

Clasificación de dermatofitos mediante PCR

Manuel Pereiro Ferreirós, Angeles Flórez Menéndez y Jaime Toribio Pérez

Departamento de Dermatología, Complejo Hospitalario Universitario, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España

Existen muchos trabajos intentando resolver el problema de la clasificación de los hongos mediante técnicas de biología molecular que estudian el ADN genómico, nuclear o mitocondrial, en los que los autores encuentran diferencias a nivel genérico o específico. Sin embargo, la mayoría de ellos comportan largos y dificultosos procedimientos en el laboratorio.

En este trabajo, estudiamos un fragmento de ADN mitocondrial de 1450 bp que codifica para los genes *ND4*, *ATP6* y *SsrRNA*, ampliando el fragmento estudiado en trabajos anteriores. Utilizamos los primers diseñados con anterioridad, y una pareja de primers universales que amplifican para la región adyacente del *SsrRNA*. Nuestro propósito es encontrar diferencias a nivel de especie.

Dermatofitos, Taxonomía, ADN mitocondrial, PCR

Dermatophytes classification by PCR

Summary

Many authors attempt to solve problems in fungal taxonomy using techniques based in molecular biology. We find reports based in different molecular techniques studying genomic, nuclear or mitochondrial DNA that led the authors to establish several specific or generic differences in this group of fungi. But mostly of them are long laboratory procedures.

At present study we study a 1450 bp fragment of mtDNA encoding the *ND4*, *ATP6* and *SsrDNA* and adjacent *SsrRNA* 3' termini sequence. We use three primer pairs previously designed. The other primer pair amplify the adjacent region of the *SSrRNA* gene is used as modified by Li *et al.* [3]. Our purpose is to find differences at the species level.

Key words

Dermatophytes, Taxonomy, Mitochondrial DNA, PCR

En la actualidad, el caballo de batalla con el que se intenta resolver los problemas taxonómicos de los hongos es la biología molecular. Así encontramos trabajos realizados con diversas técnicas, estudiando ADN genómico, nuclear o mitocondrial, que permiten establecer diferencias tanto genéricas como específicas dentro de este grupo de hongos. La mayoría de ellas se trata de largos y costosos procedimientos de laboratorio y los trabajos se realizan sobre un número limitado de cepas.

En estudios previos buscamos una correlación entre los caracteres morfológicos y las diferencias geográficas de cepas de *Trichophyton rubrum*, con diferencias en una secuencia de un fragmento de 1450 bp del ADN mitocondrial que codifica para los genes *ND4*, *ATP6* y *SSrRNA* [1]. Uno de los pares de *primers* amplificaba

fragmentos parciales de los genes *ND4-ATP6* y su correspondiente espacio intergénico exclusivamente en algunas de las cepas de *T. rubrum*, otro de ellos el segmento *ATP6-SSrRNA* en todas las cepas de dermatofitos del género *Trichophyton*, y el tercero amplificaba el gen *ATP6* en todos los hongos estudiados [2].

Dados los cortes enzimáticos obtenidos en los productos estudiados, suponemos que los fragmentos amplificados son idénticos en todos los dermatofitos en los que se obtienen productos con dichos *primers*, quedando pendiente de confirmar tal suposición por secuenciación de dichos fragmentos. Por lo tanto, procedimos a ampliar el fragmento de ADN mitocondrial estudiado en la región del gen que codifica para el *SSrRNA*, utilizando dos *primers* universales utilizados en otros Ascomycetes [3]. El objetivo de este trabajo es conseguir productos en el mayor número de especies posibles con el fin de poder efectuar comparaciones entre sus secuencias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de estudio. Seleccionamos 30 cepas de dermatofitos, dos de otros mohos y cuatro de levaduras, que desglosadas se corresponden a 20 *T. rubrum*, 4 *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, 1 *Trichophyton tonsurans*, 1 *Trichophyton megninii*, 1 *Microsporium canis*, 2 *Microsporium gypseum*, 1 *Penicillium sp.*, 1 *Scopulariopsis brevicaulis*, 1 *Candida*

Dirección para correspondencia:

Dr. M. Pereiro Jr.
Dpto. Dermatología, Facultad de Medicina,
San Francisco s/n, 15705 Santiago de Compostela
España
Fax: +34-981 547094; E-mail: manuellepe@usc.es

albicans, 1 *Candida stellatoidea*, 1 *Candida dubliniensis* y 1 *Rhodotorula rubra*. Todas estas cepas fueron aisladas de especímenes clínicos de pacientes con patología activa.

Preparación del ADN genómico. Las cepas fueron inoculadas en caldo de Sabouraud e incubadas a 25°C en agitador (100 rev min) durante 4-7 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento de la cepa. el micelio fue filtrado y repartido en alícuotas de (100-150 mg micelio seco en 700 µl de buffer citrato (0,2M citrato sódico 0,2M dihidrógeno fosfato sódico 0.15M cloruro sódico)) y almacenado a -30°C hasta su uso. El ADN genómico se aisló siguiendo el método de Hillis (Hillis y col., 1996). El micelio fue tratado con 2 µl de Liticasa (Sigma Química, España) (134 mg Liticasa 750 U/ml, en 1,68 ml buffer citrato), en 500 µl de buffer de extracción (200mM Tris 250 mM NaCl 25mM EDTA 0.5% SDS pH 8,5) a 37°C en agitador continuo toda la noche, y se extrajo con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) dos veces. El sobrenadante se precipitó con 1 ml de etanol absoluto a -30°C toda la noche, y posteriormente se lavó con etanol al 70% y 100 µl de bufer TE (0,1 M Tris HCl pH 7,5 0,001 M EDTA), y 10 µl de 3 M acetato de sodio. El *pellet* se secó 10 min a temperatura ambiente y se suspendió en agua destilada. Con este procedimiento obtenemos 25 µl de concentración entre 100-150 ng/µl.

Diseño de primers y PCR. Las búsquedas de secuencias fueron realizadas usando la página BLAST del GeneBank y EMBL. Los *primers* (Tabla 1) se diseñaron

basándonos en la secuencia X88896 [1,2] correspondiente a un fragmento de 5 kb del mtDNA de *T. rubrum*, y se utilizaron además los *primers* universales NMS1 y NMS2 [3]. Diseñamos un sistema de seis *primers* que amplifican tres fragmentos de 578, 259 y 651 bp, estas secuencias codifican para los genes *ND4*, *ATP6* y *SSrRNA*, e incluyen dos espacios intergénicos. Los tres pares de *primers* fueron utilizados con un protocolo de 32 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 60°C y 1 min 72°C. Con los pares NMS1-NMS2, TRM8-NMS2 y TRM4-NMS2 llevamos a cabo un protocolo de la denominada *step up* PCR como sigue:

- 4 ciclos 94:45:72°C 1 min cada, seguidos por 34 a 95:50:72°C 1 min cada.
- 4 ciclos 95:50:72°C 1 min cada, seguidos por 34 a 95:55:72°C 1 min cada.
- 4 ciclos 95:55:72°C 1 min cada, seguidos por 34 a 95:60:72°C 1 min cada.

La reacción PCR se realizó con un Progene ADN Thermal Cycler (Techne Ltd, USA), en 25 µl de coctel conteniendo 1 µl de ADN fúngico, 150 ng de cada primer, dNTPs mix (concentración final de 200mM de cada uno), 3 µl de 25mM MgCl₂, 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 9,0 y 2,5 unidades de Taq-polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, España).

Los productos obtenidos fueron analizados con alícuotas de 10 µl, por electroforesis en agarosa NuSieve al 1% (FMC Bioproducts, USA) y teñidos con bromuro de etidio.

Análisis de restricción. Las enzimas utilizadas en este estudio fueron *Bgl*II, *Dra*I, y *Eco*RI como enzimas de 6 bp de reconocimiento y *Hin*fl de 5 bp. Las enzimas fueron seleccionadas después de chequear los posibles puntos de restricción con el programa DNASIS (Tabla 2). Las digestiones fueron llevadas a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech). Los fragmentos de ADN obtenidos fueron separados con geles de agarosa al 2%, 1 h a 80 V y teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 1. *Primers* empleados en el estudio.

TRM1	5'GGT CTA CAT TAT TCT GTA TCA GG 3'
TRM2C	5'TTA CAA CGG TAT GTA CAG TTG AC 3'
TRM2	5' CTA ATG GAC AAC CTG ATG GAT C 3'
TRM4C	5' CTA ATG GAC AAC CTG ATG GAT C 3'
TRM4	5' GTA CCA TCA GGT TGT CCA TTA G 3'
TRM8C	5' AGG ATA GCG TTC AGT CAG AGC 3'
NMS1	5' CAG CAG TGA GAA TAT TGG TCA ATG 3'
NMS2	5' ATG TTA TTT AAT TCG ATG ATC 3'

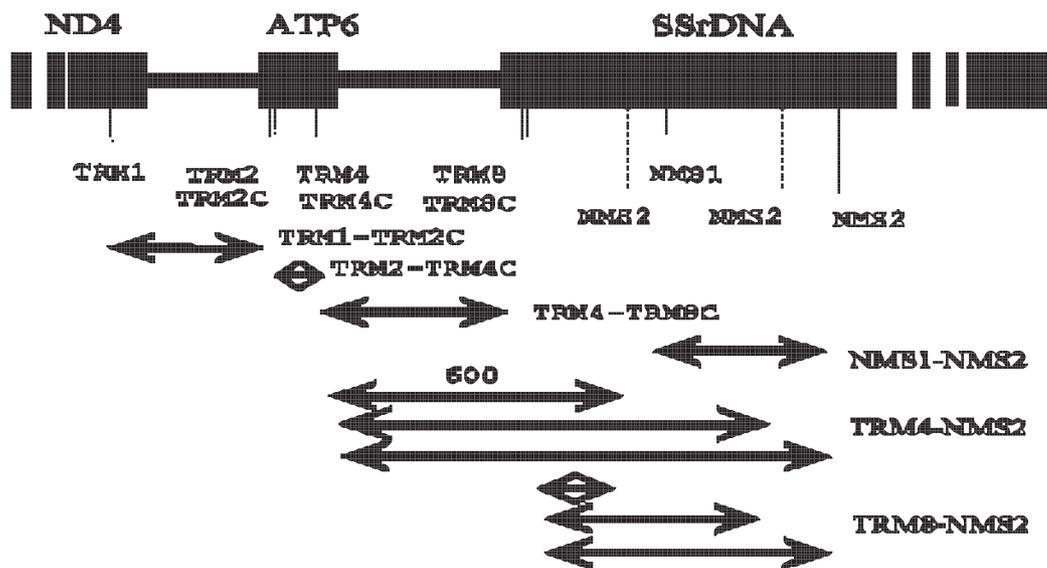


Gráfico 1. Representamos las diferentes zonas de hibridación de los *primers* utilizados sobre la secuencia estudiada. Podemos apreciar como NMS2 tiene varias posibilidades representadas con línea discontinua. Con línea continua se representa aquella que coincide con los 600 bp del producto obtenido con la pareja NMS1-NMS2. Sin embargo, al utilizarlo en combinación con el primer TRM8 nos da un producto menor.

Tabla 2. Esquema de las enzimas utilizadas para identificar la secuencia amplificada. La enzima *EcoRI* que no da ningún corte en la secuencia estudiada se utiliza como blanco.

Enzima	Secuencia	Loci	Nº de cortes	Nº de fragmentos
<i>DraI</i>	TTT!AAA	414	1	2
<i>BglII</i>	A!GATCT	969	1	2
<i>HinfI</i>	G!ANTC	547 / 1135	2	3
<i>EcoRI</i>	G!AATTC	0	0	0

RESULTADOS

Los *primers* TRM2 y TRM4C, todos los hongos analizados, excepto *Rhodotorula rubra* y *Penicillium*, y todos los productos obtenidos tienen la esperada longitud de 259bp. Los *primers* TRM4 y TRM8C amplifican el ADN de todos los dermatofitos del género *Trichophyton* con productos de 650 bp. Sólo 9 de los 20 *T. rubrum* estudiados amplifican el fragmento TRM1-TRM2C (Figura 1). En todos estos productos no encontramos diferencias tras el análisis de digestión enzimática.

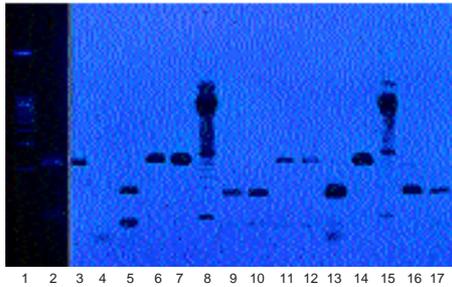


Figura 1. Producto PCR con 32 ciclos de 95:60:72°C. Calle 1: marcador de 500 bp. Calles 8 y 15: marcadores de 100 bp. Calles 2 y 3: producto PCR de los *primers* TRM1-TRM2C en *T. rubrum*. Calle 4: control negativo en escamas de piel humana no contaminada. Calles 5, 9, 10, 13, 16 y 17: producto de TRM2-TRM4C en *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* y *S. brevicaulis*. Se obtuvieron los mismos resultados con *Candida*, *Rhodotorula* y *Penicillium*. Calles 6, 7, 11, 12 y 14: producto de TRM4-TRM8C en *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Todos los hongos amplifican con los *primers* NMS1-NMS2 y se consiguen buenas amplificaciones aceptables con el par TRM4-NMS2 en una *step up* PCR a 55 y 60°C de temperatura de anillamiento (Figura 3).

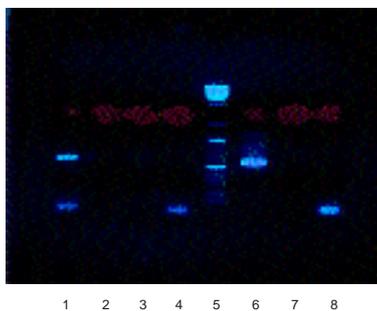


Figura 2. Calles 1-4: *step up* PCR con cuatro ciclos a 94:45:72°C y 34 a 95:50:72°C. Calles 6-8: *step up* PCR con cuatro ciclos a 95:50:72°C y 34 a 95:55:72°C. Calle 5: marcador 200 bp. Calles 1 y 6: producto NMS1-NMS2. Calles 2, 3 y 7: producto TRM4-TRM8C. Calles 4 y 8: producto TRM8-NMS2. Calles 1, 2, 4, 6 y 8: *T. rubrum*. Calles 3 y 7: *M. canis*. En la *step up* con anillamiento a 45:50, el par NMS1-NMS2 da un buen producto, mientras que a 50:55 produce varios dímeros. El resto de los *primers* no funcionan o producen dímeros (doble banda de calle 3).

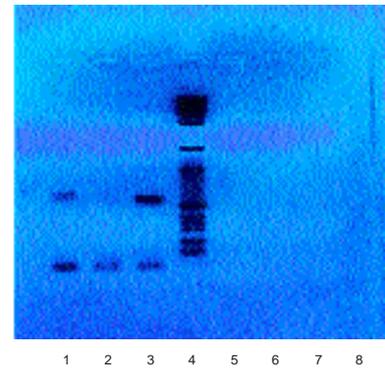


Figura 3. Calles 1-4: *step up* PCR con cuatro ciclos a 95:55:72°C y 34 a 95:60:72°C. Calles 6-8: PCR con 32 a 95:60:72°C. Calle 5: marcador 200 bp. Calles 1 y 6: producto NMS1-NMS2. Calles 2 y 3: producto TRM4-TRM8C. Calles 4, 7 y 8: producto TRM8-NMS2. Calles 1, 2, 4, 6 y 8: *T. rubrum*. Calles 3, 7 *M. canis*. La pareja TRM8-NMS2 da un buen producto en la *step up*, mientras que en la PCR convencional no funciona. El resto de los *primers* no funcionan o producen dímeros a dichas temperaturas.

DISCUSIÓN

Los dermatofitos son un grupo de organismos que se hallan estrechamente relacionados desde el punto de vista de la composición molecular de sus ácidos nucleicos, teniendo todos ellos un similar contenido en G+C [4]. Sin embargo muchos autores han conseguido diferenciar varios de estos hongos mediante técnicas basadas en la biología molecular [5-10], encontrando incluso diferencias intraespecíficas en *T. rubrum*.

El ADN mitocondrial de los mamíferos y otros animales (gusanos, insectos), tiene un tamaño de 16-19 Kb, conteniendo los mismos genes en similar organización. En los hongos, otros eucariotas, es también una molécula circular, pero con mayores diferencias en su tamaño (32 Kb *Aspergillus nidulans*, 78Kb *Saccharomyces cerevisiae*), presentando además una mayor dispersión de sus genes. Así las secuencias que codifican para las diferentes subunidades del ribosoma (21SrDNA, 18SrDNA, 5.8SrDNA) en *S. cerevisiae*, tienen separaciones de hasta 18 kb. Además podemos encontrar largos espacios intergénicos [11].

Hay varios trabajos basados en la PCR seguida de restricción enzimática que permiten diferenciar hongos *Ascomycetes*, *Zygomycetes* y varios hongos dimórficos [12-14]. Sin embargo no se han encontrado diferencias con estas técnicas en el ADN nuclear que codifica para el *SSrRNA* en varios dermatofitos [16]. Sin embargo se han encontrado diferencias a este nivel en *Verticillium spp.* y otros *Ascomycetes* [3,16,17]. En estudios sobre la micorriza *Laccaria proxima*, se han encontrado diferencias en las secuencias intergénicas [18,19] similares a los encontrados en el ADN humano [20,21], que han permitido diferenciar numerosos genotipos en el hombre.

En el presente estudio tratamos de encontrar diferencias en el ADN mitocondrial de diferentes dermatofitos. Elegimos una región de 1450bp, que codifica para los genes *ATP6*, *ND4* y *SSrRNA* y dos espacios intergénicos de 302bp y 295bp [1,2] que ya habíamos estudiado anteriormente. Ampliamos el fragmento estudiado mediante la utilización de dos *primers* universales que amplifican para una región conservada del gen que codifica para el *SSrRNA*. Tras estudiar las frecuencias de dichos *primers*, encontramos que el *primer* NMS1 coincide perfectamente con la secuencia de trabajo de Bievre a nivel de las bases 1718...1745, mientras que la secuencia NMS2 presenta varias posibilidades de hibridación en la cadena complementaria. Por ello procedemos a realizar combinaciones

con nuestros *primers* de la cadena principal y dicha secuencia, esperando ampliar el número de especies de dermatofitos en los que se obtienen productos para así poder comparar sus secuencias.

En algunas cepas de *T. rubrum* conseguimos amplificar los tres segmentos TRM1-TRM2C, TRM2-TRM4C y TRM4-TRM8C. En otros hongos del género *Trichophyton* sólo conseguimos amplificar los segmentos TRM2-TRM4C y TRM4-TRM8C, y en los del género *Microsporum*, en los mohos no dermatofitos y en las levaduras sólo se consiguen amplificaciones con el segmento TRM2-TRM4C (Figura 1).

El problema se plantea por el hecho de que los *primers* TRM8 y TRM4 diseñados por nosotros tienen una temperatura de hibridación más elevada que la de los *primers* universales. Se trata pues de buscar un procedimiento que permita la utilización conjunta de nuestros *primers* con los universales, recurriendo a la llamada *step up* PCR, en la que la utilización de unos cuantos ciclos a una baja temperatura de anillamiento al inicio del programa, permite la formación de productos de menor especificidad,

corriendo después la reacción en condiciones más restrictivas. Como se ve en la figura 2, a temperaturas de anillamiento de 55 y 60 °C, se obtienen varios productos, pero sólo los de menor peso molecular son obtenidos a temperaturas superiores.

En conjunto, nuestros datos demuestran que en esta región del ADN mitocondrial de los dermatofitos existen diferencias que pueden ser puestas de manifiesto mediante las técnicas utilizadas. Sin embargo es preciso realizar una secuenciación completa de los productos obtenidos para fijar tales diferencias y diseñar una técnica sencilla y reproducible que sea útil en la práctica diaria.

Este estudio ha sido realizado con la beca de investigación XUGA20819B96 de la Xunta de Galicia.

Bibliografía

- Bievre C, Dujon B. Organisation of the mitochondrial genome of *Trichophyton rubrum* DNA sequence analysis of the ND4 gene, the ATPase subunit-6 gene, the ribosomal RNA small-subunit gene, the ND6 gene, the COXIII gene, the ATPase subunit-8 gene and six tRNA genes that correspond respectively to the tyrosine, lysine, glutamine, asparagine, isoleucine and tryptophan isoacceptors. *Curr Genet* 1995; 28: 553-559.
- Pereiro Jr M, Florez A, Toribio J. Study of a *Trichophyton rubrum* mtDNA fragment encoding for ND4, ATP6 and SSrDNA genes using a six-primer system. *Datos sin publicar*.
- Li KN, Rouse DI, German TL. PCR primers that allow intergeneric differentiation of Ascomycetes and their application to *Verticillium* sp. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4324-431.
- Davidson FD, Mackenzie DWR. DNA homology studies in the taxonomy of dermatophytes. *J Med Vet Mycol* 1984; 22: 117-123.
- Guillamón JM, Cano J, Ramón D, Guarro J. Molecular differentiation of *Keratinomyces* (*Trichophyton*) species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 69: 223-227.
- Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H. Phylogenetic relationships of some *Microsporum* and *Arthroderma* species inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* 1995; 130: 11-21.
- Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, Nishimura K, Miyaji M. Phylogeny of *Epidermophyton floccosum* and other dermatophytes. *Mycopathologia* 1996; 134: 121-128.
- Mochizuki T, Watanabe S, Uehara M. Genetic homogeneity of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* from geographically distant regions. *J Med Vet Mycol* 1996; 34: 139-143.
- Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* 1992; 117: 127-132.
- Bievre C, Dauguet C, Nguyen VH, Ibrahim-Granet O. Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 1987; 28: 719-727.
- Palumbi SR. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In Hillis DM, Moritz C, Mable B (Eds). *Molecular Systematics* (2nd Ed). Massachusetts, Sinauer associates Inc Pub, 1996: 205-248.
- Hopfer RL, Walden P, Setterquist S, Highsmith WE. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol* 1993; 31: 65-75.
- Verweij PE, Meis JFGM, Hurk P, Zoll J, Samson RA, Melchers WJG. Phylogenetic relationships of five species of *Aspergillus* and related taxa as deduced by comparison of sequences of small subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 185-190.
- Belkum A, Quint WG, Paw BE, Melchers WJG, Meis JF. Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus fumigatus* isolates by interpret polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2502-2502.
- Bock M, Maiwald M, Kappe R, Nickel P, Naher H. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. *Mycoses* 1994; 37: 79-84.
- Yamamoto H, Naruse A, Oshaki T, Sekiguchi J. Nucleotide sequence and characterization of the large mitochondrial rRNA gene of *Penicillium urticae*, and its comparison with those of other filamentous fungi. *J Biochem* 1996; 117: 888-896.
- Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1323-1330.
- Albee S, Mueller GM, Kropp BR. Polymorphisms in the large intergenic spacer of the nuclear ribosomal repeat identify *Laccaria proxima* strains. *Mycologia* 1996; 88: 970-976.
- Kohn LM. Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* 1992; 84: 139-153.
- Wilson MR, Polansky D, Butler J, DiZinno JA, Replogle J, Budowle B. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *Biotechniques* 1995; 18: 662-669.
- Barros F, Lareu MV, Salas A, Carracedo A. Rapid and enhanced detection of mitochondrial DNA variation using single-strand conformation analysis of superposed restriction enzyme fragments from polymerase chain reaction-amplified products. *Electrophoresis* 1997; 18: 52-54.