**Tipificación molecular de aislados clínicos de *Aspergillus fumigatus* procedentes de México y Argentina utilizando el microsatélite CSP**

Emmanuel Rosas de Paza, Guadalupe Aguilera Arreolab, Esperanza Duarte Escalantea, María Guadalupe Frías De León3, Erick Martínez Herreraa, Gustavo Acosta Altamiranod y María del Rocío Reyes Montesa

aDepartamento de Microbiología y Parasitología,Facultad de Medicina, UNAM, [emmrodepaz@gmail.com](mailto:emmrodepaz@gmail.com), [dupe@unam.mx](mailto:dupe@unam.mx%20), [martinezerickh@gmail.com](mailto:martinezerickh@gmail.com%20), [remoa@unam.mx](mailto:remoa@unam.mx%20)

bEscuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, [lupita\_aguilera@hotmail.com](mailto:lupita_aguilera@hotmail.com)

cDivisión de Investigación, Hospital Juárez de México, [magpefrias@gmail.com](mailto:magpefrias@gmail.com)

dInstituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, [mq9903@live.com](mailto:mq9903@live.com)

**RESUMEN**

**Introducción**: Los métodos moleculares con base en secuencias de DNA, han demostrado ser de gran utilidad en la tipificación de aislados de *A. fumigatus*, entre estos resalta el que utiliza el gen AFUA\_3G08990 (CSP-Proteína de Superficie Celular), el cual también ha sido utilizado para subtipificar aislados y proponer una nueva nomenclatura.

**Objetivo**: Tipificar aislados clínicos de México y Argentina, utilizando el microsatélite CSP.

**Parte experimental**: Se utilizaron 35 aislados *de A. fumigatus* proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina, el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, y el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” México D.F. Se realizó el primoaislamiento de los hongos, la obtención de los cultivos monospóricos y la obtención de DNA genómico. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación del microsatélite, con estas secuencias se construyó un dendrograma por inferencia bayesiana y se identificaron los tipos de microsatélites.

**Resultados**: El dendrograma mostró la formación de siete grupos, los cuales no se relacionaron por región geográfica, también se encontraron 12 tipos de microsatélites CSP.

**Conclusiones**: El trabajo validó la utilidad del microsatélite CSP para la tipificación de los aislados estudiados, además se describieron cuatro nuevas repetidos de 12-mer entre los aislados de México y Argentina y se evidenció mayor variabilidad genética entre los aislados de México que entre los de Argentina.

**INTRODUCCIÓN**

La aspergilosis incluye un amplio espectro de enfermedades causadas por hongos del género *Aspergillus,* con manifestaciones clínicas como son la colonización (por ejemplo, aspergiloma), la aspergilosis broncopulmonar alérgica, y las formas diseminadas de la infección. La aspergilosis invasora (AI) es una infección que se produce en pacientes severamente inmunodeprimidos, sobre todo, en pacientes que han sido sometidos a trasplante de células madre, pacientes con cáncer hematológico, pacientes con cuadros de neutropenia prolongada (Marr et al., 2002; De La Rosa et al., 2002) y pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (esta ha sido la causa más importante de mortalidad en estos pacientes) (Cohen et al., 1981; Mouy et al., 1994; Winkelstein et al., 2000). Asimismo, la AI permanece como la causa principal de morbilidad y mortalidad en pacientes con transplante de órganos. El género *Aspergillus* contiene más de 200 especies (Geiser et al., 2007), de las cuales alrededor de 20 han sido documentadas como causantes de AI en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (Hubka et al., 2012; Segal et al., 1998; Verweij et al., 2008; Vinh et al., 2009a; Vinh et al., 2009b), y *A. fumigatus* es el agente etiológico más comúnmente asociado a esta forma clínica.

La variabilidad genética de *A. fumigatus* y especies relacionadas, ha sido estudiada a través de varias técnicas fenotípicas y genotípicas. Entre las técnicas fenotípicas están los perfiles de metabolitos secundarios, la caracterización de polisacáridos extracelulares, los perfiles de antígenos proteicos y la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), sin embargo las más utilizados en el área médica son la macro y la micromorfología (Rinyu et al., 1995). A pesar del gran valor que tuvieron las técnicas fenotípicas para la tipificación de *A. fumigatus*, éstas presentan limitaciones. Actualmente, la aplicación de métodos genotípicos y los sistemas con base en el análisis del DNA, pueden cubrir esas limitaciones. Además éstos han demostrado tener mayor utilidad en el estudio de la diversidad genética de *A. fumigatus*. Por otro lado para la genotipificación de *A. fumigatus* se han utilizado métodos entre los que se encuentran, el análisis de fragmentos polimórficos obtenidos por restricción (RFLP), los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), la PCR inter-repetitiva (PCR basada en elementos ERIC), DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR*),* el análisis de electroforesis engel de campo pulsado (PFGE), el diseño de oligonucleótidos de DNA de secuencia específica (SSDP), las “huellas” (*fingerprinting*) de secuencias de DNA repetitivas (con base en el uso combinado de mini, microsatélites y RAPD), la secuenciación parcial de genes conocidos, la utilización de microsatélites y la amplificación al azar de microsatelites (RAMS), entre otros (Spreadbury et al.,1990; Tang et al.,1993; Van Belkum et al., 1993, Meis, 1993; Taylor et al., 1999). El uso de las estrategias metodológicas ha permitido establecer la diversidad de los aislados de *A. fumigatus*, algunas son más informativas que otras, sin embargo las secuencias de genes conocidos han demostrado ser excelentes marcadores para la tipificación y el estudio de la genética de poblaciones de hongos (Hurst et al., 2009). Sin embargo, el marcador microsatélite CSP ha mostrado buenos resultados, como muestra el estudio realizado por Hurst et al. 2009), quienes propusieran un método de tipificación de secuencias de un solo locus, denominado tipificación CSP, como una herramienta de tipificación para aislados de *A. fumigatus*.

**TEORÍA**

La diversidad genética del micfrosatélite CSP, surge de repetidos en tándem de 12-mer y de mutaciones puntuales del gen *afua\_3G08990* (Balajee et al., 2007a)**.**  El objetivo de dicho estudio fue evaluar la capacidad de tipificación, la estabilidad *in vitro* y la reproducibilidad interlaboratorio (con datos generados por diversos laboratorios bajo diferentes condiciones experimentales) con el fin de emplearlo en estudios epidemiológicos de aislados de *A. fumigatus*, además se analizó la concordancia de este método de tipificación y se comparó con otros métodos de tipificación. Los resultados revelaron que este método de tipificación CSP fue un método reproducible y portátil para la tipificación de aislados de *A. fumigatus* y debido a que utiliza una estrategia de comparación de secuencias que no requiere software ni un entrenamiento complicado para su análisis, haciéndolo un método útil en laboratorios microbiológicos de referencia (Hurst et al., 2009).

**PARTE EXPERIMENTAL**

**Origen de los aislados de *A. fumigatus.*** Se utilizaron 35 aislados de *Aspergillus* spp.: 15 aislados fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina, 21 aislados fueron proporcionados por el Hospital Infantil de México Federico Gómez y 2 aislados del Hospital General Dr. Manuel Gea González, algunos de ellos fueron previamente identificados como *A. fumigatus* utilizando métodos convencionales. También se utilizaron las cepas de referencia ATCC, MYA-3626 de *A. fumigatus* y MYA-3566 de *A. lentulus* (ATCC, Manassas, USA).

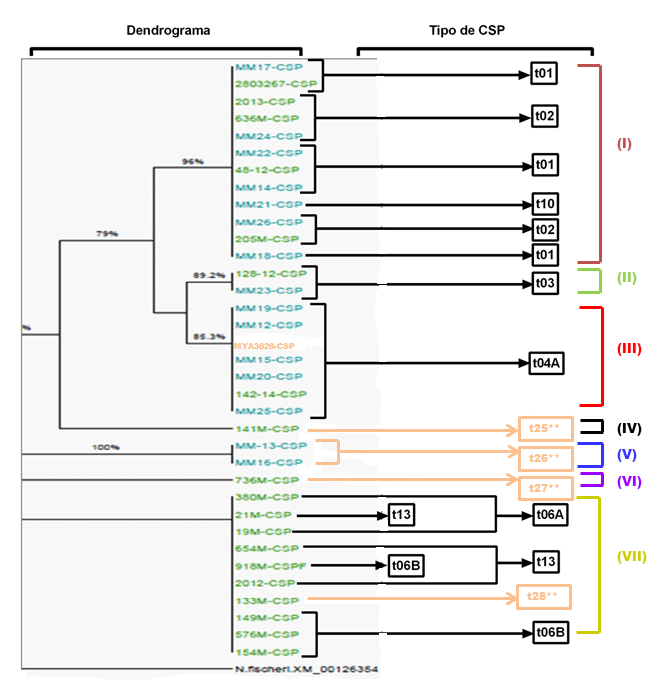
**PCR de los aislados de *A. fumigatus* utilizando el microsatélite CSP.** Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados a partir del gen *afu\_3G08990* (CSP), los cuales fueron denominados como CSP-F y CSP-R (Balajee et al., 2007b)***.***La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 25 µL: 10X *Taq* Buffer con KCl (Applied Biosystems), 2000 µM de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 10 mM de MgCl2 (Applied Biosystems), 100 pM/µL de oligonucleótidos (Sigma-Aldrich, Texas, USA) y 5 U *Taq* DNA Polimerasa recombinante (*Taq* Pol) (Fermentas., Inc. USA). La amplificación se realizó en un termociclador Swift maxi ESCO (Micro Pte Ltd ver 1.0) con el siguiente programa: un ciclo de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de: 15 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 30 s a 68 °C y un ciclo de extensión final de 2 min a 68 °C. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5X (45 mM Tris-Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) teñido con GelRed™ (Biotium, CA, US). ( (0.5 µg/100 mL). El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 100 V en amortiguador TBE en una cámara de electroforesis (Bio-Rad). El estándar de tamaño molecular empleado fue de 100pb DNA Ladder (Fermentas). Se utilizó como testigo positivo una cepa de referencia de *A. fumigatus* y agua como testigo negativo. Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad).

**Análisis de datos**. Para la tipificación de los aislados identificados como *A. fumigatus,* a través delmicrosatélite CSP, se utilizó el método de Inferencia Bayesiana con 3,000,000 de generaciones, y se obtuvo un dendrograma, el cual se editó con el programa Figtree ver 1.4.1. El dendrograma obtenido fue validado con el método de probabilidad posterior.

Para tipificar los aislados clínicos identificados como *A. fumigatus,* se utilizó la nomenclatura propuesta por Klaassen (2009), la cual se realiza con base en los tipos de repeticiones presentes y su distribución en patrones o “tipos CSP. Cada aislado se amplificó por duplicado con el gen CSP, posteriormente se editaron las secuencias con el programa BioEdit ver. 7.2.5. (Hall, 1999) para obtener una secuencia consenso. Para identificar diferentes tipos de microsatélites se utilizó el programa GeneDoc ver. 2,7.000 (Nicholas et al., 1997) y para la edición de los microsatélites se utilizó el programa GraphPad Prism ver. 6.01. (Motulsky y Christopoulos et al., 2004).

**RESULTADOS**

Con las secuencias obtenidas de los aislados identificados como *A. fumigatus*, obtenidas con el microsatélite CSP, se realizó una reconstrucción filogenética (Inferencia Bayesiana) y se analizó el método de clasificación propuesto por Klaassen (2009). El método de Inferencia Bayesiana mostró una topología de siete grupos: el grupo I incluyó 7 aislados de Argentina y 5 aislados de México. El grupo II incluyó un aislado de México y uno de Argentina. El grupo III se formó con 5 aislados de Argentina, uno de México y la cepa de referencia ATCC (MYA-3626). El grupo IV estuvo formado con un aislado de México. El grupo V se formó con 2 aislados de Argentina. El grupo VI se formó con un aislado de México. Finalmente, el grupo VII se formó con 10 aislados de México (Figura 1).



**Figura 1.** Dendrograma obtenido por Inferencia Bayesiana utilizando el microsatélite CSP. Este se validó por el método de probabilidad posterior. Cepa ATCC correspondiente a la especie *A. fumigatus* (rojo). Aislados procedentes de Argentina (azul claro) y aislados procedentes de México (verde). Una secuencia de *Neosartorya fischeri* fue utilizada como grupo externo. Se muestra la relación entre el dendrograma obtenido por Inferencia Bayesiana y los patrones de repeticiones (12-mer) (\*\*anaranjado)=patrones no reportados en la literatura.

Finalmente, se relacionaron los resultados obtenidos a partir del dendrograma y los obtenidos al utilizar la nomenclatura propuesta por Klaasen (2009) (Figura 1). Estos resultados mostraron que los 20 aislados de *A. fumigatus*  procedentes de México presentaron un total de 10 tipos de CSP (t01, t02, t03, t04A, t25, t27, t06A, t13, t06B y t28), mientras que los aislados de *A. fumigatus* procedentes de Argentinapresentaron 6 tipos de CSP (t01, t02, t03, t10, t04A y t26), lo que mostró que hay una mayor diversidad de genotipos del hongo en los aislados de México que en los de Argentina.

**CONCLUSIONES**

La tipificación de los aislados de *A. fumigatus* con el microsatélite *CSP* mostró que los aislados de México tienen más variabilidad genética que los de Argentina y evidenció la presencia de un microsatélite y cuatro patrones de repetición no reportados en la literatura.

**BIBLIOGRAFÍA**

* Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. Studies in Mycology. 2007a;59:39–46.
* Balajee SA, Tay ST, Lasker BA, et al. Characterization of a novel gene strain typing reveals substructuring of *Aspergillus fumigatus* across North America. Eukaryot Cell. 2007b;6:1392-1399
* Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, et al. Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. Am J Med. 1981;71:59–66.
* De La Rosa GR, Champlin RE, Kontoyiannis DP. Risk factors for the development of invasive fungal infections in allogeneic blood and marrow transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2002;4:3-9.
* Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser. 1999;41:95-98.
* Hubka V, Kubatova A, Mallatova N, et al. Rare and new etiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterized by molecular sequencing. Med Mycol. 2012; 50:601–610.
* Hurst SF, Kidd SE, Morrissey CO, et al*.* Interlaboratory reproducibility of a single-locus sequence-based method for strain typing of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Mirobiol. 2009;47:1562-1564.
* Klaassen CH. MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. Med Mycol. 2009; 47:S27–33.
* Marr KA, Carter RA, Boeckh M, et al*.* Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. Blood. 2002;100:4358-4366.
* Meis JF. Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus fumigatus* by Inter-repeat polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993;31:2502-2505.
* Motulsky H and Christopoulos A. Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression. A Practical Guide to Curve Fitting. Oxford University Press, New York, 2004; ISBN: 0195171802.
* Mouy R, Veber F, Blanche S, et al. Long-term itraconazole prophylaxis against *Aspergillus* infections in thirty-two patients with chronic granulomatous disease. J Pediatr. 1994;125:998–1003.
* Nicholas K.B, Nicholas HB Jr, and Deerfield DWII. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, EMBNEW.NEWS. 1997;4:14.
* Rinyu E, Varga J and Gerenczy L. Phenotypic and Genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus* J Clin Microbiol. 1995;33:2567-2575.
* Segal BH, De Carlo ES, Kwon-Chung KJ, et al. *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. Medicine (Baltimore). 1998;77:345–354.
* Spreadbury CL, Bainbridge W and Cohen J. Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene complex of *Aspergillus nidulans*. J Gen Microbiol. 1990;136:1991–1994.
* Tang CM, Holden DW, Aufauvre-Brown A, et al*.* The detection of *Aspergillus* spp. By the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. Am Rev Respir Dis. 1993;148:1313–1317.
* Taylor JW, Geiser DM, Burt A, et al. The Evolutionary Biology and Population Genetics Underlying Fungal Strain Typing. Clin Microb Rev. 1999;12:126–146.
* Verweij PE, Varga J, Houbraken J, et al*.* *Emericella quadrilineata* as cause of invasive aspergillosis. Emerg Infect Dis. 2008;14:566–572.
* Van Belkum A, Quint WGW, De Pauw BE, et al.Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus fumigatus* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993;31:2502–2505.
* Vinh DC, Shea YR, Jones PA, et al. Chronic invasive aspergillosis caused by *Aspergillus viridinutans.* Emerg Infect Dis. 2009a;15:1292–1294.
* Vinh DC, Shea YR, Sugui JA, et al*.* Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae.* Clin Infect Dis. 2009b;49:102–111.
* Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. Medicine (Baltimore). 2000; 79:155–169.