 (gTATTgCCCT) [16]; otros autores han recurrido a los cebadores de enterobacteriaceas (ERIC-1 y ERIC-2) en el estudio de un brote nosocomial de A.I. provocada por *A. fumigatus* y *A. flavus* [26]. Las críticas más generalizadas contra esta técnica, se centran en la falta de reproducibilidad observada en algun caso; ello es debido al fundamento mismo de la técnica, ya que la sustitución de un solo nucleótido puede ser determinante en la amplificación o no de un fragmento concreto, por lo que no nos ha de extrañar que pequeñas diferencias en algunos aspectos de la PCR tengan el mismo efecto [27].

Otra técnica que también utiliza la PCR es la del análisis de microsatélites, pequeñas secuencias de dos a seis nucleótidos, repetidas en tandem y con un elevado polimorfismo. Dicha variabilidad puede ser evaluada por PCR, aunque el análisis preciso del tamaño de los alelos requiere el marcaje con fluorescencia de los cebadores y un secuenciador automático [28]. Esta técnica es rápida, extremadamente sensible y a diferencia de la RAPD, altamente reproducible.

Una técnica no basada en el uso de la PCR y que ha demostrado ser muy eficiente en el tipado de *A. fumigatus*, consiste en la hibridación de fragmentos provenientes de una digestión con enzimas de restricción y secuencias de DNA moderadamente repetitivo, en este caso concreto con la secuencia repetitiva *Afut1* [29,30]. Este fragmento codifica para secuencias de aminoácidos homólogas de la transcriptasa inversa, RNasa H y una endonucleasa codificados por el gen *pol* de los retrovirus [1]. La eficiencia de esta técnica quedó palpable en un estudio en el que se tiparon 800 aislados ambientales y clínicos de *A. fumigatus* resultando la mitad de los mismos de genotipos diferentes [30].

Bibliografía

1. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillosis*. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 310-350.
2. Ribaud P, Esperou-Bourdeau H, Devergie A, Gluckman E. Aspergillose invasive et allogreffe de moelle. Path Biol 1994; 42: 652-655.
3. Guillemain R, Lavarde V, Amrein C, Chevalier P, Guinvarc'h A, Glotz D. Invasive aspergillosis after transplantation. Transplant Proc 1995; 27: 1307-1309.
4. von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zuhlsdorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. Respiration 1995; 62: 341-347.
5. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J Clin Microbiol 2000; 38: 1510-1515.
6. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, et al. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 1164-1168.
7. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol 1997; 35: 1353-1360.
8. Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 2464-2468.
9. Brenier-Pinchart MP, Pelloux H, Lebeau B, Pinel C, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis. J Mycol Méd 1999; 9: 16-23.
10. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 615-621.
11. Tang MC, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen J. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. Am J Respir Dis 1993; 148: 1313-1317.
12. Reddy LV, Kumar A, Kurup VP. Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 1993; 7: 121-126.
13. Melchers WJG, Verweij PE, Van den Hurk P, et al. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. J Clin Microbiol 1994; 32: 1710-1717.
14. Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. J Clin Microbiol 1999; 37: 1846-1851.
15. 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.
16. 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: 2991-2993.
17. Buffington J, Reporter R, Lasker BA, et al. Investigation of an epidemic of invasive aspergillosis: utility of molecular typing with the use of random amplified polymorphic DNA probes. Pediatr Infect Dis J 1994; 13: 386-393.
18. Debeaupuis JP, Sarfati J, Chazalet V, Latgé JP. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun 1997; 65: 3080-3085.
19. Girardin H, Latgé JP, Srikantha T, Morrow B, Soll DR. Development of DNA probes to fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 1993; 31: 1547-1554.
20. Leenders A, Van Belkum A, Janssen S, et al. Molecular epidemiology of apparent outbreak of invasive aspergillosis in an hematology ward. J Clin Microbiol 1996; 34: 345-351.
21. Lin DM, Lehmann PF, Hamory BH, et al. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 1995; 33: 1596-1601.
22. Loudon KW, Burnie JP, Coke AP, Matthews RC. Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. J Clin Microbiol 1993; 31: 1117-1121.
23. Mondon P, Brenier MP, Coursange E, Lebeau B, Ambroise-Thomas P, Grillot T. Molecular typing of *Aspergillus fumigatus* strains by sequence specific DNA primer (SSDP) analysis. FEMS Immunol Med Microbiol 1997; 17: 95-102.
24. Van Belkum A, Quint WGV, De Pauw BE, Melchers WJG, Meis JF. Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus fumigatus* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 2502-2505.
25. Lin D, Lehmann PF, Hamory BH, et al. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 1995; 33: 1596-1601.
26. Leenders A, van Belkum A, Behrendt M, Luijendijk AD, Verbrugh HA. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. J Clin Microbiol 1999; 37: 1752-1757.
27. Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 126-146.
28. Bart-Delabesse, E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol 1998; 36: 2413-2418.
29. Girardin H, Sarfati J, Kobayashi H, Bouchara JP, Latgé JP. Use of DNA moderately repetitive sequence to type *Aspergillus fumigatus* isolates from aspergilloma patients. J Infect Dis. 1994; 168: 683-685.
30. Girardin H, Sarfati J, Traore F, Camet JD, Derouin F, Latgé JP. Molecular epidemiology of nosocomial invasive *Aspergillus*. J Clin Microbiol 1994; 32: 684-690.