

Diagnóstico de Aspergilosis Invasiva mediante la aplicación de la Técnica Molecular Nested-PCR en sangre de pacientes inmunodeprimidos en el Hospital de SOLCA.

AUTORES:

*Dr. Msc. Pedro Dávila Tapia. **Dr. Msc. José Dávila Terreros.

* *Pediatra Máster en Biología Molecular e Ingeniería Genética. Médico Tratante del Hospital Francisco Icaza Bustamante.*

** *Médico Máster en Biología Molecular e Ingeniería Genética.*

ABSTRACTO

Nosotros investigamos la posible presencia de ADN específico para especies de aspergillus en muestras de suero sanguíneo de pacientes con aspergilosis invasiva (IA) por el método de NESTED-PCR. Catorce cepas de hongos incluyendo 5 cepas de especies de Aspergillus fueron usados para la examinación de especificidad y sensibilidad de la NESTED PCR. Dos juegos de primers fueron derivados desde la secuencia de las regiones variables V7 a V9 de los genes de rARN 18S del aspergillus fumigatus (Fig.1).

El fragmento fue amplificado desde cinco cepas de especies de aspergillus por esta técnica molecular.

El ADN blanco fue detectado por NESTED-PCR en una cantidad mínima de 50 fentogramos del ADN extraído del Aspergillus fumigatus.

La alta sensibilidad y especificidad de la NESTED-PCR indican que estos ensayos pueden proveer un diagnóstico temprano con suficiente precisión para ser clínicamente útiles para pacientes inmunocomprometidos con IA.

Palabra clave: Aspergelosis invasiva. NESTED-PCR. Inmunodeprimidos Neutropénicos.

ABSTRACT

We investigated the possible presence of DNA specific for Aspergillus species in serum samples of patients with invasive aspergillosis (IA) by the nested PCR method. Fourteen strains of fungi including 5 strains of Aspergillus species were used for examination of specificity and sensitivity of the nested PCR. Two sets of oligonucleotide primers were derived from the sequence of the variable regions V7 to V9 of the 18S rRNA genes of Aspergillus fumigatus.

The specific fragment was amplified from five strains of Aspergillus species in the single and nested PCR. Target DNA was detected by the nested PCR with as little as 50 fg. of the extracted DNA of A. fumigatus. The high sensitivity and specificity of the nested PCR indicate that assay can provide early diagnosis with sufficient accuracy to be clinically useful for immunocompromised patients with IA.

Key Words: Invasive Aspergillosis. NESTED-PCR. Immunocompetend. Neutropenic.

Introducción.

El Aspergillus fumigatus, es un patógeno oportunista, es decir, afecta casi exclusivamente a pacientes con mecanismos de defensa comprometidos⁽¹⁾. Es un hongo del género Aspergillus, saprofita, filamentoso, hialino septado (hipomiceto), ubicuo, del grupo Deuteromycetos u hongo imperfecto, ampliamente difundido en toda la tierra y a nivel de todos los ambientes, siendo su medio ideal los lugares húmedos, oscuros y cerrados, en los hospitales se encuentra en el agua de las cisternas, paredes de los baños, ductos de aire acondicionado, bodegas, cocina, quirófanos y otros, por lo que se le considera también un patógeno nosocomial⁽²⁾.

Las esporas del Aspergillus en condiciones adecuadas pueden sobrevivir miles de años⁽³⁾, manteniendo e incluso incrementando su capacidad invasiva y alérgica.

La aspergilosis⁽⁴⁾, comprende una serie de procesos patológicos que incluyen: 1) intoxicaciones producidas por la ingestión de alimentos contaminados⁽²⁾, alergia y sus secuelas a causa de conidios⁽³⁾, colonización en las cavidades preformadas y en los tejidos debilitados⁽⁴⁾, enfermedad penetrante, inflamatoria, granulomatosa, necrosante de los pulmones o de otros órganos. Si se generaliza y se disemina es altamente mortal⁽⁵⁾.

P. A. Micheli⁽⁶⁾, en 1.729 inventó el término Aspergillus (del latín salpicar, asperjar).

Mayer y Emmer⁽⁷⁾, en 1.815 describen por primera vez la infección a nivel pulmonar.

Fresenius en 1.850 utilizó por primera vez el término "aspergilosis", en una infección fúngica en el saco aéreo de un pájaro. Al microorganismo aislado, le dio el nombre de Aspergillus fumigatus⁽⁸⁾.

Correspondencias y Separatas:

Dr. Msc. Pedro Dávila Tapia
pedro_davila52@yahoo.com
Hospital Pediátrico Francisco Icaza Bustamante
Calle Quito y Gómez Rendón
Guayaquil - Ecuador

© Los Derechos de autor de los artículos de la Revista Oncología pertenecen a la Sociedad de Lucha contra el Cáncer.



Bennett reconoció la infección humana en 1.842 ⁽⁹⁾, y Virchow en 1.856 ⁽¹⁰⁾, publicó un informe de enfermedad broncopulmonar, junto con la descripción exacta de los agentes etiológicos, que permite identificarlos como *A. fumigatus*.

La importancia del *Aspergillus* como agente de infecciones oportunistas se ha reconocido hace pocos años. La enfermedad generalizada diseminada es, en esencia, producto de la inmunocompetencia disminuida ⁽¹¹⁾, el paciente debilitado en forma grave ofrece un medio especial para los hongos oportunistas.

Existen alrededor de 900 especies dentro del género *Aspergillus*. Son los hongos más comunes en todos los ambientes imaginables de nuestro planeta, sin embargo, solo 8 especies han sido implicadas en enfermedades infecciosas en el hombre: *Aspergillus fumigatus* (85%), *A. flavus* (5 – 10%), *A. niger* (2 – 3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus* (el 2%), ⁽¹³⁾

El *A. fumigatus*, es considerado como el agente patógeno, etiológico más importante, por su invasividad y alta mortalidad en seres humanos, sobre todo cuando invade el cerebro. ^(14,15)

La identificación de las especies de *Aspergillus*, esta basada en las características morfológicas de la colonia y las examinaciones microscópicas. Durante el tiempo de espera para la detección e identificación de un hongo usando métodos de cultivo estándar, los pacientes son a menudo tratados empíricamente con Anfotericina B. La identificación temprana de la infección fúngica invasiva y el tratamiento con una terapia fúngica adecuada son esenciales para obtener tasas de mortalidad reducidas. ⁽¹⁶⁾

En todas las instituciones de salud de nuestro país los enfermos con infecciones fúngicas oportunistas no son identificados a tiempo por falta de medios de diagnóstico, perdiéndose de este modo la valiosa oportunidad de establecer en cada uno de ellos la etiología real de la infección que causa el fallecimiento, datos que servirían para establecer con criterio científico la prevención y tratamiento dirigido a este grupo de pacientes. .

Según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC.) de Atlanta ⁽¹²⁾, en el presente año gracias a la tipificación de cadenas moleculares de ADN, han podido determinar que un grupo significativo de los pacientes inmunocomprometidos son infectados con *Aspergillus*,

debido a que esta especie de hongos están presentes en todos los medios ambientales.

Las dificultades de diagnóstico etiológico de las aspergilosis invasiva en pacientes inmunodeprimidos con técnicas serológicas basadas en la detección de anticuerpos precipitantes suelen ser negativas y la biopsia pulmonar está contraindicada en este tipo de enfermos por su estado clínico precario.

Por tanto, la aplicación de técnicas moleculares altamente sensibles y específicas como la PCR Standard y sus variantes entre las que se destaca la Nested-PCR. que nos permiten obtener un diagnóstico, precoz, seguro y definitivo de aspergilosis invasiva (IA) a partir de muestras de suero sanguíneo de pacientes inmunodeprimidos, ingresados en el hospital de SOLCA.

Material y Métodos:

Para este proyecto tomamos como referencia los trabajos de los investigadores Yuriko Yamakami,* Atsuro Hashimoto, Issei Tokimatsu, and Masaru Nasu; PCR. detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with Invasive Aspergillosis.

En este trabajo luego de realizar un estudio de comparación de secuencias de las regiones variables V7 a V9 de los genes que codifican para el rRNA 18S. de especies de *Aspergillus* y de otros hongos en la base de datos del GenBank; utilizando dos sets de primers, Asp.5 y Asp. 8 para la primera reacción de PCR en la que obtiene un amplicón de 384 pb. A partir de este producto se realiza una segunda amplificación (Nested-PCR.) usando los primers internos: Asp.1 y Asp.7, que da un amplicón de 357 pb. ⁽¹⁷⁾. (Fig. 1).

Área de estudio

Hospital de SOLCA – Guayaquil.

Universo

Pacientes de ambos sexos y de cualquier edad, ingresados en los diferentes servicios que se ajustan al siguiente perfil de selección: sintomatología respiratoria, neutropénicos y febriles

Muestra

Desde Mayo del 2006, hasta Enero del 2007 se estudiaron 80 muestras de suero sanguíneo de pacientes seleccionados que se ajustan al perfil propuesto.

Procedimiento

a) Toma de muestra hemática, en tubo sellado con aguja



vacuntainer.

b) Transporte al laboratorio en termo a 10°C.

Lugar donde se realiza el estudio

* Instituto Nacional de Higiene Leopoldo Izquieta Pérez.

* Laboratorio del programa de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Médicas - Universidad de Guayaquil.

Procedimientos realizados:

En el laboratorio de micología del I. N. H, Se tomó 50ml de cultivo Sabouraud enriquecido con glucosa se coloca en tubos estériles se les inocula con conidias de *Aspergillus* tomadas de cultivo debidamente confirmado y certificado y se les incubaba a 30°C. por 72h.

Se transfirió a continuación la felpa de los tubos y se coloca en un mortero al que le añade nitrógeno líquido y se tritura hasta convertirlo en polvo. Después se tomó 0.1g de la muestra anterior en tubos ependorf (se hizo por duplicado cada muestra). Esto se realizó con el objeto de buscar controles positivos para nuestras de posteriores pruebas de diagnóstico de Aspergilosis en suero sanguíneo de pacientes inmunodeprimidos neutropénicos.

Seguidamente se desarrolla el protocolo de extracción de ADN a partir de cepas de *Aspergillus fumigatus*. según el método modificado de Tang et al ⁽¹⁸⁾.

Con el ADN extraído de las cepas fúngicas anteriores, se realizó la técnica de NESTED - PCR usando los juegos de primers descritos anteriormente, a partir de 20 ul de ADN en una dilución ^(1/10) para un volumen final de 50 ul. Fig. (2). Después se aplica el protocolo de extracción de ADN a partir de las muestras de sangre (suero) de los pacientes seleccionados según el perfil clínico propuesto.

Una vez extraído el ADN de sangre, se toma 2ul de este ADN, sin diluciones para ejecutar la NESTED-PCR en un volumen final de 50 ul. Fig. (3).

Posteriormente se realiza la prueba molecular NESTED-PCR con ADN del patógeno en estudio y de otras especies de hongos (*Histoplasma* y *Criptococo*), usando el mismo protocolo de extracción ya mencionado con la finalidad de establecer la especificidad del diagnóstico. Fig. (4).

Obtención de los PRIMERS

Fig. 1: Genoma del *Aspergillus*.- Se representan los genes rARN 18S con una banda negra; en esta secuencia genómica se encuentran regiones variables que van desde V7 a V9 en donde se realizaron estudios de secuenciación para obtener el siguiente set de primers:

Primers externos son Asp. 5 y Asp. 8 (rojo) para la 1era PCR; primer internos Asp.1 y Asp.7 (verde) para la 2da PCR de la NESTED PCR.

Resultado de la primera PCR dio un fragmento de amplificación de ADN (amplicón) de 384 bp (pares de bases) carril 1; de la NESTED PCR se obtuvo un producto de amplificación final específico (amplicón) de 357 bp

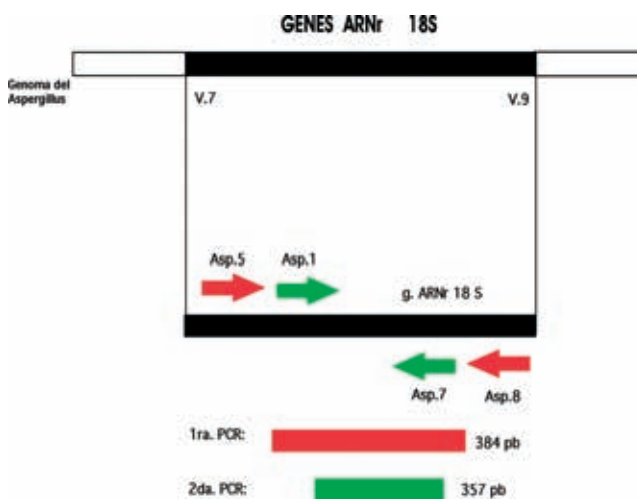


Fig. 1

Detección de ADN en cepas de *Aspergillus* por NESTED-PCR

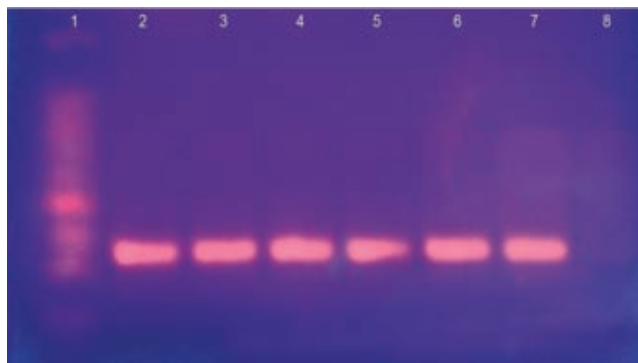


Fig. 2. Carriles. 1 a 4 positivos; 5.negativo; 6 y 7 positivo; 8 y 9 negativos; 10 y 11 positivos; 12, 13 y 14 negativos; 15 y 16 positivos; 17 Control (-).

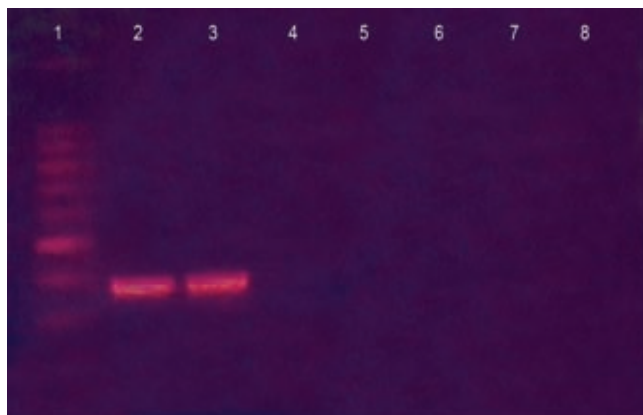
Detección de ADN de Aspergillus en sangre de pacientes

Fig. 3: Carriles: 1. MPM (marcador de peso molecular); 2 a 7 positivos; 8. Control (-). Al verificar el tamaño de los positivos(amplicones de Aspergillus) con el MPM, corresponden a 357 pb (pares de bases).

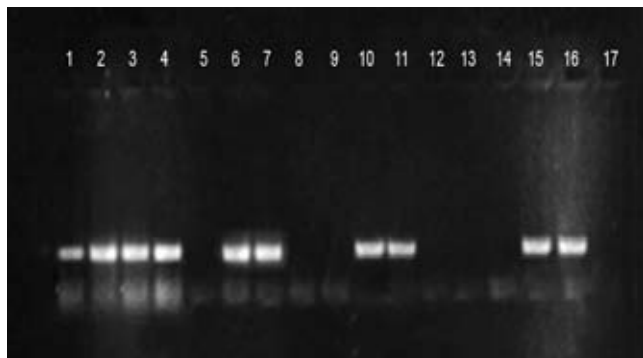
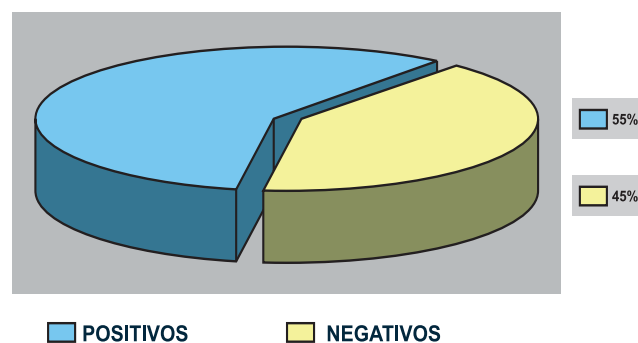
NESTED-PCR para demostrar la especificidad del Aspergillus

Fig. 4. Carriles: 1. MPM; 2 y 3 Aspergillus; 4 y 5 Criptococo 6 y 7. Histoplasma; 8. Control (-). Al comparar el tamaño de los amplicones de Aspergillus con el MPM, corresponden a 357 pb.

Análisis estadístico

Cuadro comparativo de Pacientes con resultados positivos y negativos de APERGILLOSIS INVASIVA (muestreo estratificado)

PACIENTES	FRECUENCIA	%	ANGULO
POSITIVOS	36	45	162
NEGATIVOS	44	55	198
TOTAL	80	100	360

**Discusión:**

La incidencia y prevalencia de las infecciones oportunistas fúngicas en los enfermos inmunodeprimidos, es cada vez más evidente, su estado clínico determina respuestas inmunológicas escasas o nulas, y a esto se añade que los métodos de diagnóstico existentes para identificar las infecciones mencionadas no son convincentes (falsos negativos), por tanto, los resultados obtenidos son inespecíficos y requieren largos períodos de espera para su confirmación, ocasionando que estos pacientes no puedan recibir un tratamiento específico y oportuno, y continúe la práctica nada recomendable de administrar terapéutica al azar o en el mejor de los casos sintomática, llevando a este grupo de pacientes a la depleción general de su estado de salud con la consiguiente reducción de su período de sobrevida.

Conclusiones

Las técnicas moleculares de amplificación de secuencias de ADN, de genes fúngicos como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), y sus variantes entre las que se destaca la NESTED-PCR, han sido introducidas con éxito en el arsenal

de medios de diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas en sociedades científicas más avanzadas que la nuestra, por haber proporcionado resultados rápidos, específicos y altamente confiables.

Recomendaciones

En base a estas conclusiones queremos recomendar:

- Que se difundan estos resultados a la comunidad científica ecuatoriana con el fin de que se informe sobre las ventajas de esta novedosa técnica de diagnóstico molecular.
- Incentivar a la clase médica para que se introduzcan en el conocimiento de las técnicas moleculares que nos proporcionan un vasto campo para el diagnóstico médico de toda clase de patologías.
- Implementar en nuestras casas de salud la infraestructura que nos permita desarrollar técnicas de diagnóstico molecular para el servicio de la comunidad.

Bibliografía:

- 1.- Ascioğlu S, Rex JH, de Pauw B, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; 34:7-14.
- 2.- Rhame FS. Prevention of nosocomial aspergillosis. *J Hosp Infect* 1991; 18: 466-467
- 3.- Aurora Sánchez Sousa. *Aspergillus*, ese desconocido. *Rev Spica. Fundación SB*. Junio 1999. Pág. 18-20.
- 4.- Large JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.
- 5.- Marr KA, Patterson T, Denning DW. Aspergillosis: pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am* 2002; 16: 875-894.
- 6.- Micheli, P.H. 1729. *Nova plantarum genera juxta tournefortii methodum disposita*. Florence, p. 234.
- 7.- Mayer, A., and C. Emmert. 1815. Vershimmelung (Mucedo) in lebenden Körper. *Dtsch. Arch. Anat. Physiol. (Meckl.)* 1: 310-318. (Cited by Urbain and Guillet. 1938. *Rev. Pathol. Comp.*, 38: 929-955.)
- 8.- Fresenius, G. 1850-1863. In *Beitrage zur Micologie*. Frankfurt, H.L. Bronner, p. 81.
- 9.- Bennett, S.H. 1844, On the parasitic vegetable structures found growing in living animals. *Trans, R. Soc. Edin.*, 15: 277. Read in 1842.
- 10.- Virchow, R. 1856. *Beitrage zur Lehre von den beim Menschen vorkommenden pflanzlichen parasiten*. Virchows Arch. Pathol. Anta., 9: 557-593.
- 11.- Meyer RD; Young LS; Armstrong D, Yu B: Aspergillosis complicating neoplastic disease, *Am J Med* 1973b, 54:6.
- 12.- Mycotic Diseases Branch, Centers' for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road. Mailstop G-11, Atlanta, GA 30333, USA. 2004
- 13.- KB Raper, DL. Fennell. *The genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Co. 1973.
- 14.- Rippon, J.W., D.N. Anderson, et al 1974. Aspergillosis. Comparative Virulence, metabolic rate, growth rate and ubiquinone content of soil and human isolates of *Aspergillus terreus*. *Sabouraudia*, 13: 157-161.
- 15.- Seligson, R., J.W. Rippon, et al. 1977. *Aspergillus terreus* osteomyelitis. *Arch. Intern. Med.*, 737 : 918-920.
- 16.- Identification of the pathogenic *Aspergillus* Species by Nested PCR using a Mixture of Specific Primers To DNA Topoisomerase II gene. Toshio Kanbe, Keinichi Yamaki, and Akiniko Kikuchi. Laboratory of Medical Micology. Research Institute for Disease Mechanism and Control, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Aichi 466 8550, Japan and Toyota Medical Corporation Kariya General Hospital, Kariya Aichi 448 8505, Japan
- 17.- PCR Detection of DNA Specific for *Aspergillus* Species in Serum of Patients with Invasive Aspergillosis. Yuriko Yamakami,* Atsuro Hashimoto, Issei Tokimatsu, And Masaru Nasu. The Second Department of Internal Medicine, Oita Medical University, Hasama-machi, Oita, 879-55, Japan
- 18.- Tang, C. M., D. W. Holden, A. Aufauvre-Brown, and J. Cohen. 1993. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148:1313-1317.

