



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Identificación molecular de *Cryptococcus neoformans* y
otros hongos de importancia médica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ROSA MARÍA ROJAS SANTIAGO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ



2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

| | |
|--|---|
| <p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombres Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera No. de cuenta</p> | <p>1. Datos del alumno Rojas Santiago Rosa María 53418072 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098093689</p> |
| <p>2. Datos del tutor Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p> | <p>2. Datos del tutor Dra. Francisca Hernández Hernández</p> |
| <p>3. Datos del sinodal 1. Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p> | <p>3. Datos del sinodal 1 Méd. Cir. Arturo Rubén López Martínez</p> |
| <p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre Apellido paterno Apellido materno</p> | <p>4. Datos del sinodal 2 Biól. Elva Bazán Mora</p> |
| <p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombres Apellido paterno Apellido materno</p> | <p>5. Datos del sinodal 3 M. en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso</p> |
| <p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombres Apellido paterno Apellido materno</p> | <p>6. Datos del sinodal 5 Q. F. B Érika Córdova Martínez</p> |
| <p>7. Datos del trabajo escrito Título Número de páginas Año</p> | <p>7. Datos del trabajo escrito Identificación molecular de <i>Cryptococcus neoformans</i> y otros hongos de importancia médica 80 p 2009</p> |



AGRADECIMIENTO

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, dentro del proyecto “Diagnóstico Molecular de las micosis causantes de mortalidad en México” con clave IN224006.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM bajo la dirección de la Dra. Francisca Hernández Hernández.





A las personas que más amo en la vida:

*A **Marci** y **Jorge**, mis papás, por su apoyo incondicional,
por sus consejos y valores, por su aliento y estímulos,
mismos que posibilitaron la conquista de esta meta
que es la mejor herencia que puedo recibir
¡Los amo infinitamente!*

*A **Marisol**, mi hermana,
por ser mi compañera de vida,
mi amiga y quien ha sido mi apoyo
en momentos cruciales de mi vida
¡te amo Nena!*

*A mi sobrinito O. **Alejandro**, por iluminarnos la vida
y por ser el impulso de nuestras ilusiones.
A **Ángel**, mi cuñado, por su apoyo y cariño
¡Los quiero mucho!*

*A **Rubén**, por su amor y
por todos los momentos felices a su lado,
¡Te amo Bi!*

*A mis **abuelitas Mari's**,
quienes son ejemplo de fortaleza*

*A **Mish, Lika** y **Jaren**,
por su compañía y fidelidad,
por alegrarme la vida...*

Rose. octubre, 2009





AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén López Martínez, jefe del Laboratorio de Micología Médica, agradezco el haber permitido la realización de esta tesis en su laboratorio.

Agradezco a la Dra. Rosio Castañón por proporcionar las cepas de referencia (WM) de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* utilizadas en este estudio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la mejor universidad de país, por permitirme formar parte de su comunidad y por el apoyo proporcionado para que yo lograra mis propósitos. ¡Orgullosamente UNAM!





AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todos y cada una de las personas que contribuyeron de alguna y otra manera en la elaboración de esta tesis:

La **Dra. Francisca Hernández**, jefa del Laboratorio de Micología Molecular, quien además de ser la directora de esta tesis, es sin duda la persona que más ha contribuido en mi formación profesional ¡Gracias Dra. Frank!

Mi más profundo agradecimiento a la **Biól. Elva Bazán**, quien guió, corrigió y evaluó este trabajo. ¡Gracias por el tiempo dedicado, por tu disposición nunca negable y por resolvernos cualquier duda por mínima que pareciera!

Agradezco ampliamente a la **QFB Érika Córdoba**, por orientarme en la parte técnica de este trabajo, por sus consejos y enseñanzas, por ser un pilar importante en mi formación, ¡ah y por su bromas! ¡Gracias Érika!

Mi gratitud al **Dr. Rubén López**, jefe del laboratorio de Micología Médica, por permitir la realización de este trabajo en su laboratorio y por sus aceptar ser miembro del jurado evaluador de mi tesis.

Reconozco y agradezco profundamente a la **Dra. Paty Manzano**, quien enriqueció con sus amplios conocimientos en micología y sus consejos a culminar de la mejor manera este trabajo. ¡Gracias Dra. Paty!

Agradezco a la **Dra. Rosio Castañón**, por sus conocimientos transmitidos sobre la micología, por su amplia disposición y amabilidad, cualidades que la caracterizan y que la convierten en una investigadora de alta calidad. ¡Gracias Rosi!





Al Dr. Luis Javier Méndez, ejemplo claro de la pasión que se llega a tener por una profesión, misma que permite transmitir los conocimientos de micología con gran claridad y alto nivel de académico.

A Tony, mi amiga, por enseñarme y ser ejemplo de que la actitud es la mejor arma contra los límites propios, por su amistad incondicional, por su compañía, por escucharme en todo momento y por hacerme saber que siempre estará aquí... conmigo, ¡te quiero amiga y gracias por tu amistad!

A Elda, a quien no sólo agradezco su compañerismo, sino también su valiosa amistad, su calidad humana y su alegría natural. Su forma de ser me hace valorarla como una gran amiga ¡te quiero Eldy!

Agradezco a la Biól. Vero su compañerismo, amistad y los momentos agradables que pasamos Verou y a Alf también!

A la QFB Sandra, gracias por tu disponibilidad, cariño y amistad. Sabes que te quiero mucho y te admiro por la capacidad que tienes de salir adelante con méritos propios. ¡Te quiero Sandri!

A Blanca, Pepe Camacho, Marcela Ángeles, Aleida, Jorge Méndez, Jamie y Saúl, mis compañeros y amigos del laboratorio, por compartir con ellos el gusto por la biología y por los momentos alegres que la micología nos permitió vivir juntos.

A Pablo, por su compañerismo, amistad y apoyo.

A Esteban Rojas y a Adrián Santiago en quienes encuentro un gran apoyo y cariño.

A Tania, Elsa y Daniel, por su disposición, amistad y apoyo técnico.





ÍNDICE

| | Pág. |
|---|------|
| Agradecimientos..... | 3 |
| Dedicatorias..... | 4 |
| Agradecimientos..... | 5 |
| Agradecimientos..... | 6 |
| Índice..... | 8 |
| Resumen..... | 10 |
| 1. Introducción..... | 12 |
| 1.1 Características generales de los hongos..... | 12 |
| 1.2 Clasificación..... | 12 |
| 1.3 Hongos de importancia médica..... | 14 |
| 1.4 Micosis..... | 14 |
| 1.4.1 Micosis oportunistas..... | 15 |
| 1.4.1.1 Candidosis..... | 16 |
| 1.4.1.2 Criptococosis..... | 18 |
| 1.4.1.3 Aspergilosis..... | 20 |
| 1.4.1.4 Mucormicosis..... | 22 |
| 1.4.1.5 Otras micosis oportunistas..... | 24 |
| 1.5 Ventajas y desventajas de los procedimientos de diagnóstico de las micosis oportunistas..... | 24 |
| 1.5.1 Métodos tradicionales..... | 24 |
| 1.5.1.1 Examen directo..... | 24 |
| 1.5.1.2 Cultivo..... | 25 |
| 1.5.1.3 Pruebas bioquímicas (fisiológicas)..... | 25 |
| 1.5.1.4 Histopatológicas..... | 25 |
| 1.5.1.5 Inmunológicas..... | 26 |
| 1.5.2 Métodos moleculares..... | 26 |
| 1.5.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa..... | 27 |
| 2. Antecedentes..... | 30 |
| 3. Justificación..... | 32 |





| | Pág. |
|--|-------------|
| 4. Objetivos..... | 34 |
| 5. Material y metodología..... | 35 |
| 5.1 Cepas y aislados clínicos..... | 35 |
| 5.2 Obtención de colonias monospóricas..... | 41 |
| 5.3 Extracción de DNA..... | 42 |
| 5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa..... | 44 |
| 6. Resultados..... | 50 |
| 7. Discusión..... | 60 |
| 8. Conclusiones..... | 64 |
| 9. Perspectivas..... | 65 |
| Bibliografía..... | 66 |
| Apéndice A..... | 76 |
| Apéndice B..... | 79 |





RESUMEN

En los últimos años, las micosis oportunistas han ido en incremento debido principalmente al aumento de los factores de oportunismo en los individuos afectados. Muchas de estas infecciones son rápidamente invasivas y a menudo mortales, por lo que es necesario disponer de procedimientos de diagnóstico rápidos, sensibles y altamente específicos. Los métodos convencionales empleados con este fin requieren de mucho tiempo para completarse, además de que su especificidad y sensibilidad varía dependiendo de la prueba. En los últimos años las pruebas moleculares han mostrado ser una valiosa herramienta en el diagnóstico, en particular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El objetivo de este trabajo fue utilizar la técnica de PCR para identificar algunas especies de *Cryptococcus*, *Aspergillus* y mucorales. Para ello se incluyeron tanto cepas de referencia como aislados clínicos y ambientales. Fueron utilizados seis pares de oligonucleótidos reportados como especie-específicos: CN4-CN5 para *C. neoformans*, AFUM1-AFUM2 que amplifican a *A. fumigatus*, Acy1-Acy2 para *Absidia corymbifera*, Mc1-Mc2 para *Mucor circinelloides* y *M. ramosissimus*, Ro1-Ro2 para *Rhizopus oryzae* y Rm1-Rm2 que amplifican tanto a *Rhizomucor miehei* como a *R. pusillus*. Adicionalmente se realizaron pruebas de especificidad y sensibilidad con cada uno de ellos.

En las 4 cepas control y en los 6 aislados problema de *C. neoformans*, se obtuvo el amplificado esperado de 136 pb. Los oligonucleótidos CN4-CN5 fueron específicos a nivel de género pero no a nivel de especie debido a que no lograron diferenciar a *C. neoformans* de *C. gattii*. La cantidad mínima de DNA detectada por los oligonucleótidos fue de 500 pg, cien veces más baja comparada con la obtenida por otros autores.



En el caso de *A. fumigatus*, el amplificado en las dos cepas de referencia fue de 385 pb; también se corroboró la identidad de dos aislados problema al obtener un



amplificado del mismo tamaño. Los iniciadores AFUM1-AFUM2 fueron altamente específicos y la sensibilidad obtenida fue de 0.5 ng de DNA.

Respecto a los mucorales estudiados, en *A. corymbifera* se obtuvo un amplificado de 577 pb; en *M. circinelloides* y *M. ramosissimus* de 538 pb; en *R. oryzae* de 413 pb; *R. miehei* y *R. pusillus*, ambos de 305 pb. Ninguno de los iniciadores resultó ser específico ya que hubo amplificaciones cruzadas entre las especies de mucorales incluidas. La sensibilidad de los cuatro pares de oligonucleótidos fue en la mayoría de 10 fg.

La PCR resultó ser una técnica útil para la identificación de los hongos patógenos, sin embargo es necesario diseñar oligonucleótidos dirigidos a regiones lo suficientemente variables que permitan diferenciar a *Cr. neoformans* de *Cr. gattii*, así como a las especies de de mucorales.





1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de los hongos

Los hongos son organismos eucariontes de talo micelial compuesto por hifas cenocíticas o septadas, lo que los determina como organismos pluricelulares; también los hay con talo unicelular correspondiente a las levaduras. La pared celular de los hongos es una estructura rígida, compuesta por quitina, β -glucanas, mananas, quitosana, y galactanas (polímeros de galactosamina).¹ En la pared de algunos hongos existe un pigmento semejante a la melanina (hongos dematiáceos). La proporción de estos elementos varía dependiendo de la especie o de la etapa del ciclo de vida en que se encuentre el hongo. La pared fúngica tiene diversas funciones: protección contra los cambios ambientales, químicos y biológicos; también participa en la interacción de los hongos con el medio.⁸³ La membrana celular tiene como componente característico: el ergosterol. En el citoplasma de los hongos se encuentran, al igual que en otras células eucariontes, el núcleo, el sistema retículo endoplásmico, ribosomas, vacuolas, mitocondrias (de crestas aplanadas) y el aparato de Golgi formado por pocas cisternas. La sustancia de reserva es el glucogéno y la síntesis de lisina es por la vía del ácido α -amino adípico (AAA).^{14, 22, 35}

La propagación de los hongos está dada por la formación de esporas o conidios originados por un mecanismo asexual, proceso que involucra mitosis (hongos mitospóricos) o por reproducción sexual que implica un proceso de meiosis (hongos meiospóricos).

1.2 Clasificación

El reino Fungi está conformado por 4 phyla: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota.



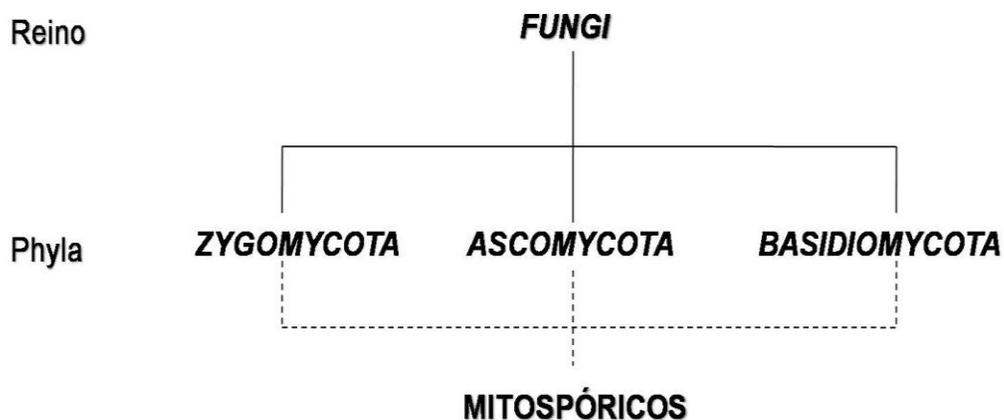


Los organismos pertenecientes al phylum Zygomycota forman cigosporas y su talo está formado por hifas cenocíticas. En el phylum Ascomycota la estructura clave es el asca, donde se generan las ascosporas de forma endógena y los septos presentan cuerpos de Woronin. En el phylum Basidiomycota, numerosas especies forman hifas con fíbulas y la principal característica de este grupo es la formación de basidios con basidiosporas exógenas.³⁶

La mayoría de hongos de importancia médica corresponden a la fase asexual de los phyla previamente descritos. Las especies incluidas en este estudio (*C. neoformans*, *A. fumigatus* y los mucorales) corresponden a los phyla Basidiomycota, Ascomycota y Zygomycota respectivamente (Fig 1).

Algunas de estas especies son consideradas de importancia médica porque tienen la capacidad de producir patologías diversas en el ser humano y animales.

Figura. 1. Clasificación de los hongos de importancia médica.



*modificado de Guarro, 1999.





1.3 Hongos de importancia médica

Aproximadamente 400 especies de hongos han sido reportadas como patógenas para el humano.⁵¹ Estos hongos son microscópicos y algunos de ellos son dimórficos, ya que son capaces de transformarse y cambiar su morfología (de micelio a levadura o viceversa), según las condiciones micro-ambientales en las que se encuentre. Varios sufren una reducción morfológica cuando se encuentran parasitando al hospedero, pero hay algunos que conservan sus características morfológicas tanto en vida libre como en vida parásita y se denominan monomórficos. En el área médica los hongos son objeto de investigación ya que causan diversas micosis con diferencia en la gravedad tanto en humanos como en otros animales.^{2, 4, 41, 52}

1.4 Micosis

Este término se refiere a la infección causada por alguna de las especies de hongos microscópicos. El desarrollo de una infección fúngica depende principalmente de tres factores: 1) inmunológico, 2) factores de virulencia del hongo y 3) la cantidad del inóculo. Las infecciones pueden ser asintomáticas o presentar síntomas leves, moderados o graves; además pueden ser de origen endógeno cuando los hongos forman parte de la microbiota del organismo. Las infecciones exógenas son aquellas que tienen como vía de entrada principal el aparato respiratorio o la piel, secundaria a una herida.

Usualmente las micosis se clasifican, de acuerdo a la localización anatómica de la infección en: superficiales (afectan piel y sus anexos), subcutáneas (piel y tejido subcutáneo), sistémicas (sistema respiratorio y con frecuencia otros aparatos) y oportunistas (potencialmente afectan cualquier órgano), las cuales se adquieren por diversos mecanismos.^{4, 41, 73}

Los hongos incluidos en este trabajo corresponden al grupo de hongos oportunistas, por lo que a continuación se hará una breve descripción de las infecciones correspondientes.





1.4.1 Micosis oportunistas

Estas infecciones son consideradas un grupo especial de micosis superficiales y profundas; son causadas por hongos saprobios y algunos comensales del hombre cuya característica principal es que poseen un bajo potencial patógeno. Los hongos causantes de este tipo de infecciones pueden desarrollar la capacidad de termotolerancia y potencialmente infectar a personas que tienen defectos en sus mecanismos de defensa.⁴ En consecuencia la inmunodeficiencia es el factor principal que favorece el establecimiento y desarrollo de una micosis oportunista,⁷³ sin embargo, cada micosis es favorecida por condiciones de oportunismo particulares. Los principales factores de oportunismo asociados a diferentes micosis se encuentran anotados en el Cuadro 1.

De los agentes causales de micosis oportunistas, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.* y los mucorales son reportados con mayor frecuencia en la literatura.

Cuadro 1. Principales factores que favorecen el desarrollo de micosis oportunistas

Candidosis*

- Prematurez
- Vejez
- Diabetes mellitus
- Neoplasias
- Administración de antibióticos de amplio espectro
- VIH-SIDA
- Cáncer
- Uso de esteroides sistémicos
- Embarazo
- Maceración
- Uso de catéteres
- Diálisis
- Trasplante de órganos
- Traumatismos

Criptococosis*

- VIH-SIDA
- Tratamiento con corticoesteroides
- Trasplante de órganos
- Diabetes mellitus
- Enfermedades pulmonares crónicas
- Enfermedades renales o diálisis
- Cirrosis
- Enfermedad de Hodgkin
- Leucemia,
- Carcinoma
- Tuberculosis
- Prematurez

Aspergilosis*

- Neutropenia prolongada (> 3 semanas)
- Neutrofilia
- Trasplante de órganos
- Enfermedades hematológicas malignas (principalmente leucemias)
- Tratamiento esteroideo
- Tratamiento citotóxico
- SIDA





Zigomicosis[†]

- Diabetes mellitus tipos 1 y 2 (cetoacidosis, descontrolada)
- Neoplasias hematológicas
- Leucemia
- Linfoma
- Mieloma múltiple
- Neutropenia
- Tratamientos inmunosupresores
- Quimioterápicos
- Uso de drogas intravenosas
- Uso de esteroides
- Tratamiento antirrechazo postrasplante
- Trasplante de órgano sólido
- Trasplante de células hematopoyéticas
- Quemaduras
- Traumatismos
- Desnutrición

† Diaz-Sánchez *et al*, 2004. *Manzano-Gayosso, 2008; † Chayakulkeeree MD *et al*, 2006. † Osorio J *et al*, 2007.

1.4.1.1 Candidosis

Ésta infección es la principal micosis oportunista debido a su alta frecuencia y es causada por levaduras del género *Candida*. Algunas de las especies son parte de la microbiota del cuerpo humano y se localizan en mucosas, tracto respiratorio, tracto urinario, tubo digestivo y piel.¹⁰

Candida albicans es la especie que causa la mayoría de las infecciones; no obstante, existen otras especies que cada día adquieren mayor importancia por su frecuencia como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis*.³⁰

Esta micosis puede ser superficial o profunda y llega a afectar diferentes partes del cuerpo, desde la piel hasta órganos internos, en particular pulmones, corazón, tubo digestivo y vías urinarias. En pacientes con inmunosupresión severa la infección puede ser mortal.

En EU se calcula que el 8% de las infecciones hematológicas son causadas por levaduras del género *Candida*, provocando la muerte al 40% de los pacientes. En este mismo país, cada año surgen entre 10000 a 42000 casos de candidemia⁷⁴ de los cuales *C. albicans* es responsable en un 60%, mientras que Europa la





candidemia se reportada en 40 personas de cada mil que ingresa a un hospital, *C. albicans* es identificada en el 56% de los casos.^{74, 94, 96} En Brasil, la incidencia es de 3 casos por cada mil ingresos hospitalarios. En México, se han realizado pocos estudios epidemiológicos sobre las Candidosis; por ejemplo, Hernández-Hernández y colaboradores (2002) cultivaron 268 especímenes de pacientes con posibles micosis, de las cuales el 90% correspondieron a especies de *Candida*, mientras que Reséndiz-Sánchez *et al*, (2007) reportaron 45 eventos infecciosos en pacientes infantiles con diagnóstico de infección sistémica por hongos causados por *Candida* spp., de los cuales *C. albicans* se encontró en el 16% de los cultivos y 45% se reportaron como no *albicans*; los neonatos fueron el grupo de edad con mayor mortalidad.

Para diagnosticar la candidosis se dispone de varios procedimientos secuenciales: el examen directo con KOH al 15%; frotis de exudados, de orina, de sangre, de esputo (o de otros líquidos o exudados) teñidos con Gram, PAS o Grocott.⁵² El estudio histopatológico representa una herramienta valiosa, en él se observa levaduras de 2 a 4 μm de diámetro, gemantes, redondas u ovaladas además de seudofilamentos o hifas verdaderas. Otro recurso es el cultivo del material biológico, el cual se realiza en ADS con y sin antibióticos, incubado a temperatura ambiente (25°C) en donde se desarrollan, después de 24 a 48 horas, colonias blancas o crema, de consistencia suave, de superficie lisa o rugosa.

Para la diferenciación inicial de especies, se realizan pruebas fisiológicas como la filamentación en suero, producción de clamidoconidios, el crecimiento en ADS con antibióticos, así como la asimilación de carbohidratos (auxanograma). También se emplean medios cromógenos mediante los cuales es posible identificar tres especies (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*). El procedimiento más confiable para la identificación sigue siendo la asimilación de carbohidratos, manual o automatizado (VITEK). Actualmente existe el recurso de los procedimientos moleculares para la detección de la infección y para la identificación de especies de *Candida*.^{4, 45, 52, 77}





1.4.1.2 Criptococosis

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* son los agentes causales más frecuentes de la criptococosis, tanto en México como en otros países.^{13, 31} Otras especies menos usuales son *C. laurentii*, *C. albidus* y *C. uniguttulatus*.^{17, 46}

En general las levaduras de *Cryptococcus* son esféricas, miden de 4 a 20 µm de diámetro y son unigemantes. La característica principal de este hongo es la presencia de una cápsula compuesta en un 88% de glucuronoxylomananas y 10% de galactoxylomananas. La cápsula, además de la termotolerancia a 37°C y la producción de melanina son los factores de virulencia de la levadura.^{4, 38}

Anteriormente *C. gattii* era considerado una variedad de *C. neoformans*; sin embargo, en 2002 Kwon-Chung propuso clasificar como especie a *C. gattii*. Estas dos especies presentan estado sexual: *Filobasidiella neoformans* para *C. neoformans* y *F. bacillispora* para *C. gattii*.^{13, 17, 42}

Las colonias son color blanco o crema, de consistencia suave, de aspecto mucoso y de rápido crecimiento. Son ureasas positivas, sensibles a cicloheximida, asimilan inositol y no fermentan carbohidratos.⁶⁵

C. neoformans es cosmopolita y se aísla con mayor frecuencia de excretas de ciertas aves como la paloma (*Columba livia*), a diferencia de *C. gattii* que se localiza en zonas tropicales y subtropicales asociado principalmente a *Eucalyptus camaldulensis*, que es considerado su principal nicho ecológico.^{16, 24, 40, 47}

La criptococosis es adquirida por inhalación y en consecuencia las manifestaciones clínicas, que pueden ser variadas e inespecíficas, corresponden al sistema respiratorio e incluyen: tos, dolor de pecho, producción de esputo, pérdida de peso y fiebre.⁴⁴ Así, la infección inicia en pulmón, posteriormente las levaduras se diseminan por vía hematogena a otros órganos. *Cryptococcus* tiene predilección por el sistema nervioso central (SNC) lo que origina una inflamación en las meninges, la





cual puede ser aguda o crónica. El cuadro clínico incluye cefalea, fiebre acompañada de vómito, alteración de los sentidos, crisis convulsivas, pérdida de la visión o coma y sin un tratamiento adecuado la infección llega a ser mortal.^{6, 86} Otros órganos frecuentemente afectados son la piel, la próstata, ojos, médula ósea, articulaciones.^{33, 93}

La criptococosis cutánea primaria es rara y se adquiere por inoculación directa accidental de la levadura. La forma más frecuente de infección cutánea es resultado de la diseminación hematogena; en general, es polimorfa y se caracteriza por úlceras, abscesos, nódulos y granulomas. Estas lesiones pueden confundirse con otras infecciones como las causadas por *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* o *Penicillium marneffeii* por lo que es necesario realizar una biopsia y cultivo para diferenciar estas patologías de la infección por *Cryptococcus* sp.¹⁷⁻¹⁸

Antes de la epidemia del VIH-SIDA la criptococosis era poco frecuente; sin embargo, en las últimas dos décadas la infección por este hongo aumentó dramáticamente. La criptococosis se observa en un 5-10% de los pacientes con VIH-SIDA en EU, Europa y Australia, mientras que en Sudamérica y África estos porcentajes aumentan tres veces.⁵⁸ En México, Hernández-Hernández y colaboradores (2002), aislaron a *Cryptococcus* en 17 de 268 especímenes sembrados provenientes de un hospital regional de la Ciudad de México. En otro estudio realizado por Méndez-Tovar *et al.*(2007) en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional (CNM) Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), *Cryptococcus* se encontró en 35 de 136 casos de micosis sistémicas reportadas, siendo *C. neoformans* la especie que se aisló mayoritariamente (31 de 36) seguido de *C. laurentii*, *C. gatti* y *C. terreus*. Por otro lado, Reséndiz-Morán *et al*, en 2008, reportaron 29 casos de criptococosis cerebral hallados en autopsias durante 29 años en el Hospital General de México, donde el SIDA fue el factor predisponente a la enfermedad en la mayoría de los casos (11) y la forma generalizada fue la principal causa de muerte.





El diagnóstico de la enfermedad se establece por examen directo del líquido cefalorraquídeo (LCR) o bien de esputo cuando la infección se encuentra en pulmón. El examen directo consiste en la observación microscópica del material biológico contrastado con tinta china para detectar la presencia de levaduras encapsuladas. La infección puede estar localizada en otros órganos y en consecuencia los especímenes útiles para el examen directo serán otros (tejido, orina, sangre, tejido de biopsia y secreción de lesiones).⁶⁵

Un procedimiento adicional útil para el diagnóstico de la criptococosis es el cultivo: *Cryptococcus* crece en agar dextrosa Sabouraud (ADS) sin cicloheximida, agar chocolate o agar sangre y las colonias son de rápido crecimiento (24-48 hrs.). En agar Staib, *C. neoformans* produce melanina como resultado de la catálisis de compuestos bifenólicos. Para diferenciar a *C. neoformans* de *C. gattii* se emplea el medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol y D-prolina.

En un corte histológico teñido con ácido Peryódico de Schiff (PAS) se observan levaduras encapsuladas, frecuentemente con gemación unipolar; el tamaño total de la levadura y la cápsula alcanzan un aproximado de 20 μm .⁵⁹

Para la criptococosis y la identificación de especies existen también procedimientos moleculares cuyos resultados se obtienen en menor tiempo que los procedimientos tradicionales.^{62, 65}

1.4.1.3 Aspergilosis

Este término se refiere a las micosis causadas por hongos del género *Aspergillus* y que puede originar diversos cuadros clínicos, aunque predomina la localización pulmonar y en consecuencia la sintomatología respiratoria.⁸¹ Las especies causales de mayor frecuencia son *A. fumigatus*, responsable del 90% de los casos, seguido de *A. flavus*.⁹⁷ Pacientes con enfermedades hematológicas como la leucemia y trasplantados, además de las personas con VIH-SIDA y terapia con corticoesteroides, son altamente vulnerables a esta infección.⁵⁴





El principal mecanismo de infección es a través de la inhalación de conidios también puede adquirirse por contaminación de heridas en la piel y el contacto directo con ojos y oído.^{73, 78, 97} Las formas clínicas son diversas e incluyen: pulmonar, cutánea, ocular, ótica, renal, etc. Así, las manifestaciones clínicas de la aspergilosis dependen de la localización de la infección. En la forma pulmonar la infección puede ser colonizante (aspergiloma) o invasiva; estos sitios pueden ser fuentes de infección para otros órganos y dar lugar a las formas diseminadas.⁵⁴

Aspergillus ocupa el segundo lugar como causante de infecciones nosocomiales en EU. La aspergilosis representa entre un 80 a 90% de las infecciones severas por hongos filamentosos y el porcentaje de mortalidad en la forma diseminada varia (entre 50 y 100%).^{54, 73} La mayoría de las aspergilosis son principalmente pulmonares o cerebrales y están causadas en un 80% por *A. fumigatus*, agente que también ocupa el primer lugar en nuestro país. Los hospederos más frecuentes son los pacientes neutropénicos con enfermedades hematológicas y los trasplantados. La evolución casi siempre es de curso fatal, con una mortalidad entre 80 y 100%.³² En nuestro país, los casos de aspergilosis reportados por Méndez-Tovar y colegas en el CMN durante 9 años fueron 32, de los cuales veinte resultaron fatales.

Para el diagnóstico se utilizan especímenes como esputo, aspirado bronquial, sangre, fragmento de tejido y exudado de lesiones superficiales, los cuales pueden ser tratados con KOH y observados al microscopio. También es útil el cultivo en medios como ADS o Czapeck. Los cultivos deben ser seriados para descartar la posibilidad de contaminación debido a que *Aspergillus* se aísla fácilmente del ambiente y se encuentra como contaminante en lesiones superficiales o de vías respiratorias altas. En el estudio histológico del tejido infectado teñido con Grocott, hematoxilina o PAS, se observan filamentos tabicados y con ramificaciones de aproximadamente 45°. ²³ Otros métodos para el diagnóstico de la aspergilosis son el estudio inmunológico (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)) para la detección de galactomano y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que ha sido evaluada como una modalidad para el diagnóstico. ^{23, 91}





1.4.1.4 Mucormicosis

La mucormicosis, también conocida como zigomicosis, es una infección causada por hongos del phylum Zygomycota, del orden Mucorales. Las especies de mucorales que se aíslan con mayor frecuencia son: *Rhizopus oryzae*, *Absidia corymbifera*, *Mucor* spp., *Rhizomucor microsporum* y *R. pusillus*.¹⁶

Estos microorganismos son saprobios, cosmopolitas, de rápido crecimiento; tienen afinidad por los carbohidratos simples y crecen a temperaturas que van de los 25° hasta mayores de 37 °C. Estas características favorecen la invasión rápida del tejido, la obstrucción de los vasos sanguíneos y consecuentemente necrosis de la zona afectada. La producción de una alfa-cetoreductasa favorece la utilización de los cuerpos cetónicos que abundan en los pacientes con diabetes mellitus descompensada, condición que explica la elevada vulnerabilidad de estos pacientes hacia la infección.^{48, 75}

La verdadera incidencia de la mucormicosis se desconoce; sin embargo, en EU se reportan 500 casos por año y es considerada la segunda micosis de importancia causada por hongos filamentosos.^{48, 73} Las especies del género *Rhizopus* son aisladas con mayor frecuencia. En una revisión de casos de micosis graves de 1995 a 2005 en el Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI, IMSS, la mucormicosis ocupó el primer lugar de frecuencia de micosis oportunistas por hongos filamentosos. La variedad clínica de mayor incidencia fue la invasión rinocerebral y fue la causa de muerte en 40% de los pacientes afectados.⁶¹ Por otro lado, Romero-Zamora *et al* (2000) informaron de 12 casos de diabetes *mellitus* con mucormicosis rinocerebral atendidos en el Hospital General de México durante los años de 1993 a 2000.

Las formas más comunes de adquirir la infección son por inhalación, ingestión o contacto directo del hongo con piel traumatizada, asociada a los diferentes factores de riesgo (Fig. 1).





Esta micosis se puede expresar bajo diferentes formas clínicas como la rinocerebral que es la más común y la más grave, seguida de la cutánea, pulmonar e intestinal.^{82,}

⁹⁰ Cada una de ellas se relaciona con diversos factores de oportunismo: la diabetes mellitus descompensada se asocia a la forma rinocerebral, que es la más frecuente y más grave ya que causa 36 al 88% de los casos de zigomicosis.¹⁶ La mucormicosis pulmonar se presentan en pacientes con enfermedades hematológicas o neutropenia severa y junto con la forma rinocerebral, de acuerdo al estudio de Pía-Spalloni *et al* (2004) causan la muerte a 78 de cada cien personas que la padecen. La presentación cutánea se desarrolla como consecuencia de la contaminación de heridas en la piel o en caso de quemaduras. La mucormicosis gastrointestinal se presenta en pacientes con desnutrición de tercer grado, aclorhídricos o inmunocomprometidos; el estómago es el órgano más afectado y en la mayoría de los casos es fatal (85%). Sin un tratamiento específico y oportuno, la mucormicosis pulmonar y rinocerebral también son mortales.^{3, 75}

Los procedimientos tradicionales de diagnóstico de la mucormicosis incluyen el examen directo de esputo, exudado de lesiones y de otros tejidos infectados. Se observan hifas cenocíticas (sin o con escasos tabiques), gruesas, de pared irregular y con ramificaciones a 90°. ⁵⁹

Los mucorales crecen en ADS sin antifúngicos, a un rango de temperatura de 25-28 °C. Las colonias son de rápido crecimiento (12-48 hrs), algodonosas o lanosas. Al microscopio se observan hifas anchas (10-20 micras), cenocíticas y ramificadas, esporangios con numerosas esporas en el interior y en algunas especies se observan estructuras como rizoides y estolones.⁵²

La histopatología es un procedimiento en el que se observan hifas irregulares, anchas, generalmente sin septos, con ramificaciones irregulares, normalmente a 90°. La prueba de ELISA se emplea para detectar anticuerpos producidos durante la mucormicosis invasiva. La PCR es una alternativa para la identificación de especies y el diagnóstico de la infección.^{82, 87, 98}





1.4.1.5 Otras micosis oportunistas

Existen otras micosis oportunistas que se presentan con menor frecuencia, como la neumocistosis, geotricosis, peniciliosis, fusariosis, tricosporonosis, infecciones por *Malassezia*; algunas de estas y otras infecciones son reportadas de forma esporádica.^{4, 15, 21, 25, 67-68} Es importante resaltar que todos los hongos son potencialmente patógenos y que en presencia de un factor de oportunismo (a veces no detectable), son capaces de desencadenar una infección grave y algunas veces fatal.

1.5 Ventajas y desventajas de los procedimientos de diagnóstico de las micosis oportunistas

1.5.1 Métodos tradicionales

Las micosis oportunistas son cada vez más frecuentes, por lo que el laboratorio de micología representa un gran apoyo para el médico clínico en el proceso de confirmación del diagnóstico. Consecuentemente el laboratorio debe de disponer de técnicas específicas, rápidas, altamente sensibles y confiables para la detección oportuna de los hongos patógenos y propiciar el inicio de un tratamiento adecuado y oportuno.

El diagnóstico micológico tradicional se basa en procedimientos encaminados a la observación de la estructuras parasitarias a través del examen directo, del cultivo, del estudio histopatológico y de pruebas inmunológicas. En cada micosis estos procedimientos varían en sensibilidad y especificidad.

1.5.1.1 Examen directo

El examen directo en fresco nos da información sobre la presencia del hongo en la muestra biológica, es un método rápido, sencillo y de bajo costo; para su realización se requiere de un mínimo de material y equipo (algunos reactivos y microscopio óptico). Sin embargo, su sensibilidad depende de la cantidad y calidad de la muestra,





así como del número de microorganismos presentes en ella. Además se requiere de personal entrenado para su correcta interpretación.^{37, 77}

1.5.1.2 Cultivo

El cultivo es necesario para la identificación morfológica, para la realización de pruebas de sensibilidad a antifúngicos y en algunos casos para la diferenciación de especies. Sin embargo, es un proceso que requiere de varios días e incluso semanas para obtener resultados. Otro de los inconvenientes que presenta este método es la dificultad para determinar si el crecimiento fúngico representa una causa de infección o representa una contaminación particularmente cuando el espécimen biológico se origina de lugares no estériles, por ejemplo, vías respiratorias o digestivas, piel. En consecuencia es necesario repetir los cultivos, lo cual aumenta el tiempo de obtención de resultados y el costo.^{23, 37} Para el caso de hongos como *Pneumocystis* y *Rhinosporidium seeberii*, el cultivo no tiene utilidad.

1.5.1.3 Pruebas bioquímicas (fisiológicas)

Consisten en distintas pruebas químicas para determinar la actividad de una vía metabólica particular de una especie o género a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo o en forma de solución. Estas pruebas son aplicadas principalmente a las levaduras: fermentación/asimilación de fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, producción de enzimas, producción de pigmento, etc.⁷⁶ Las desventajas de estas pruebas incluyen su laboriosidad, tiempo prolongado y mucho material para su realización, requieren de personal adecuadamente capacitado y frecuentemente dan resultados inespecíficos. A pesar de estos inconvenientes, estas pruebas son ampliamente utilizadas en los laboratorios con bajos recursos.

1.5.1.4 Histopatológicas

Este procedimiento consiste en el estudio histológico de tejido infectado obtenido por biopsia y tiene como objetivo la detección de estructuras fúngicas parasitarias, además de los cambios celulares asociados. La mayoría de las especies patógenas





fúngicas se tiñen con ácido peryódico de Schiff (PAS) y de Grocott, y la respuesta celular se observa adecuadamente con la coloración de Hematoxilina-eosina (HE). En consecuencia estas son las tinciones recomendadas más comunes. Esta técnica permite determinar la abundancia y morfología parasitaria, orientada a identificar por lo menos el género del agente infeccioso; sin embargo, los resultados suelen demorarse debido a que el procesamiento de la muestra implica la fijación, corte y tinción de la misma.^{59, 73}

1.5.1.5 Inmunológicas

Existen diversas técnicas serológicas útiles para la detección de anticuerpos específicos contra un agente infeccioso y en algunos casos para la detección de antígeno fúngico. Estas pruebas incluyen la fijación de complemento, la precipitación en tubo capilar, la inmunodifusión, ELISA, aglutinación de partículas de látex, contraelectroforesis³⁰. Su uso adecuado y oportuno facilita el diagnóstico temprano de las micosis invasivas y su utilidad es variable en cada una de ellas. Por ejemplo la prueba de aglutinación en látex es útil para detectar el antígeno capsular de la *Cryptococcus* spp.; esta misma prueba no tiene valor para *Candida*, pero si una modalidad de la misma (Aglutinación en látex pasiva inversa; Reverse Passive Latex Agglutination, RPLA) o la detección de galactomanano de *Aspergillus*.^{77, 95, 99}

1.5.2 Métodos moleculares

En la actualidad, las técnicas moleculares se emplean en múltiples áreas médico-biológicas y han tenido gran impacto en diversas áreas como la epidemiología, la taxonomía y el diagnóstico.

Ejemplo de la aportación de estas herramientas a la epidemiología fue el reconocimiento de una nueva especie de *Coccidioides* y su distribución geográfica en América. Tradicionalmente y por muchos años, se conocía a *C. immitis* como agente causal de la coccidioidomicosis.⁷ En 2002 Fisher *et al*, por procedimientos moleculares identificaron una segunda especie, *C. posadasii*, de la cual se sabe que tiene una distribución geográfica diferente a *C. immitis*.





En el área de la taxonomía, las aportaciones de las técnicas moleculares son numerosas. Como ejemplo en el terreno de la micología médica está el caso de *Pneumocystis carinii (jirovecii)*. Este organismo se encontraba clasificado dentro del reino Protozoa, debido a que presenta características morfológicas similares a los organismos de este grupo. A partir de 1988, en base a estudios filogenéticos se demostró que *Pneumocystis* es un miembro del reino Fungi, pues al comparar la secuencia del gen 16S rRNA se observó es muy similar a la de *Saccharomyces cerevisiae*.^{53, 92}

Desde el punto de vista clínico las técnicas moleculares han aportado grandes avances y es deseable que en el futuro su rapidez, sensibilidad y confiabilidad sean los argumentos que avalen su uso extenso, particularmente en los centros hospitalarios en donde son atendidos los pacientes que están en riesgo de desarrollar infecciones oportunistas. Las micosis que han sido mayoritariamente exploradas por procedimientos moleculares son la candidosis y la aspergilosis.^{7, 27, 39,}

88

La diversidad de las técnicas moleculares es muy extensa; sin embargo, los procedimientos que han dado mayor apoyo al área clínica en micología han sido la PCR, la PCR- RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa seguida de Polimorfismos de la Longitud de Fragmentos de Restricción), polimorfismo del DNA amplificado al azar (RAPD) y PCR tiempo real.^{8, 71} Debido a que en este trabajo se utilizó la PCR como herramienta para la identificación de algunos hongos patógenos, haremos una breve descripción de esta técnica.

1.5.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Fue desarrollada por Kary Mullis en 1984. Actualmente es muy común y a menudo indispensable en la investigación médica y biológica. Consiste en amplificar una sola o unas cuantas copias de un fragmento de DNA generando miles a millones de copias de una secuencia de DNA particular. El método se basa en la repetición cíclica de tres reacciones sucesivas en presencia de la enzima DNA polimerasa:





desnaturalización, hibridación y polimerización. Estas fases se llevan a cabo a través de la variación de temperaturas (calentamiento y enfriamiento) para la fusión y la replicación del DNA. Los oligonucleótidos (“primers” o indicadores) que contienen secuencias complementarias a la región blanco y la DNA polimerasa son componentes clave para seleccionar y amplificar la región deseada. A medida que la PCR progresa, el DNA generado en sí mismo es utilizado como templado para la replicación, generando una reacción en cadena en la cual el templado de DNA es exponencialmente amplificado.

Casi todas las aplicaciones de PCR emplean una DNA polimerasa termoestable, como la *Taq* polimerasa, enzima originalmente aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta DNA polimerasa desde el punto de vista enzimático favorece la unión de la hebra de DNA molde con los oligonucleótidos y adiciona los nucleótidos necesarios para la iniciación de la síntesis de DNA. La mayoría de métodos de PCR usan alternativamente el calentamiento y enfriamiento de la muestra de PCR en una serie definida de cambios de temperatura necesarios primero para separar físicamente las dos hebras de la doble hélice de DNA (temperatura elevada) en un proceso llamado fusión (melting). Y segundo (temperatura menor), para que cada hebra sea utilizada como templado para la síntesis de DNA a partir de DNA blanco. La selectividad de la PCR resulta del uso de iniciadores que son complementarios a la región blanco de DNA en condiciones de temperatura específicas. En resumen, los componentes necesarios para una PCR básica son:

- Templado de DNA, que contiene la región blanco a ser amplificada.
- Dos oligonucleótidos, que son complementarios a los extremos 3' de cada hebra *sentido* y *antisentido* (sens and antisens) del DNA blanco.
- *Taq* polimerasa u otra DNA polimerasa.
- Desoxinucleótido trifosfato (dNTP's), que representan los bloques de construcción con los que la DNA polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA.
- Solución buffer, que proporciona un ambiente químico adecuado para la actividad y estabilidad de la DNA polimerasa.





- Cationes divalentes, iones magnesio o manganeso; generalmente se usa Mg^{2+} , pero el Mn^{2+} puede ser utilizado dependiendo de los objetivos del estudio ya que con éste a concentraciones elevadas se aumenta el índice de mutagénesis en la síntesis del DNA.^{9, 103}

Una de las regiones del DNA fúngico que se utiliza comúnmente como blanco para su amplificación es la correspondiente al DNA ribosomal (rDNA) que está presente en múltiples copias ordenadas en tándem dentro el genoma fúngico. El gen está compuesto por regiones que codifican para las diferentes subunidades del ribosoma asociados con regiones espaciadoras (Fig. 2).^{8, 76}

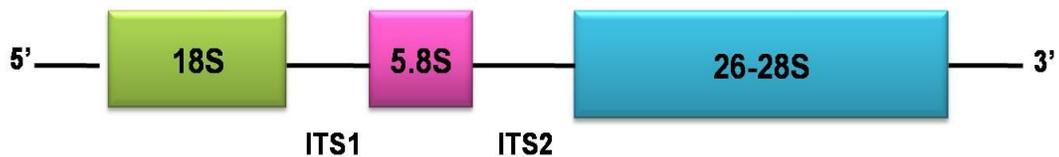


Figura 2. Representación esquemática del rDNA compuesto por genes que codifican para la subunidades 18S, 5.8S y la 28S separada por dos espacios de transcripción interna (ITS1 e ITS2).





2. ANTECEDENTES

En 1994, Thomas Mitchell y su equipo diseñaron tres oligonucleótidos específicos para *C. neoformans*: CN4, CN5 y CN6. Para probar su efectividad, realizaron PCR en donde incluyeron varias especies de *Cryptococcus* y levaduras de diferentes géneros. Los oligonucleótidos CN4, CN5 y CN6 fueron combinados entre sí y con oligonucleótidos universales (ITS1 e ITS4). CN4 y CN5 resultaron ser específicos sólo para identificar cepas de *C. neoformans* (37 en total). La combinación de los oligonucleótidos restantes amplificó a más de una especie y en consecuencia los consideraron inespecíficos. Los autores concluyeron que los oligonucleótidos CN4 y CN5 pueden ser usados en un futuro para amplificar DNA de *C. neoformans* a partir de productos biológicos.

En 1999, Voigt y colaboradores construyeron una base de datos a partir de las secuencias del 18S rDNA y de los dominios D1/D2 del 28S rDNA correspondientes a 42 aislados de diferentes especies de zigomicetos, incluyendo algunas de importancia médica y veterinaria, con la finalidad de investigar sus relaciones filogenéticas. Las secuencias del 28S rDNA fueron usadas para diseñar 13 pares de oligonucleótidos taxón-específicos para PCR, particularmente los implicados en infecciones. Todos los iniciadores amplificaron específicamente el DNA de tamaño esperado. De acuerdo a los autores estos iniciadores tienen el potencial de ser usados en una PCR para la identificación rápida y segura de los agentes etiológicos de la mucormicosis y la entomofotoromicosis.

Luo G. y Mitchell T. (2002), desarrollaron un protocolo para PCR múltiple, sintetizando oligonucleótidos especie-específicos en base a las secuencias de los Espaciadores de Transcripción Interna (Internal Transcription Spacers ITS) para diferentes especies de *Candida* y *Aspergillus fumigatus* (AFUM1 y AFUM2). Realizaron pruebas de especificidad y sensibilidad de algunos oligonucleótidos, así como PCR múltiple combinando tres pares de oligonucleótidos en cada reacción; una de éstas contenía los oligonucleótidos para *Candida albicans*, *A. fumigatus* y *C. neoformans* (CN-4 y CN-5, previamente diseñados), y obtuvieron el producto de PCR





del tamaño esperado de cada especie. A su vez, hicieron PCR utilizando directamente levaduras y hongos filamentosos directamente en el tubo de reacción, lo cual condujo a la amplificación de DNA correspondiente a la mayoría de levaduras pero no a los hongos filamentosos. Los autores concluyeron que la PCR múltiple es un método que ahorra tiempo en la identificación de los hongos patógenos incluidos en su estudio.

En el 2004, Castañeda y colaboradores compararon cuatro técnicas de extracción de DNA de *C. neoformans* a partir de muestras ambientales. Para evaluar la efectividad de las técnicas, los autores utilizaron los iniciadores CN4 y CN5 para detectar DNA de la levadura correspondiente. A su vez, realizó la prueba de sensibilidad con estos iniciadores utilizando en DNA de una cepa control de *C. neoformans*. Lograron extraer DNA de todas las muestras ambientales con resultados variables. Además hicieron la prueba de sensibilidad con una cepa control de *C. neoformans* cuyo resultado fue de 50 pg de DNA.

En México existen pocos estudios donde se ha empleado a la PCR como una alternativa para la identificación de los agentes causales de las micosis y diagnóstico de las mismas. Dentro de estos se encuentra el de Camacho-Cardoso (2008) quien realizó un estudio utilizando la PCR para la identificación de diferentes especies de *Candida* a partir de cultivo y de muestras biológicas. Esta prueba demostró ser específica y altamente sensible para los objetivos planteados.





3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años las micosis oportunistas han incrementado notablemente su frecuencia. Por la gravedad y la rápida evolución con que se presentan estas enfermedades, es necesario aplicar métodos que favorezcan la obtención de resultados específicos, confiables, rápidos e idealmente a un bajo costo. Los métodos tradicionales empleados comúnmente para el diagnóstico de las micosis han sido de gran utilidad, ya que en su conjunto permiten obtener resultados confiables, sin embargo, tienen diferentes grados de especificidad y sensibilidad, además de que requieren de mucho tiempo para completarse.

En México los datos epidemiológicos de las micosis oportunistas, especialmente su frecuencia, son reducidos. Dentro de estos se encuentra el de Méndez-Tovar y cols. (CMN Siglo XXI) en donde reporta que el 87% de 136 casos analizados correspondieron a mucormicosis, criptococosis y aspergilosis infecciones que, según los autores, han superado en frecuencia a las micosis subcutáneas.⁶¹

Considerando estas tres micosis, las desventajas que presentan las técnicas de diagnóstico son variadas. Por ejemplo, en el caso de la criptococosis, la efectividad del examen directo para la observación de *Cryptococcus* en especímenes es del 50%, además de que el tiempo de aislamiento e identificación de ésta levadura a partir de los productos biológicos va de 4 a 11 días.⁶⁶ Con la prueba de mucicarmín, *Cryptococcus* llegar a confundirse con *B. dermatitidis*.⁵⁹ *Cryptococcus* es ureasa positiva al igual que *Rhodotorula* y *Trichosporon* por lo que esta prueba no es lo suficientemente discriminativa para la identificación ni de género ni de especie.

Aunque el SIDA sigue siendo la principal enfermedad relacionada con la criptococosis, se han reportado casos en los cuales los pacientes no tienen alguna otra patología predisponente al desarrollo de la infección, lo que puede llegar a dificultar el diagnóstico de la enfermedad, ya que la sintomatología de la





criptococosis es indistinguible de otras enfermedades pulmonares o invasión de otros órganos como el SNC.

Existen limitaciones para la interpretación de los aislamientos de *Aspergillus* ya que la identificación de las especies a partir de la siembra de los productos biológicos puede tardarse 13 días en promedio, a pesar de que se considera un hongo de rápido crecimiento.⁶⁶ Esto se debe a que, para determinar que un aislado de *Aspergillus* tiene un papel patógeno, es necesario realizar cultivos seriados. Para determinar especies es necesario hacer cultivos en distintos medios bajo diferentes condiciones. Por otro lado, en el examen directo, *Aspergillus* se confunde con otros hongos filamentosos como *Fusarium* y *Sepdosporium*.²³

Debido a que en México existen pocos centros en los que se utilicen los métodos moleculares como una alternativa para la identificación de los agentes causales de las micosis y diagnóstico de las mismas, nos propusimos hacer uso de estas herramientas para acortar el tiempo y aumentar tanto la confiabilidad como la especificidad del diagnóstico micológico.





4. OBJETIVOS

Generales:

- ✿ Utilizar la PCR y oligonucleótidos específicos para obtener un amplificado de las cepas control de *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y de los géneros *Absidia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*.

- ✿ Corroborar la identidad de los diferentes aislados problema por la técnica de PCR.

Particulares:

- ✿ Determinar la especificidad de 6 pares de oligonucleótidos elegidos:
 - CN4-CN5 específicos para *C. neoformans*
 - AFUM1-AFUM2 específicos para *A. fumigatus*
 - Acy1-Acy2, específicos para *A. corymbifera*
 - Mc1-Mc2, específicos para *M. circinelloides* y *M. ramosissimus*
 - Rm1-Rm2, específicos para *R. pusillus* y *R. miehei*
 - Ro1-Ro2, específicos para *R. oryzae*

- ✿ Determinar la sensibilidad de los oligonucleótidos antes mencionados.





5. MATERIAL Y METODOLOGÍA

5.1 Cepas tipo y aislados clínicos

En este trabajo fueron incluidos 40 aislados fúngicos: 22 correspondieron a hongos levaduriformes y 18 a filamentosos. Los hongos levaduriformes incluyeron 6 géneros y los hongos filamentosos 5 géneros. Las especies respectivas están anotadas en la Tabla 1 y 2. Posteriormente se muestra la morfología macro y microscópica de algunas de las especies incluidas.

Tabla 1. Cepas control y aislados clínicos levaduriformes incluidos en este estudio.

| No. | Especie | Clave ^a | Origen | Uso |
|-----|----------------------------------|--------------------|-------------|------------------|
| 1 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | WM-148 | Clínico | Control positivo |
| 2 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | WM- 626 | Clínico | Control positivo |
| 3 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | WM-628 | Clínico | Control positivo |
| 4 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | WM-629 | Clínico | Control positivo |
| 5 | <i>Cryptococcus gattii</i> | WM-175 | Ambiental | Control positivo |
| 6 | <i>Cryptococcus gattii</i> | WM-178 | Clínico | Control positivo |
| 7 | <i>Cryptococcus gattii</i> | WM-179 | Clínico | Control positivo |
| 8 | <i>Cryptococcus gattii</i> | WM-779 | Veterinario | Control positivo |
| 9 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | FM-221 | Clínico | Problema |
| 10 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | FM-282 | Clínico | Problema |
| 11 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | FM-662 | Clínico | Problema |
| 12 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | FM-769 | Clínico | Problema |
| 13 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | FM-775 | Clínico | Problema |
| 14 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | FM-864 | Clínico | Problema |
| 15 | <i>Cryptococcus albidus</i> | FM-844 | Ambiental | Control negativo |
| 16 | <i>Cryptococcus laurentii</i> | FM-836 | Ambiental | Control negativo |
| 17 | <i>Cryptococcus unigutulatus</i> | 069 | Clínico | Control negativo |
| 18 | <i>Candida albicans</i> | FM-206 | Clínico | Control negativo |





*Continuación

| No. | Especie | Clave ^a | Origen | Uso |
|-----|---------------------------------|--------------------|-----------|------------------|
| 19 | <i>Malassezia globosa</i> | FM-758 | Clínico | Control negativo |
| 20 | <i>Rhodotorula sp.</i> | FM-65 | Clínico | Control negativo |
| 21 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | FM-147 | Ambiental | Control negativo |
| 22 | <i>Trichosporon asahii</i> | IGM-89-055 | Clínico | Control negativo |

^aAbreviatura de la colección de origen: WM-Wieland Meyer, Australia; FM- Facultad de Medicina, Laboratorio de Micología Médica, UNAM

Tabla 2. Cepas control y aislados clínicos filamentosos.

| No. | Especie | Clave ^a | Origen | Uso |
|-----|---------------------------------|--------------------|-------------|------------------|
| 1 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | ATCC-14110 | Clínico | Control positivo |
| 2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | AF-1 | Desconocido | Control positivo |
| 3 | * <i>Absidia corymbifera</i> | ATCC-66996 | Clínico | Control positivo |
| 4 | * <i>Mucor circinelloides</i> * | ATCC-90680 | Desconocido | Control positivo |
| 5 | * <i>Mucor mucedo</i> | ATCC-20094 | Ambiental | Control positivo |
| 6 | * <i>Mucor recemosus</i> | ATCC-22365 | Desconocido | Control positivo |
| 7 | * <i>Mucor ramosissimus</i> | ATCC-90286 | Clínico | Control positivo |
| 8 | * <i>Rhizomucor miehei</i> | ATCC-22064 | Veterinario | Control positivo |
| 9 | * <i>Rhizomucor pusillus</i> | ATCC-36606 | Clínico | Control positivo |
| 10 | * <i>Rhizopus oryzae</i> | ATCC-11886 | Clínico | Control positivo |
| 11 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | FM-191 | Clínico | Problema |
| 12 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | FM-064 | Ambiental | Problema |
| 13 | <i>Absidia corymbifera</i> | FM-709 | Clínico | Problema |
| 14 | <i>Rhizopus oryzae</i> | FM-870 | Clínico | Problema |
| 15 | <i>Aspergillus flavus</i> | FM-063 | Ambiental | Control negativo |
| 16 | <i>Aspergillus terreus</i> | FM-062 | Clínico | Control negativo |
| 17 | <i>Aspergillus clavatus</i> | FM-061 | Desconocido | Control negativo |
| 18 | <i>Aspergillus sp</i> | FM-867 | Desconocido | Control negativo |

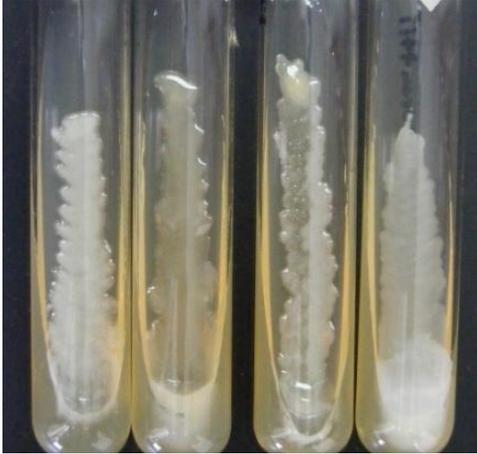
^aAbreviatura de la colección a la que corresponde: ATCC- American Type Culture Collection, FM- Facultad de Medicina. *Estas cepas de referencia fueron utilizadas también como control negativo para especies diferentes.



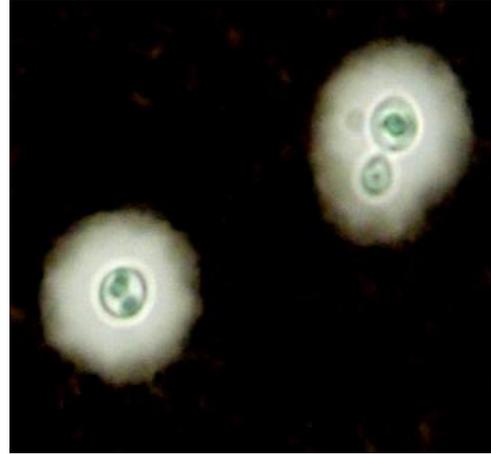


Figura 3. Género *Cryptococcus*

A)



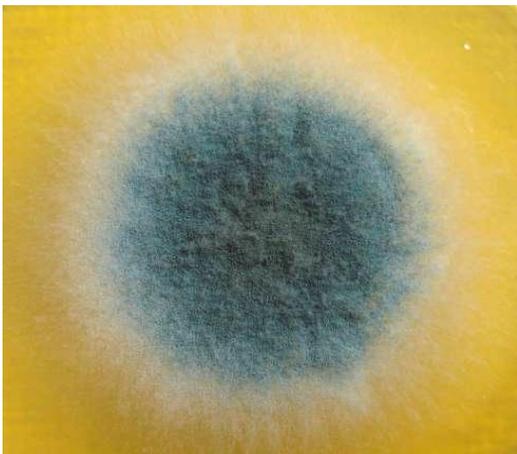
B)



A) Aspecto macroscópico de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *C. albidus* y *C. laurentii*, (de izquierda a derecha) crecidos en Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Colonias de aspecto mucosidad, de predominio blanco, resacas. B) Aspecto microscópico de *C. neoformans* contrastado con tinta china; se observan levaduras esféricas u ovoides, rodeadas de una cápsula.

Figura 4. Género *Aspergillus*

A)



B)



A) Aspecto macroscópico de *Aspergillus fumigatus*. Colonia aterciopelada, de color verde intenso. B) Morfología microscópica de *A. fumigatus* mostrando cabezas aspergílicas constituidas por una vesícula ovoide, en cuya mitad distal se encuentran dispuestas las fiáldes uniseriadas y cadenas cortas de fialoconidios.

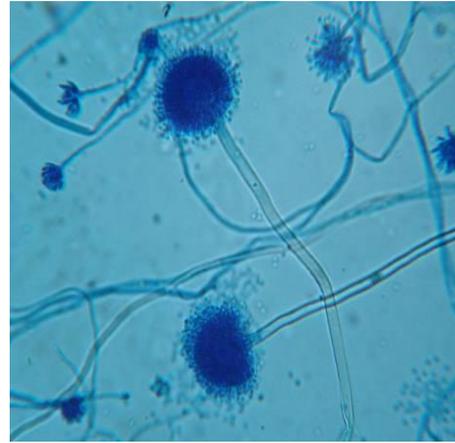




C)



D)

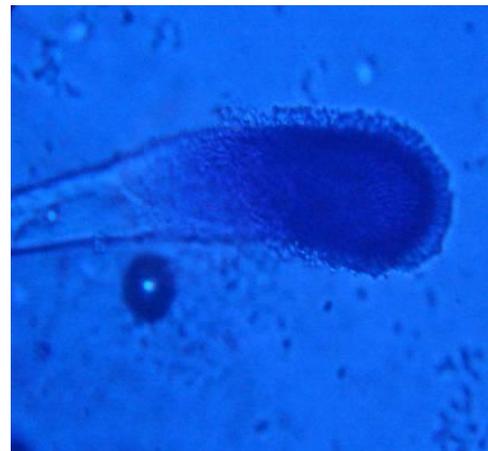


C) Morfología macroscópica de *A. flavus* crecido en ADS. Colonia de aspecto pulverulento amarilla. D) Aspecto microscópico de *A. flavus* mostrando hifas hialinas, vesículas globosas de las cuales surgen filídes uniseriadas y cadenas cortas de conidios.

E)



F)



E)

Morfología macroscópica de *A. clavatus* crecido en ADS. Colonia algodonosa y blanca en la periferia con centro granular de color verde oscuro. F) Morfología microscópica de *A. clavatus* mostrando una vesícula ovoide con filídes uniseriadas y conidios.





Figura 5. Mucorales

A)

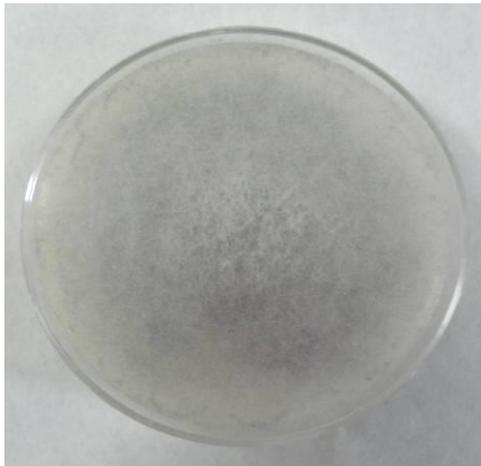


B)

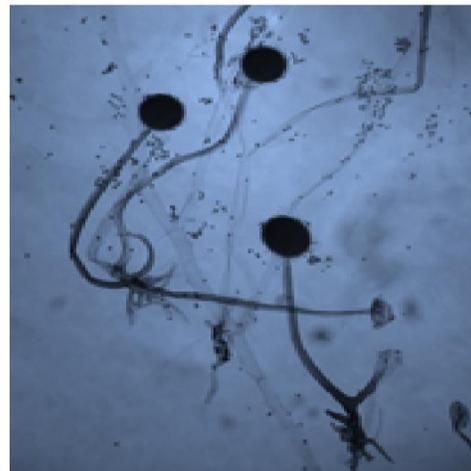


A) Morfología macroscópica de *Absidia corymbifera* crecida en ADS. Colonia de aspecto lanoso blanco-grisácea. B) Microscópicamente forma hifas hialinas, anchas, no tabicadas; esporangióforo terminados en una columela en forma de cono protruidos hacia un esporangio globoso que contiene las esporangiosporas.

C)



D)

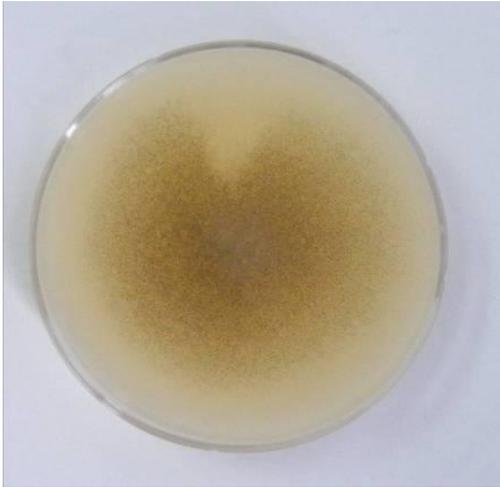


Rhizopus oryzae en ADS C) Colonia de aspecto lanoso, gris oscuro. D) Microscópicamente forma hifas anchas cenocíticas; se caracteriza por la presencia de rizoides y esporangióforos muy pigmentados, que sostienen a un esporangio esférico conteniendo una gran cantidad de esporangiosporas.





E)



F)

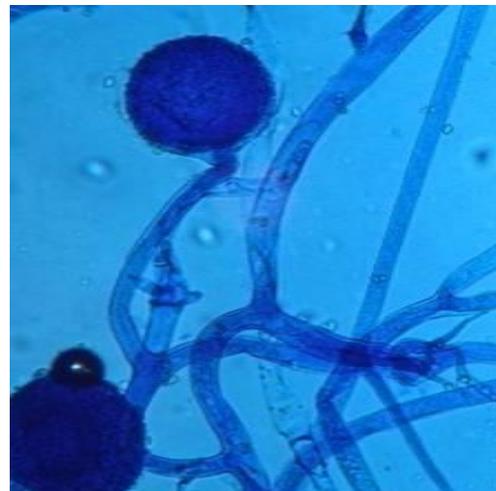


Mucor circinelloides crecido en ADS. E) Colonia gris-amarillento de aspecto algodonoso, amarilla con puntos oscuros que corresponden a los esporangios. F) Microscópicamente se observan hifas anchas, hialinas, irregulares; los esporangióforos terminan en un esporangio esférico; las esporangiosporas son ligeramente pigmentadas y elipsoidales.

G)



H)



Mucor mucedo. G) Colonia crecida en ADS, lanosa, de color gris. H) Al microscopio se observa esporangios globosos con esporangiosporas pigmentadas abundantes e hifas cenocíticas.

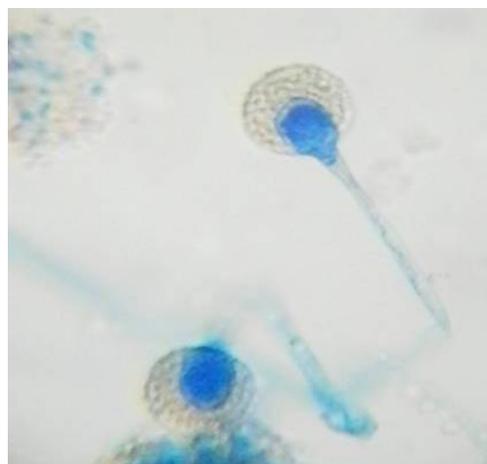




I)



J)



Rhizomucor miehei. I) Morfología macroscópica a 32 °C; colonia de aspecto mixto (algodonoso y pulverulento), de color gris. J) Forma esporangióforos que terminan en una columela ovalada y esporangios redondos conteniendo las esporangiosporas.

5.2 Obtención de colonias monospóricas

Hongos levaduriformes

Las levaduras fueron sembradas en placas de ADS por estría cruzada para obtener colonias aisladas; de las cuales tres fueron sembradas por separado. Se seleccionó una de estas la cual fue sembrada por estría cerrada para su cosecha directa y extracción de DNA. *M. globosa* fue sembrada en agar Dixon modificado en incubada a 32°C durante 7 días. Todas las levaduras fueron mantenidas en tubo con ADS a 4°C y en glicerol a -20 °C; *M. globosa* que fue mantenida en conservación en caldo Dixon modificado a 32 °C.

Hongos filamentosos

Para las especies de *Aspergillus* se obtuvo un cultivo en placa de Agar Czapek; las especies de *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Rhizomucor* fueron sembradas en Agar Papa Dextrosa; todos los cultivos fueron incubados 72 horas a 25°C, con excepción de *R. miehei* que fue incubado a 32 °C.





A partir de los cultivos anteriores se hizo una suspensión de conidios en solución salina estéril y Tween 80. La suspensión fue homogenizada y los conidios fueron contados en una cámara de Neubauer para determinar el número unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro de acuerdo a la fórmula*:

$$\# \text{ Total de células} \times 5 \times 10^4 \times 1 = \# \text{ de células/ml}$$

5- #. de cuadros contados

10⁴-mililitro

1-factor de dilución

*Modificado de Mier, *et al.*

Se realizaron diluciones con agua destilada estéril para obtener 30 UFC en 10 µl los cuales fueron inoculados en una placa de ADS y distribuidos por estría cerrada. La placa correspondiente a cada especie fue revisada periódicamente hasta observar colonias aisladas de las cuales tres fueron resembradas por separado. Una de ellas se eligió para realizar un sub-cultivo y conservarlo en agua; también se hizo una suspensión de conidios que se utilizó como inóculo para obtener la masa fúngica necesaria para la extracción de DNA. El inóculo se sembró en 200 ml de caldo dextrosa Sabouraud y se mantuvo en agitación a 130 rpm durante 72 hrs. a 25 °C. Pasado este tiempo se procedió a la extracción de DNA.

5.3 Extracción de DNA

El proceso de extracción de DNA se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de Blin⁵ con algunas modificaciones.

El procedimiento de extracción fue el mismo para levaduras y hongos filamentosos, con la diferencia de que las levaduras fueron cosechadas directamente de la placa con una espátula estéril. La masa de hongos filamentosos fue separada por filtración, lavada con agua destilada estéril y secada con papel filtro para iniciar el proceso de extracción de DNA.

La masa fúngica fue macerada en un mortero estéril conteniendo nitrógeno líquido hasta obtener un polvo blanquecino el cual fue colocado en un tubo de 2.0 ml y se le adicionaron 600 µl de buffer de lisis más 6 µl de Proteinasa K (concentración 20 mg/ml). Después de una agitación moderada, la mezcla fue incubada a 65 °C





durante 1 hora. Posteriormente se añadió un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1, agitando hasta obtener una mezcla de aspecto lechoso. La muestra fue centrifugada a 13,000 rpm durante 15 minutos; la fase acuosa (superior) fue transferida a otro tubo de 2.0 ml y se añadió 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol absoluto para iniciar la precipitación, agitando suavemente hasta visualizar las hebras de DNA.

La muestra obtenida fue centrifugada a 13,000 rpm durante 5 minutos y el sedimento fue lavado inicialmente con 1 ml de etanol absoluto y después con etanol al 70% con respectivos ciclos de centrifugación. El sedimento constituido por DNA, se dejó secar dentro de una campana de flujo laminar y fue resuspendido en agua MilliQ. Este material nucleico fue tratado con 10 μ l de RNAsa (10mg/ml) e incubado durante 1 hora a 37°C. Después, el volumen se aforó con agua MilliQ a 500 μ l para repetir la purificación con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, precipitación y lavado como se describió previamente. Finalmente el DNA fue resuspendido en un volumen variable de agua MilliQ dependiendo de la cantidad de DNA total obtenida.

Para verificar la pureza e integridad del material genético, se depositaron 3 μ l de DNA mezclados con buffer de carga en un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. Después del corrimiento a 80 volts durante 1 hora, el gel fue visualizado en un trasiluminador de luz ultravioleta para ser fotografiado.

El DNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría para lo cual se hizo una dilución 1:500 y la concentración se determinó a 260 y 280 nm de longitud.





5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

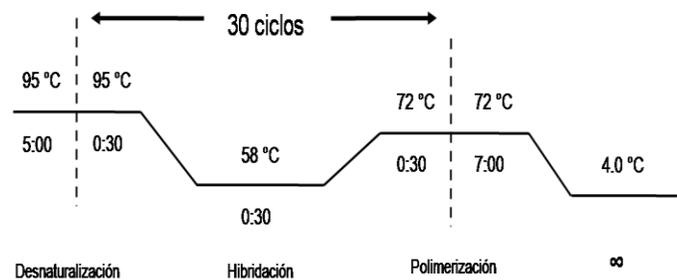
Este procedimiento fue realizado en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

-*Cryptococcus neoformans*

Este procedimiento fue realizado con 8 cepas de referencia (WM, 4 *C. neoformans* y 4 *C. gattii*) y 6 aislados problema (FM) de *C. neoformans*.

Para un volumen final de 50 µl, la mezcla de reacción y condiciones de PCR fueron las siguientes:

| Reactivos | Cantidad para una reacción | Concentraciones finales |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Buffer 10X | 5 µl | 1X |
| MgCl ₂ 30 mM | 2 µl | 3 mM |
| dATP 10 mM | 1 µl | 0.2 mM |
| dCTP 10 mM | 1 µl | 0.2 mM |
| dGTP 10 mM | 1 µl | 0.2 mM |
| dTTP 10 mM | 1 µl | 0.2 mM |
| Primer CN-4 5 µM | 4 µl | 0.4 µM |
| Primer CN-5 5 µM | 4 µl | 0.4 µM |
| Taq Polimerasa 5U | 4 µl | 2 U |
| DNA | 5 µl | 100 ng |



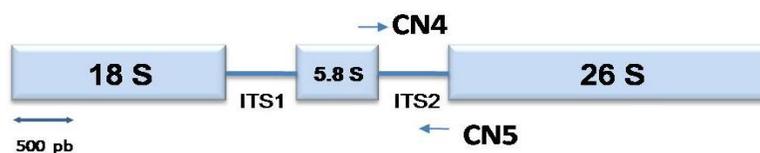
*Modificado de Luo y Mitchell *et al*, 2002

Características de los oligonucleótidos específicos para *C. neoformans*[†].

| Nombre del hongo | Oligonucleótidos | Secuencia de los oligonucleótidos (5' → 3') | Tamaño del fragmento |
|--------------------------------|------------------|---|----------------------|
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | CN4 | ATC ACC TTC CCA CTA ACA CAT T | 136 pb |
| | CN5 | GAA GGG CAT GCC TGT TTG AGA G | |

[†]Mitchell, *et al*, 1994

Figura 6. Localización de la región que amplifican los oligonucleótidos CN4 y CN5





En todas las reacciones se incluyó un control negativo (-) el cual contenía la mezcla de reactivos de PCR más 5 µl de agua MillQ estéril en lugar de DNA. Los tubos de reacción fueron colocados en un termociclador Perkin Elmer.

Concluida la reacción, se depositaron 5 µl de cada producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado transiluminador de luz ultravioleta para fotografiar los resultados.

Prueba de especificidad

Para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos a nivel género, se utilizó el DNA de: *Candida albicans*, *Malassezia globosa*, *Rhodotorula sp.*, *Trichosporon asahii* y *Saccharomyces cerevisiae* Se realizó la PCR bajo las mismas condiciones descritas previamente.

Posteriormente, para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos CN4-CN5 para la especie *C. neoformans*, se incluyó el DNA de otras especies de *Cryptococcus*: *C. gattii*, *C. albidus*, *C. laurentii* y *C. unigutulatus*.

Prueba de sensibilidad

Para determinar la cantidad mínima de DNA detectado por PCR en las condiciones previamente descritas, se utilizaron 100, 50 y 1 ng; y 500 y 100 pg de ADN. No hubo cambios en las condiciones de PCR previamente descritas.

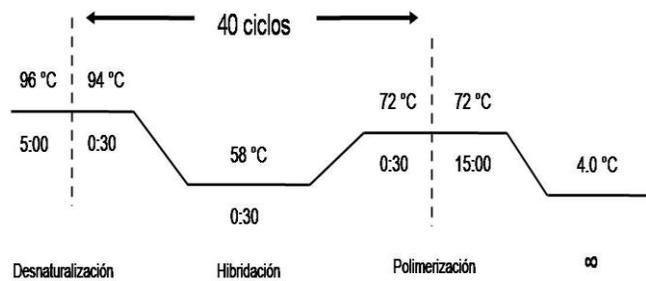




-*Aspergillus fumigatus*

Para esta prueba fueron incluidas 2 cepas de referencia de *A. fumigatus* y dos aislados clínicos propuestos como problema. El volumen de reacción final fue de 20 μ l bajo las siguientes condiciones:

| Reactivos | Cantidad para una reacción | Concentraciones finales |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Buffer 10X | 2 μ l | 1X |
| MgCl ₂ 30mM | 1 μ l | 1.5mM |
| dATP 2 mM | 2 μ l | 0.2mM |
| dCTP 2 mM | 2 μ l | 0.2mM |
| dGTP 2 mM | 2 μ l | 0.2mM |
| dTTP 2 mM | 2 μ l | 0.2mM |
| Primer AFUM-1 5 μ M | 2 μ l | 0.5 μ M |
| Primer AFUM-2 5 μ M | 2 μ l | 0.5 μ M |
| Taq Polimerasa 5U | 0.1 μ l | 0.5 U |
| DNA [1ng] | 1 μ l | 1 ng |



Características de los oligonucleótidos específicos para *A. fumigatus* diseñados en base a las secuencias de los ITS rDNA*.

| Nombre del hongo | Oligonucleótidos | Secuencia de los oligonucleótidos (5' → 3') | Tamaño del fragmento |
|------------------------------|------------------|---|----------------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | AFUM1 | CGC CGA AGA CCC CAA CAT GAA CGA | 385 pb |
| | AFUM2 | TAAAGT TGG GTG TCG GCT GGC | |

*Luo y Mitchell T, 2002.

En todas las reacciones se incluyó un control negativo (-) el cual contenía la mezcla de reactivos de PCR más 5 μ l de agua MillQ estéril en lugar de DNA. Los tubos de reacción fueron colocados en un termociclador Perkin Elmer.

Concluida la reacción, se depositaron 5 μ l de cada producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado transiluminador de luz ultravioleta y fotografiar los resultados.





Prueba de especificidad

Para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos AFUM1-AFUM2 se utilizó el DNA de otras especies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. terreus*, *A. clavatus* y *Aspergillus* sp.

Prueba de sensibilidad

En esta prueba se utilizaron las siguientes cantidades de DNA de *A. fumigatus* (ATCC-14110): 1, 0.8, 0.6, 0.5 y 0.4 ng.

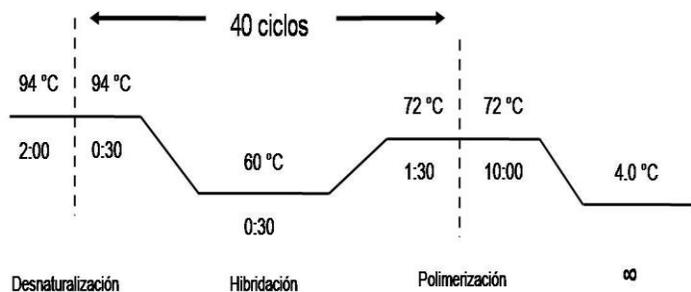
-Mucorales

Para la amplificación del DNA de este grupo de hongos, basada en el trabajo de Voigt et al, fueron en su mayor parte modificadas debido a que en los estudios piloto no se logró ninguna amplificación.

Así, para la PCR de los mucorales se incluyeron 8 cepas de referencia y 2 aislados clínicos: 1 cepa de referencia de *A. corymbifera* y 1 aislado clínico; 1 cepa de referencia de *M. circinelloides*, 1 de *M. mucedo*, 1 de *M. ramosissimus*; 1 de *M. racemosus*, 2 cepas de referencia del género *Rhizomucor*, *R. pusillus* y *R. miehei*; y 1 cepa de referencia y 1 aislado clínico de *Rhizopus oryzae*.

El volumen final de reacción fue de 50 µl bajo las siguientes condiciones de temperatura:

| Reactivos | Cantidad para una reacción | Concentraciones finales |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Buffer 10 X | 5 µl | 1X |
| MgCl ₂ 30 mM | 2 µl | 3 mM |
| dATP 10 mM | 1 µl | 0.2 mM |
| dCTP 10 mM | 1 µl | 0.2 mM |
| dGTP 10 mM | 1 µl | 0.2 mM |
| dTTP 10 mM | 1 µl | 0.2 mM |
| Primer A 5 µM | 4 µl | 0.4 µM |
| Primer B 5 µM | 4 µl | 0.4 µM |
| Taq Polimerasa 5U | 0.4 µl | 2 U |
| DNA [20 ng] | 5 µl | 100 ng |



Modificado de Voigt et al, 1999.



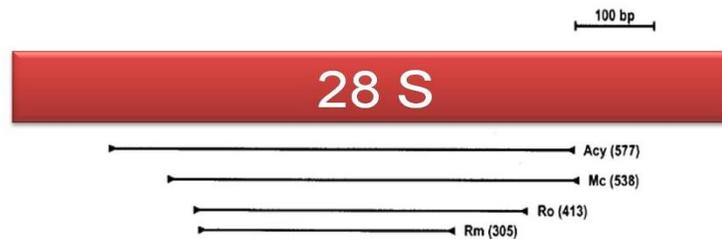


Características de los oligonucleótidos específicos para los mucorales[^].

| Nombre del hongo | Oligonucleótidos | Secuencia de los oligonucleótidos (5' → 3') | Tamaño del fragmento |
|-----------------------------|------------------|---|----------------------|
| <i>Absidia corymbifera</i> | Acy1 | CGG ATT GTA AAC TAA AGA GCG | 577 pb |
| | Acy2 | CCA AAG TAG ATT ACA GTT CTA G | |
| <i>Mucor circinelloides</i> | Mc1 | ATT TTC CTG GCA CAC CAG ATT | 538 pb |
| <i>Mucor ramosissimus</i> | Mc2 | GCG AAT AAA AAA TAT ACT AGA TGT | |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | Ro1 | AGC ATT TGC CTT TTG TGA TAC GC | 413 pb |
| | Ro2 | ACC GTA GTA CCT CAG AAA ACC | |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | Rm1 | TCT ATT GCG ATG CAT GCT CC | 305 pb |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> | Rm2 | GGT CTC TTT AGA CTC CAA AGC | |

Voigt et al[^].

Figura 7. Localización de la región que amplifican los oligonucleótidos Acy1-Acy2, Mc1-Mc2, Ro1-Ro2 y rm1-Rm2, en el 28S rDNA.



En todas las reacciones se incluyó un control negativo (-) el cual contenía la mezcla de reactivos de PCR más 5 µl de agua MillQ estéril en lugar de DNA. Los tubos de reacción fueron colocados en un termociclador Perkin Elmer.

Concluida la reacción, se depositaron 5 µl de cada producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado transiluminador de luz ultravioleta y fotografiar los resultados.





Prueba de especificidad

Los oligonucleótidos fueron probados utilizando DNA de todas las especies de mucorales mencionadas previamente. Se utilizó como control positivo el DNA de la o las especies para las cuales el iniciador fue descrito como específico.

Prueba de sensibilidad

Para conocer la cantidad mínima de material genético amplificado en las condiciones de PCR previamente descritas, se utilizaron las siguientes cantidades de DNA: 1 y 0.5 ng; 1, 0.5 y 0.1 pg; 50, 10, 9, 8 y 7 fg.

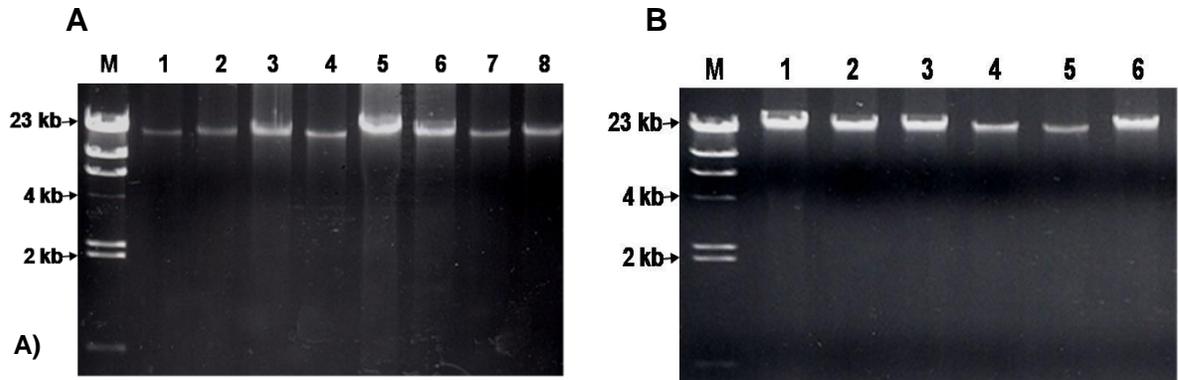




6. RESULTADOS

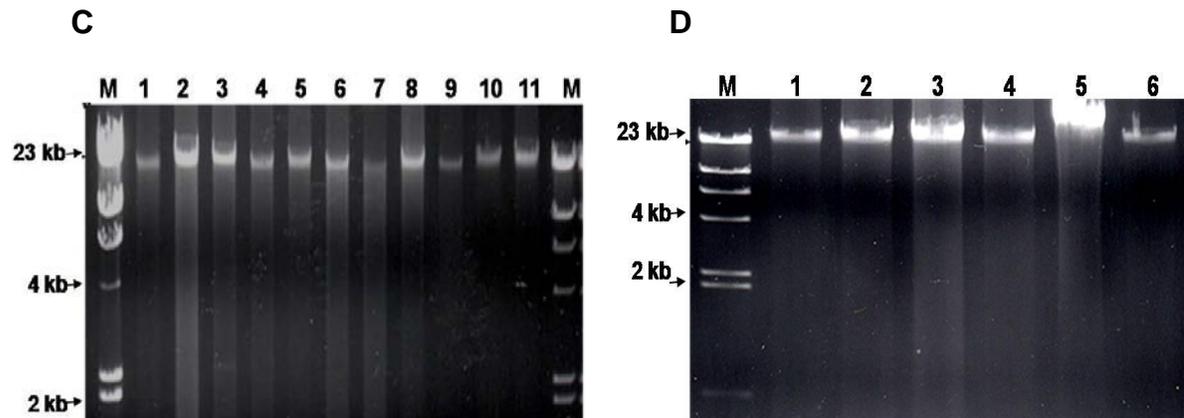
Figura 8. Extracción del DNA.

En las Figuras A, B, C y D se observa el material genético obtenido de las cepas control y aislados clínicos de *Cryptococcus*, *Aspergillus* y los mucorales. El DNA es de buena calidad, limpio, sin degradación y de un peso aproximado de 23 kb, el cual fue comparado con el marcador de peso molecular λ DNA/*Hind* III Fragments.



A) DNA de cepas de referencia de *Cryptococcus*. M- Marcador λ DNA/*Hind* III Fragments; 1- *C. neoformans* WM-148; 2- *C. gattii* WM-175; 3- *C. gattii* WM-178; 4- *C. gattii* WM-179; 5- *C. neoformans* WM-626; 6- *C. neoformans* WM-628; 7- *C. neoformans* WM-629; 8- *C. gattii* WM-779.

B) DNA de aislados clínicos de *Cryptococcus neoformans* M-Marcador λ DNA/*Hind* III Fragments 1- *C. neoformans* FM-221; 2- *C. neoformans* FM-282; 3- *C. neoformans* FM-662; 4- *C. neoformans* FM- 769; 5- *C. neoformans* FM-775; 6- *C. neoformans* FM-864.



C) DNA de cepas de *Aspergillus*, Mucorales y aislados de *Cryptococcus*. M- Marcador λ DNA/*Hind* III Fragments; 1- *Absidia corymbifera* ATCC-6699; 2- *Mucor circinelloides* ATCC-90680, 3- *M. mucedo* ATCC- 20094; 4- *M. racemosus* ATCC-22365; 5- *M. ramosissimus* ATCC-90286; 6- *Rhizomucor miehei* ATCC-22064, 7- *Rh. pusillus* ATCC-36606, 8- *Rhizopus oryzae* ATCC-11886, 9-*Aspergillus fumigatus* ATCC-14110; 10- *Cryptococcus albidus* FM-864; 11- *C. laurentii* FM-836.

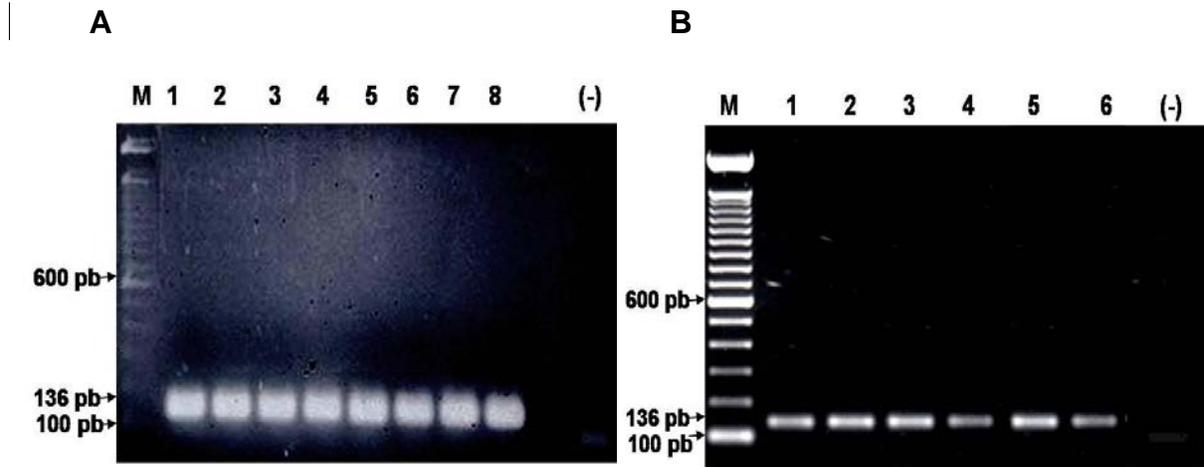
D) DNA de aislados de *Aspergillus*. M- Marcador λ DNA/*Hind* III Fragments; 1- *A. fumigates* FM-064; 2- *A. fumigatus* FM-191; 3-*A. flavus* FM-063; 4- *A. terreus* FM-062; 5- *A. clavatus* FM-061; 6- *Aspergillus* sp.





Figura 9. Productos de amplificación de *Cryptococcus neoformans*

En las Figuras A y B se muestran los productos de PCR de las cepas de referencia y cepas problema de *Cryptococcus* spp. En ambas Figuras se observa los amplificados esperados de 136 pb.



A) Productos de PCR de cepas de referencia de *Cryptococcus* M- Marcador de 100 pb; 1- *C. neoformans* WM-626; 2- *C. gattii* WM-179; 3- *C. gattii* WM-779; 4- *C. neoformans* WM-148; 5- *C. neoformans* WM-629; 6- *C. neoformans* WM-628; 7- *C. gattii* WM-175; 8- *C. gattii* WM-178; (-)- Control negativo. Excepcionalmente para este gel se depositaron 10 μ l de producto de PCR.

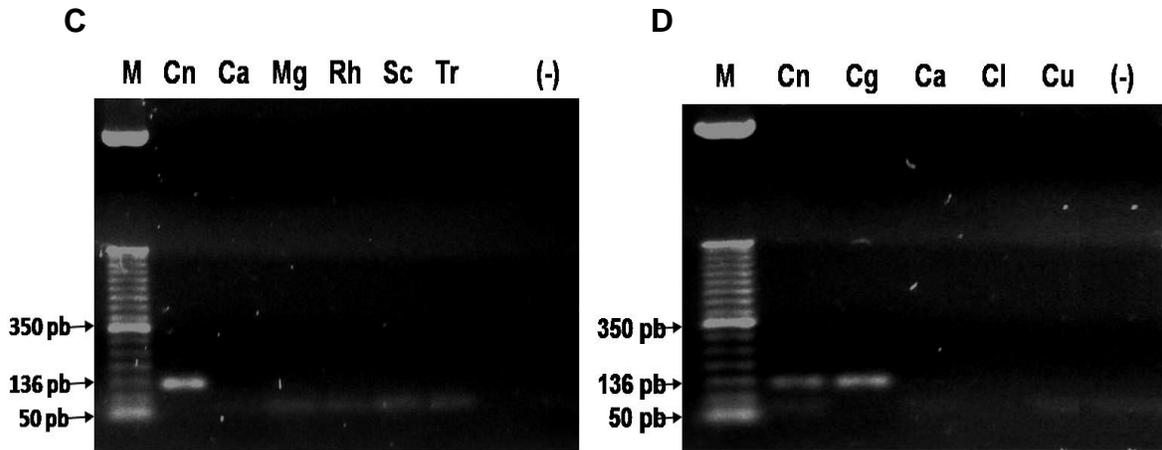
B) Productos de PCR de aislados clínicos de *Cryptococcus neoformans* M- Marcador de 100 pb; 1- *C. neoformans* FM-221; 2- *C. neoformans* FM-282; 3- *C. neoformans* FM-662; 4- *C. neoformans* FM-769; 5- *C. neoformans* FM-864; 6- *C. neoformans* FM-775; (-)- Control negativo.

Prueba de especificidad

En las Figuras C y D se muestran los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos CN4-CN5, en diferentes especies de *Cryptococcus* y en otras levaduras de interés médico. En ambas Figuras se muestra el fragmento esperado de 136 pb. Sin embargo, en la Figura D se observa este amplificado también en *C. gattii*. Otras levaduras de diferente especie (*C. albidis*, *C. laurentii* y *C. unigutulatus*) no muestran amplificación.

En la Figura D, se muestra amplificado de 136 pb en el carril correspondiente a *C. neoformans* y *C. gattii*. Con esto se demuestra que los iniciadores CN4-CN5 no son específicos para *C. neoformans* solamente.

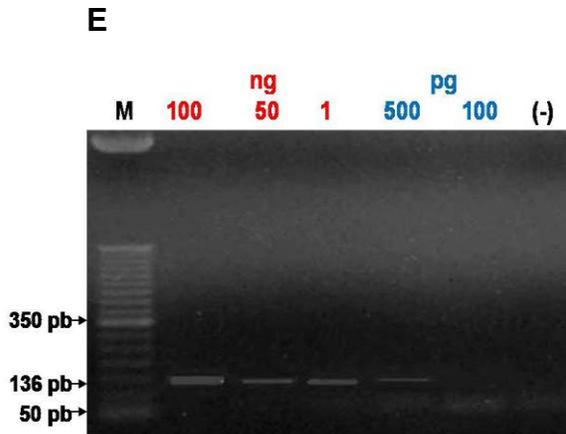




C) Especificidad de los oligonucleótidos CN4-CN5 con levaduras de diferentes géneros. M- Marcador de 50 pb; **Cn-** *Cryptococcus neoformans* WM 148 como control positivo; **Ca-** *Candida albicans* FM-206; **Mg-** *Malassezia globosa* FM-758; **Rh-** *Rhodotorula* sp.; **Sc-** *Saccharomyces cerevisiae* FM-758, **Tr-** *Trichosporon assahii*; **(-)**- Control negativo.

D) Especificidad de los oligonucleótidos CN4-CN5 con diferentes especies de *Cryptococcus*. M- Marcador de 50 pb; **Cn-** *Cryptococcus neoformans* WM 148 como control positivo; **Cg-** *C. gattii*; **Ca-** *C. albidus* FM-844; **Cl-** *C. laurentii* FM-836, **Cu-** *C. unigutulatus* 069.

Prueba de sensibilidad



E) Sensibilidad del los oligonucleótidos CN4-CN5, utilizando diferentes cantidades de DNA de *C. neoformans* WM-148. **M-** Marcador de peso molecular 50 pb, **(-)**- Control negativo.

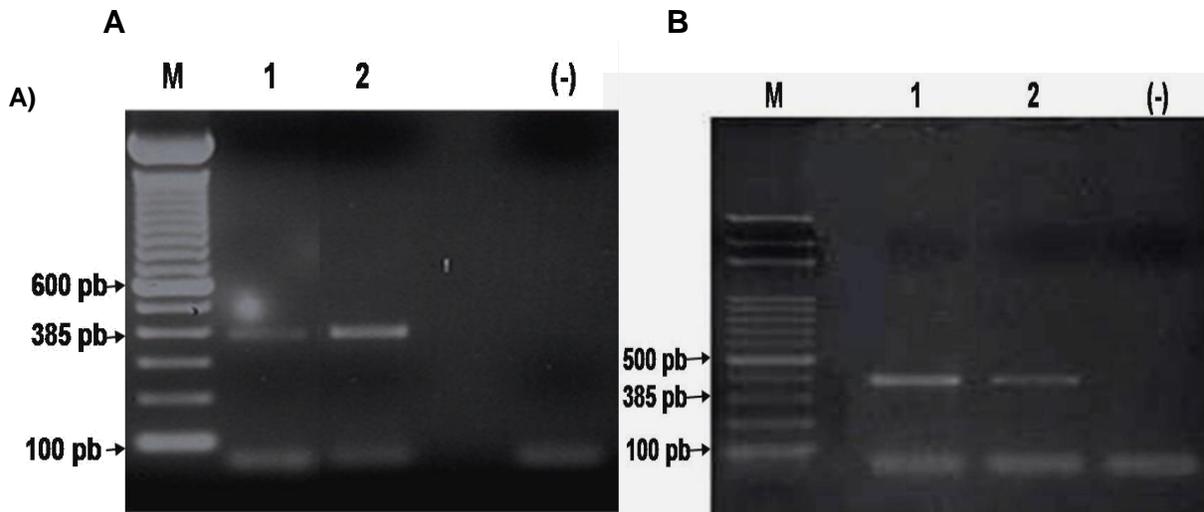
En la Figura F se observa la cantidad mínima de DNA amplificada con los oligonucleótidos específicos para *C. neoformans* (500 pg). El tamaño del amplificado es de 136 pb.





Figura 10. Productos de amplificación de *Aspergillus fumigatus*

Las Figuras A y B muestra los productos de amplificación obtenidos de las cepas control y cepas problema de *Aspergillus fumigatus*. El producto amplificado fue de 385 pb.



A) Productos de amplificación de las cepas de referencia de *A. fumigatus*. M- Marcador de 100 pb; 1- *A. fumigatus* ATCC-141; 2- *A. fumigatus* Af1, (-) Control negativo.

B) Productos de amplificación de aislados problema de *A. fumigatus*. M- Marcador de 100 pb, 1- *A. fumigatus* FM-064 y 2- *A. fumigatus* FM-191, (-) control negativo.

Prueba de especificidad

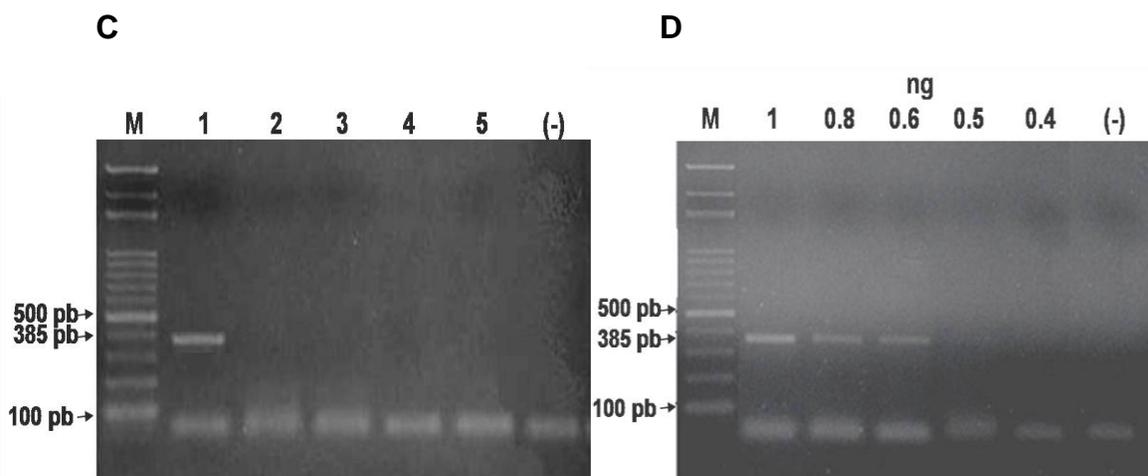
En la Figura C se muestra los amplificadores correspondientes a la prueba de especificidad de los oligonucleótidos AFUM1-AFUM2 comparado con el DNA de otras especies de *Aspergillus*. Solamente el carril correspondiente a *A. fumigatus* muestra el amplificado esperado de 385 pb con lo que se indica la alta especificidad de los iniciadores utilizados.





Prueba de sensibilidad

Los resultados de esta prueba son mostrados en la Figura D. La cantidad mínima de DNA de *A. fumigatus* detectada con los oligonucleótidos AFUM1 y AFUM 2 fue de 0.5 ng.



C) Prueba de especificidad de los oligonucleótidos AFUM1-AFUM2. M- Marcador de 100 pb; 1- *A. fumigatus* ATCC14110 como control positivo; 2-*A. flavus* FM-063; 3- *A. terreus* FM-062; 4-*A. clavatus* FM-061; 5- *Aspergillus* sp.; (-)- Control negativo.

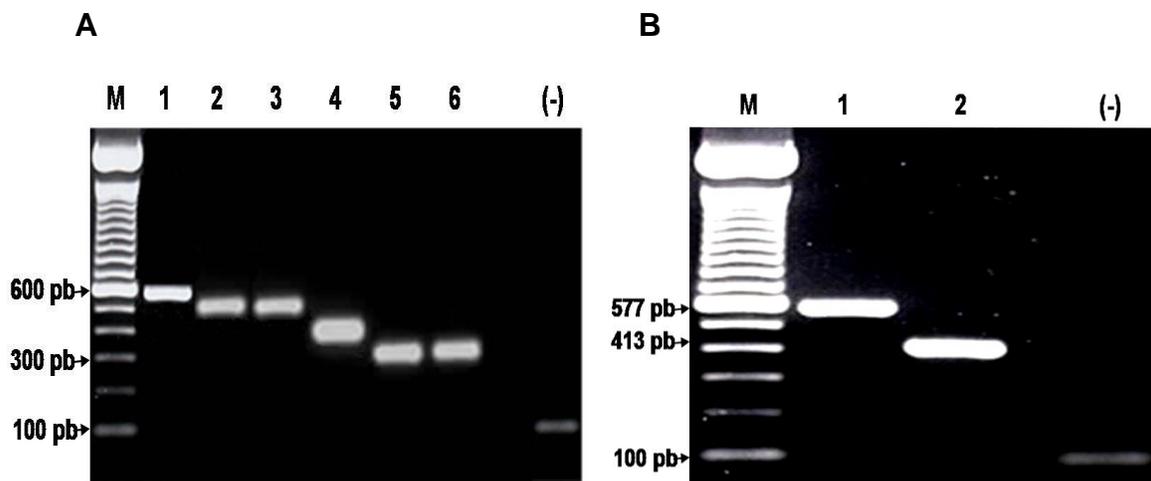
D) Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos AFUM1-AFUM2 con DNA de *A. fumigatus* ATCC-14110. M- Marcador de 100 pb, (-)- Control negativo.





Figura 11. Productos de amplificación en hongos mucorales

La Figura A muestra los productos de amplificación de las cepas control de los mucorales, utilizando los oligonucleótidos reportados como específicos para las especies incluidas. El tamaño del fragmento amplificado en cada especie fue: *Absidia corymbifera*, de 577 pb; *Mucor circinelloides* y *M. ramosissimus*, 538 pb; *Rhizomucor pusillus* y *R. miehei*, 305 pb; y finalmente *Rhizopus oryzae*, 413 pb. En la Figura B se muestran los amplificados de los dos aislados problema.



A) Productos de PCR de cepas de referencia de mucorales. M- Marcador de 100 pb; 1- *Absidia corymbifera* ATCC-66996 (577pb); 2- *Mucor circinelloides* ATCC -90680; 3- *M. ramosissimus* ATCC-90286 (538 pb); 4- *Rhizopus oryzae* ATCC-11886 (413 pb); 5- *Rhizomucor miehei* ATCC-22064; 6- *Rh. pusillus* ATCC-36606 (315 pb); (-)- Control negativo.

B) Productos de PCR de aislados problema de mucorales. M- Marcador de 100 pb; 1- *Absidida corymbifera* FM-709 (577pb); 1- *Rhizopus oryzae* (413 pb), (-)- Control negativo.

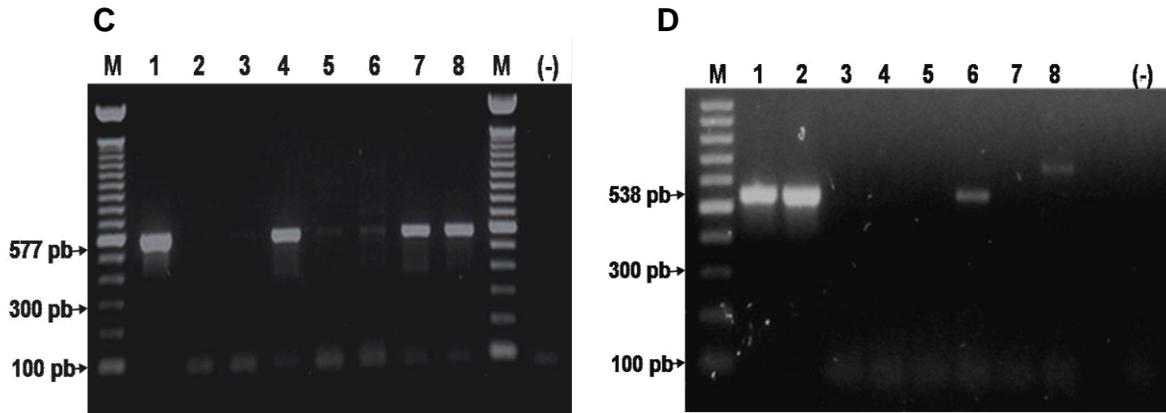
Prueba de especificidad

En las Figuras C, D, E y F se muestra la prueba de especificidad de los oligonucleótidos Acy1-Acy2, Mc1-Mc2, Rm1-Rm2 y Ro1-Ro2 respectivamente. Para este procedimiento se utilizaron, por ejemplo, los oligonucleótidos específicos de *A. corymbifera* (Acy1-Acy2) y el DNA de *A. corymbifera* como control positivo así como el DNA de las otras especies de mucorales como controles negativos. Para determinar la especificidad de los otros oligonucleótidos para mucorales se realizó el



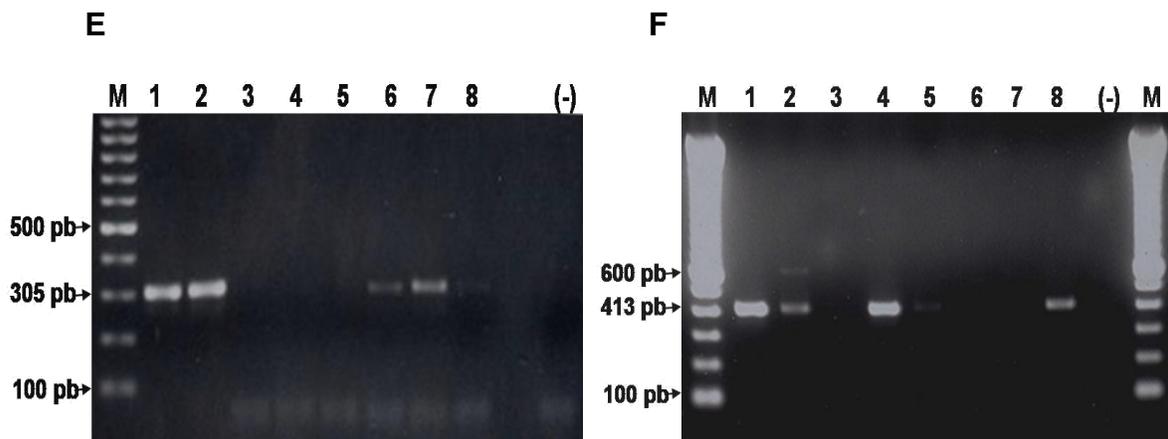


procedimiento equivalente. El carril número 1 (en C y F) y carriles 1 y 2 (en D y E) corresponde a los controles positivos.



C) Prueba de especificidad de los oligonucleótidos Acy1-Acy2. M- Marcador de 100 pb; 1- *Absidia corymbifera* ATCC-66996 como control positivo (577 pb); 2- *Mucor circinelloides* ATCC -90680; 3- *M. mucedo* ATCC-2009; 4- *M. racemosus* ATCC-22365; 5- *M. ramosissimus* ATCC-90286; 6- *Rhizomucor miehei* ATCC-22064; 7- *R. pusillus* ATCC-3660; 8- *Rhizopus oryzae* ATCC-11886, M- marcador de 100 pb, (-)- Control negativo.

D) Prueba de especificidad de los oligonucleótidos Mc1-Mc2. M- marcador de 100 pb; 1- *Mucor circinelloides* ATCC-90680 (538 pb) como control positivo; 2- *M. ramosissimus* ATCC-90286 (538 pb) como control positivo; 3- *Absidia corymbifera* ATCC-66996; 4- *M. mucedo* ATCC- 2009; 5- *M. racemosus* ATCC-22365; 6- *Rhizomucor pusillus* ATCC-36606, 7- *R. miehei* ATCC-22064; 8- *Rhizopus oryzae* ATCC-11886, (-)- Control negativo.



E) Prueba de especificidad de los oligonucleótido Rm1-Rm2. M- Marcador de 100 pb, 1- *Rhizomucor pusillus* ATCC-36606 (305 pb) como control positivo; 2- *R. miehei* ATCC-22064 (305 pb) como control positivo; 3- *Absidia corymbifera* ATCC-66996; 4- *Mucor circinelloides* ATCC-90680; 5- *M. mucedo* ATCC- 2009; 6- *M. racemosus* ATCC-22365; 7- *M. ramosissimus* ATCC-90286; 8- *Rhizopus oryzae* ATCC-11886, (-) control negativo.

F) Prueba de especificidad de los oligonucleótidos Ro1-Ro2. M- Marcador de 100 pb; 1- *R. oryzae* ATCC-11886 (413 pb) como control positivo; 2- *A. corymbifera* ATCC-6699; 3- *Mucor. circinelloides* ATCC-90680; 4- *M. mucedo* ATCC- 20094; 5- *M. racemosus* ATCC-22365; 6- *M. ramosissimus* ATCC-90286; 7- *Rhizomucor miehei* ATCC-22064; 8- *R. pusillus* ATCC-36606; (-)- Control negativo.





Los resultados obtenidos en esta prueba nos muestran que los oligonucleótidos Acy1-Acy2, Mc1-Mc2, Rm1-Rm2 y Ro1-Ro2 no fueron específicos, debido a que se observó un amplificado en los controles negativos, por lo tanto, no son útiles para la identificación de la especie o especies para las que fueron diseñados.

Tabla 3. Resumen de los resultados de la prueba de especificidad de los iniciadores Acy1-Acy2, Mc1-Mc2, Rm1-Rm2 y Ro1-Ro2.

| Espece / Oligonucleótido | <i>A. corymbifera</i> | <i>M. circinelloides</i> | <i>M. mucedo</i> | <i>M. racemosus</i> | <i>M. ramosissimus</i> | <i>Rh. miehei</i> | <i>Rh. pusillus</i> | <i>R. oryzae</i> |
|--------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------|---------------------|------------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| Acy1-Acy2 | + | - | +/- | + | +/- | +/- | + | + |
| Mc1-Mc2 | - | + | - | - | + | - | + | +/- |
| Rm1-Rm2 | - | - | - | +/- | + | + | + | +/- |
| Ro1-Ro2 | + | - | + | +/- | - | - | + | + |

Donde (+) representa amplificación, (+/-) amplificación con baja intensidad y (-) la ausencia de amplificación. Los iniciadores Acy1-Acy2 y Ro1 y Ro2 fueron los más inespecíficos ya que amplificaron en tres o más especies control-negativo. En la prueba con iniciadores Rm1-Rm2 hubo dos amplificados inespecíficos, uno de los cuales difirió en tamaño (*700 pb).

Sensibilidad

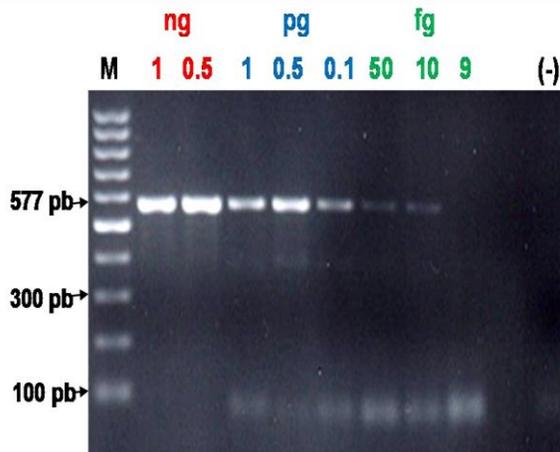
En las Figuras G a L se muestra la cantidad mínima de DNA detectada por los cuatro pares de oligonucleótidos para mucorales. Se utilizaron concentraciones desde 1 ng hasta 7 fg de material genético. Debido a que los oligonucleótidos Mc1-Mc2 y Rm1-Rm2 amplifican respectivamente para dos especies, se realizó prueba de sensibilidad para cada una de ellas.

Con los oligonucleótidos para *A. corymbifera* la cantidad de DNA mínima detectada fue de 10 fg; para *R.oryzae* de 9 fg; para *M. circinelloides* y *M. ramosissimus* fue 10 fg; para *R. pusillus* y *R. miehei* fue de 10 fg para ambos.

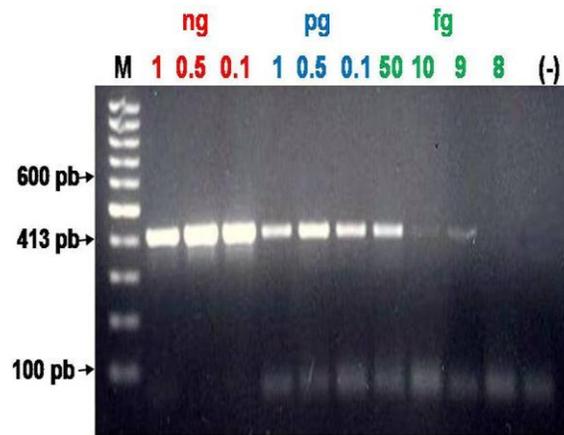




G



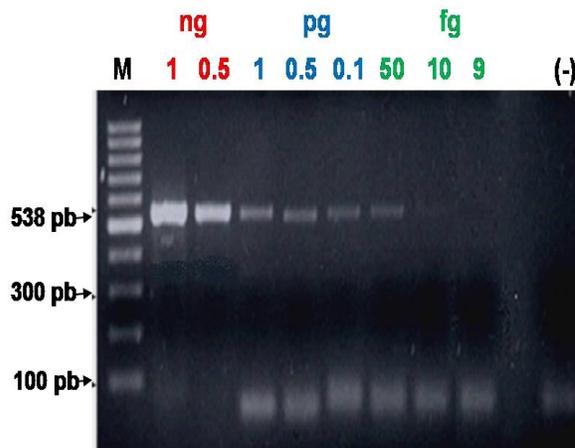
H



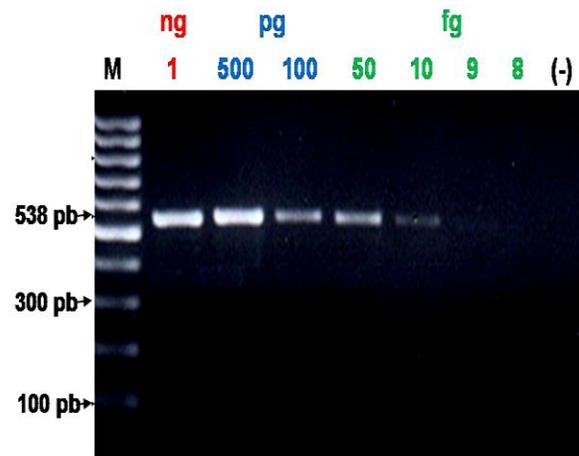
G) Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos Acy1-Acy2 con DNA de *Absidia corymbifera* ATCC-66996 (577 pb). M- Marcador de 100 pb, (-)- control negativo.

H) Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos Ro1-Ro2 con DNA de *Rhizopus oryzae* ATCC -11886 (413 pb). M- Marcador de 100 pb; (-)- Control negativo.

I



J



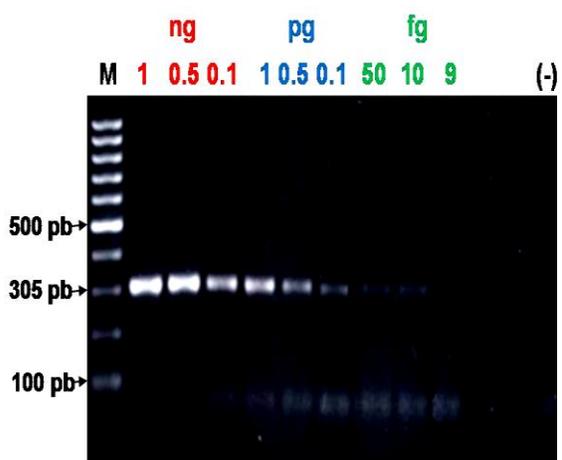
I) Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos Mc1-Mc2 con DNA de *Mucor circinelloides* ATCC-90680 (538 pb). M- Marcador de peso molecular 100 pb; (-)Control negativo.

J) Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos Mc1-Mc2 con DNA de *Mucor ramosissimus* ATCC-90286 (538 pb). M- Marcador de peso molecular 100 pb, (-)- Control negativo.

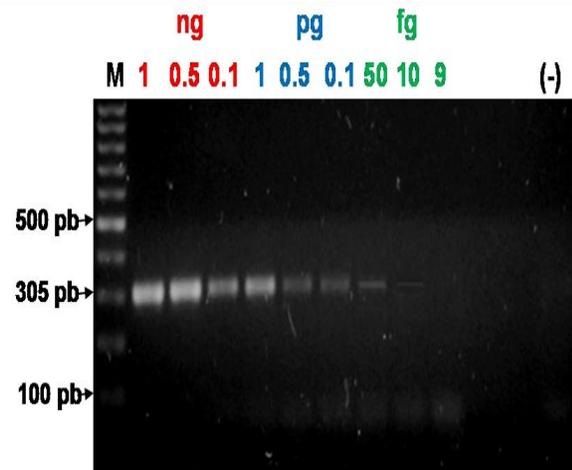




K



L



K) Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos Rm1-Rm2 con DNA de *Rhizomucor miehei* ATCC-22064 (305 pb). M- marcador de peso molecular 100 pb, (-) control negativo.

L) Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos Rm1-Rm2 con DNA de *Rhizomucor pusillus* ATCC-36606 (305 pb). M- Marcador de 100 pb; (-)-Control negativo.





7. DISCUSIÓN

La finalidad de este trabajo fue utilizar la PCR como una herramienta para la identificación de *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y los agentes causales más frecuentes de mucormicosis. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos reportados como específicos para detectar DNA de los hongos antes mencionados. Pese a que en los trabajos originales los autores determinaron la especificidad y sensibilidad respectivas, en el presente estudio se valoraron estos parámetros debido a que las condiciones de trabajo y equipo fueron diferentes.

Durante el proceso de extracción de DNA fúngico, no surgieron dificultades y el material obtenido resultó ser de calidad adecuada para su uso en la prueba molecular (PCR).

La PCR fue realizada utilizando los oligonucleótidos CN4-CN5, que originalmente fueron diseñados por Mitchell y colaboradores;^{55, 64} CN4 consiste de secuencias presentes solamente en el ITS rDNA de *F. neoformans* y CN5 contiene las secuencias más conservada del extremo 3' del gen 5.8S rDNA. En las cuatro cepas de referencia de *C. neoformans* se obtuvieron los amplificados esperados de 136 pb. En esta parte también fueron incluidas cuatro cepas de referencia de *C. gattii*, las cuales también mostraron este amplificado. Adicionalmente incluimos ocho aislados problema, identificados previamente como *C. neoformans* por pruebas morfológicas y bioquímicas; en el 100% se corroboró su identidad.

Como lo observaron Mitchell y colaboradores, los oligonucleótidos también detectan DNA de *C. neoformans* var. *gatti* por lo cual nuestros resultados coinciden. Esto indica que la región blanco de los oligonucleótidos CN4-CN5 son prácticamente iguales por lo cual no es posible diferenciar ambas especies, que previamente fueron descritas como una sola. De acuerdo con Kwon-Chung *et al*, es necesario el estudio filogenético comparativo de varios genes tanto de *C. neoformans* como de *C. gattii* para poder diferenciar a una especie de otra por técnicas moleculares.^{47, 49} Con el





conocimiento actual del genoma de *C. neoformans*,^{42, 100, 101} será posible en el futuro próximo identificar regiones que sean lo suficientemente variables para diseñar oligonucleótidos y así poder diferenciar a otras especies patógenas de *Cryptococcus* incluyendo *C. gattii*. Con el uso de los iniciadores CN4-CN5, fue posible diferenciar a *C. neoformans* y *C. gattii* de otras especies de *Cryptococcus* (*C. albidus*, *C. laurentii* y de *C. unigutulatus*) ya que en ellos no se observó ningún amplificado.⁶⁴

En este trabajo, como también lo hicieron Mitchell *et al.* y posteriormente Luo y Mitchell, fueron incluidos como controles negativos DNAs de *C. albicans*, *Rhodotorula sp.*, *Thichosporon sp.* y *S. cerevisiae*; estos, además de *M. globosa* (levadura que en la actualidad es causante de no sólo de micosis superficiales sino de fungemias),³⁶ que fueron confirmados como negativos.^{55, 64}

La sensibilidad de la PCR para *C. neoformans* fue de 500 pg, menor a la obtenida por Castañeda y cols. quienes reportaron 50 pg como la mínima cantidad de DNA detectada con los mismos iniciadores¹². La discrepancia en resultados podría deberse a la diferencia de concentraciones y marcas de los reactivos utilizados en ambas reacciones de PCR, además de que Castañeda y cols. incluyeron en su mezcla de reacción, conjuntamente cloruro de magnesio y acetato de magnesio, por lo que el aumento de la concentración del ion magnesio pudo haber favorecido la optimización de la PCR.^{26, 50}

Respecto a la PCR con DNA de *A. fumigatus* y con los oligonucleótidos AFUM1-AFUM2, que fueron diseñados por Luo y Mithell basados en las secuencias de los ITS, se obtuvo el amplificado esperado de 385 pb de las dos cepas control correspondientes a esta especie.⁵⁵ Así, estos demostraron ser específicos. La cantidad mínima de DNA obtenido en este trabajo fue de 500 pg. En un trabajo publicado por Skaladny *et al.* determinaron que 10 fg equivalen a 5 UFC,⁸⁹ en base a lo anterior, nosotros detectamos lo equivalente a 250, 000 UFC. Sin embargo, la sensibilidad podría aumentar si se utiliza la PCR anidada, como lo sugieren Cruzado





et al, Yamakaki y colaboradores.^{20, 102} No obstante, este procedimiento aumentaría el tiempo de realización y el costo.

Respecto a los mucorales, los iniciadores utilizados fueron diseñados por Voigt *et al.* basados en las secuencias del 28S rDNA, mismos que amplificaron el producto de PCR del tamaño esperado⁹⁸ en las cepas control y se corroboró la identidad de los dos aislados problema; sin embargo, todos ellos mostraron reacciones cruzadas.

Los iniciadores Acy1-Acy2 no diferenciaron a *A. corymbifera* de *M. racemosus*, *M. ramosissimus*, *R. miehei*, *R. pusillus* y *R. oryzae*. Por otro lado, los oligonucleótidos Mc1-Mc2 no fueron específicos para *M. circinelloides* y *M. ramosissimus* pues hubo amplificado en *R. pusillus*. El mismo hallazgo se observó con los oligonucleótidos Rm1-Rm2 considerado específico para *R. pusillus* y *R. miehei*, debido a que amplificaron también con *M. racemosus*, *M. ramosissimus*. Los oligonucleótidos Ro1-Ro2 si amplificaron el DNA de *R. oryzae* pero no lo diferenció de *A. corymbifera*, *M. mucedo* y *R. pusillus*.

La inespecificidad de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo posiblemente se deba a que los mucorales comparten secuencias entre si ya que forman parte de un grupo monofilético, es decir, derivan del mismo ancestro.^{98, 104} Es evidente que esta situación propicia los resultados cruzados obtenidos por lo que será necesario diseñar oligonucleótidos que permitan amplificar regiones suficientemente discriminativas inter-especies.

La sensibilidad de los oligonucleótidos Acy1-Acy2 fue de 10 fg, de DNA de *A. corymbifera*; con Ro1-Ro2, 10 fg de DNA de *R. oryzae*; con Mc1- Mc2, 9 fg de DNA de *M. circinelloides* y *M. ramosissimus* respectivamente; y por último, la sensibilidad de Rm1-Rm2, fue de 10 fg tanto con DNA de *R. miehei* como de *R. pusillus*.



La cantidad mínima de DNA detectada con las condiciones de PCR utilizadas en este trabajo fue muy alta (10 fg, en la mayoría de las reacciones) si la comparamos con



los 100 pg de material genético detectados por Machouart *et al.*, quienes amplificaron la región 18S de *Absidia*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Rhizomucor*. Cabe mencionar que las condiciones y los iniciadores usados por Machouart y colaboradores⁵⁶ no fueron los mismos que empleamos en este trabajo, sin embargo, la comparación de ambas técnicas sugiere que nuestro protocolo de PCR podría ser de gran utilidad combinándolos con iniciadores específicos para varias especies de mucorales y así poder obtener resultados altamente sensibles.

A pesar de la amplificación cruzada entre las diferentes especies de mucorales incluidos en este estudio, la PCR utilizada para su detección por el momento es una herramienta valiosa ya que aunque no se defina por el momento la especie, el sólo hecho de detectar con seguridad alguno de estos géneros será suficiente para administrar un tratamiento oportuno y así limitar la invasividad tisular.

En la actualidad los métodos moleculares se emplean para el diagnóstico temprano de muchas enfermedades infecciosas, incluidas las micosis. Debido a su alta especificidad y sensibilidad estos métodos poco a poco se emplearán en los laboratorios para complementar la información proveniente de los métodos convencionales y sobre todo para confirmar el diagnóstico de los casos dudosos.





8. CONCLUSIONES

- ✿ Con el presente trabajo se demostró que la PCR realizada en las condiciones descritas resultó ser un procedimiento útil para la identificación de *C. neoformans*, *C. gattii* y *A. fumigatus* sin resultados cruzados.
- ✿ Bajo las condiciones de PCR utilizadas para los hongos mucorales resultaron ser útiles para identificar su presencia pero no para diferenciar especies.
- ✿ La sensibilidad para *Cryptococcus* spp. y para *A. fumigatus* fue baja si las comparamos con trabajos similares.
- ✿ Los oligonucleótidos Acy1-Acy2, Mc1-Mc2, Rm1-Rm2 y Ro1-Ro2 no fueron específicos para la especie correspondiente; sin embargo, su sensibilidad fue muy alta.





9. PERSPECTIVAS

- La especificidad y sensibilidad de la técnica de PCR en las condiciones descritas en este trabajo podrán ser corroboradas al ser aplicadas en muestras biológicas obtenidas de pacientes con sospecha de infección por alguna de las especies aquí incluidas.
- Diseñar oligonucleótidos orientados a regiones lo suficientemente variables inter-especie para su aplicación e identificación confiables.
- Ampliar el uso de la PCR como método de diagnóstico en otros laboratorios de micología para la identificación oportuna de los agentes fúngicos.





BIBLIOGRAFÍA

1. Adams D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiol.* 2004;150:2029-2035.
2. Alexopolus, C, Mims CW, Blacwell M. *Introductory Mycology.* John Wiley y Sons. Inc. 1996.
3. Ameen M; Arenas R; Martinez E, Reyes M; Zacarias R. The emergence of mucormycosis as an important opportunistic fungal infection: five cases presenting to a tertiary referral center for mycology .*Int J Dermatol.* 2007;46:380-384.
4. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada.* 3ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2008.
5. Blin N, Stafford, D. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 1976;3:2303-2308.
6. Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25: S4-S12.
7. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M, Fleury-Feith J. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:1164-1168.
8. Bridge P. The history and application of molecular mycology. *Mycologist.* 2002;16: 90-99.
9. Bridge PD, Arora KD, Reddy CA, Elander RP. *Application of PCR in mycology.* Cab International. USA. 1998.
10. Calderone, RA. *Candida and Candidosis.* American Society for Microbiology Press. WashingtonDC. 2002.
11. Camacho-Cardoso JL. Identificación molecular de las especies más frecuentes causantes de candidosis sistémica, Tesis de maestría. IPN. 2008.





12. Castañeda A, McEwen, Hidalgo M, Castañeda E. Evaluación de varias técnicas de extracción de ADN de *Cryptococcus* spp. a partir de muestras ambientales. *Bioméd.* 2004;24:324-331.
13. Castañón-Olivares LR, Arreguín-Espinosa R; Ruiz-Palacios, Santos G; López-Martínez R. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American countries.. *Rev Latinoam Microbiol.* 2000;42:35-40.
14. Cavalier-Smith T. What are Fungi?. En *The Mycota VII, Part A, Systematics and Evolution.* Springer-Verlag. Berlin.2001.
15. Chagas-Neto TC, Chaves GM, Colombo AL. Update on the genus *Trichosporon.* *Mycopathol.* 2008;166:121-132.
16. Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25:215-229.
17. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20:507-544.
18. Christianson JC. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Med Mycol.* 2003;41:77-88.
19. Chu CM, Lai RW. *Malassezia furfur* fungaemia in a ventilator-dependent patient without known risk factors. *Hong Kong Med J.* 200 ;8:212-4.
20. Cruzado M, Blanco JL, Durán C, Andrino M, García M. Evaluation of two PCR methodologies for the detection of *Aspergillus* DNA. *Rev Iberoam Micol.* 2004;21: 209-212.
21. de Almeida GM, Costa SF, Melhem M, Motta AL, Szeszs MW, Miyashita F, Pierrotti LC, Rossi F, Burattini MN. *Rhodotorula* spp. isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects. *Med Mycol.* 2008;12:1-10





22. Deacon JW Fungal Biology. 2^a Ed. Blackwell Publishing. 2006.
23. del Palacio A, Alhambra A, Cuétara MS, Pontón J. Diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. Rev Iberoam Micol. 2007;30:2:187-97.
24. Díaz-Sánchez C, López-Viña A. Aspergillus y pulmón. Arch Bronconeumol. 2004;40:114-122.
25. Dignani M, Anaissie E. Human fusariosis. Clin Microbiol Infect. 2004;1:67-75.
26. Eckert KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. Genome Res. 199;1: 17-24.
27. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Muller CA, Bowden RA, Burik van J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol. 1997; 35: 1353-1360.
28. Ellis D, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol. 1990;28:1642-1644.
29. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. Nov., previously recognized as the non California population of *Coccidioides immitis*. Mycologia. 2002; 94:73-84.
30. Galván B, Mariscal F. Epidemiología de la candidemia en UCI. Rev Iberoam Micol. 2006;23:12-15.
31. Garza-Garza D; Buendía-Urbe JL; Martínez-Cruz E; Arguero-Licea B. Characterization of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Rev Iberoam Micol 1995;37:273-279
32. Gassiot C, Pino- Alfonso PP, Rodríguez-Vázquez JC, Ramos-Gómez MM, Páez-Prats I, Gundián-González J. Aspergilosis pulmonar: un nuevo enfoque en la reemergencia. Act Med. 2000;9:67-72.





33. Gil LG, Foster BC, Neira QO, Palma CS, Basualdo AJ, Heredia PC, Fernandez VA, Julio JC. *Cryptococcus neoformans* arthritis in elderly adult: case reported. Rev Chilena Infectol. 2006;23:330-335.
34. González de Buitrago JM. Técnicas y manuales de laboratorio. Masson. España. 2005.
35. Griffin D. Fungal Physiology. 2^a ed. E U. 1994.
36. Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev. 1999;12:454-500.
37. Guzmán AM. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. Rev Chilena Infectol. 2004;21:39-47.
38. Hamilton AJ, Goodley J. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. Curr Top Med Mycol. 1996;7:19-42.
39. Hayette MP, Vaira D, Susin F, Boland P, Christiaens G, Melin P, De Mol P. Detection of *Aspergillus* species DNA by PCR in bronchoalveolar lavage fluid. J Clin Microbiol 2001; 39: 2338-2340.
40. Hernández-Hernández F, Córdova-Martínez E, Manzano-Gayosso P, López-Álvarez R, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. Salud Publica Mex. 2002;45:455-460.
41. Herrera T, Ulloa M. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Fondo de Cultura Económica. México. 2004.
42. Idnurm A, Yong-Su B, Kirsten N, Xiaorong L, Fraser., Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Nat Rev Microbiol. 2005;3:753-764.
43. Inmaculada R, Acosta B, Colom F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. Rev Iberoam Micol. 2008;25:1013-1018.





44. Jarvis JN, Harrison TS. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit care Med.* 2008;29:141-150.
45. Khan ZU, Mustafa AS. Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol Res.* 2001;156:95-102.
46. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy L. Non-*neoformans* Cryptococcal Infections: a Systematic Review. *Infection.* 2007;35:51-58.
47. Know-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon.* 2002;51:804-806.
48. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Invasive Zygomycosis: Update on pathogenesis, clinical manifestations, and management. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20:581-607.
49. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Rev Microbiol.* 2006;60:69-105.
50. Ling LL, Keohavong P, Dias C, Thilli WG. Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. *Genome Res.* 1991;1: 63-69.
51. López Martínez R. Ecología de los hongos patógenos para el hombre. *Rev Mexicana Micol.* 2005;21:85-92
52. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares L. *Micología Médica. Procesamientos para el diagnóstico de laboratorio.* 2ª ed. Trillas. México. 2004.
53. Lucks A, Neff M. *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia. *Resp Care.* 2007;52:59-63.
54. Lumbreras C, Gavaldá J. Aspergillosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. *Rev Iberoam Micol.* 2003;20:79-89.





55. Luo G, Mitchell T. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2860-2865.
56. Machouart M, Larche J, Burton K, Collomb J, Maurer P, Cintrat A, Biava M F, Greciano S, Kuijpers FA, Contet-Audonneau, N, de Hoog G. S. Genetic Identification of the Main Opportunistic Mucorales by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Clin Microbiol.* 2006;44: 805–810
57. Manzano-Gayosso P. Candidosis. En *Actualidades de Micología Médica*. 4ª ed. Facultad de Medicina, UNAM, México 2008.
58. Martín E, Valverde A. Criptococosis: Diagnóstico Microbiológico y estudio de la sensibilidad in vitro. *Control de Calidad SEIMC [revista electrónica]*
59. Mayayo A. Diagnóstico histopatológico de las micosis. *Rev Iberoam Micol.* 2004;21:1-9.
60. Méndez-Tovar LJ, Anides-Fonseca A, Peña-González G, Manzano-Gayosso P, López-Martínez R, Hernández-Hernández F, Almeida-Arvizu V. Esporotricosis cutánea fija incógnita. *Rev Iberoam Micol.* 2004;21:150-152.
61. Méndez-Tovar LJ, Ramos-Hernández JM, Manzano-Gayosso P, García-González América, Hernández-Hernández Francisca, Bazán-Mora Elva, López-Martínez R. Micosis sistémicas: experiencia de once años en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, México. *Rev Mexicana Micol.* 2007;25:15-19.
62. Meyer W, Mitchell T G, Freedman E Z, Vilgalys R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2274-2280.
63. Mier T, Toriello C, Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos. *Métodos de laboratorio*. 1ª ed. UAM-Xochimilco, Instituto de Biología, UNAM. México, 2002:14-15.





64. Mitchell T, Freedman E, White T, Taylor J. Unique oligonucleotide in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 1994;32: 253-255.
65. Mitchell T, Perfect J. Cryptococcosis in the era of AIDS: 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev. 1995;8:515-48.
66. Morris AJ, Byrne TC, Madden JF, Reller LB. Duration of incubation of fungal cultures. J Clin Microbiol. 1996;34:1583-1585.
67. Nelson K, Sirisanthana T. Penicilliosis. En Clinical Mycology. Dismukes WE, Pappas, PG, Sobel JD. Oxford University Press Inc. New York. 2003.
68. Nucci M, Anaissie E. Fusarium infections in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev. 2007;20:695-704.
69. Osorio JJ, Román AR, Torre-Cisneros J. Spectrum and risk factors of invasive fungal infection. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25:467-476.
70. Parish JM, Blair JE. Coccidioidomycosis. Mayo Clin Proc. 2008;83:343-348.
71. Pereira F, Carneiro J, Amorim A. Identification of Species with DNA-Base Technology: Current Progress and Challenges. Recent Pat DNA Gene Seq. 2008;2:187-199.
72. Perfect J. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. FEMS Yeast Res. 2005;6:463-468.
73. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis and treatment. Med Mycol. 2007;45:321-346.
74. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology invasive Candidosis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20:133-163.
75. Pía-Spalloni M, Chávez A, Avilés C y Cofré J. Mucormicosis en Pediatría. Rev Chilena Infect. 2004;21:17-25.





76. Pincus D, Oren S y Chatellier S. Yeast identification: past, present and future methods. *Med Mycol.* 2007;45:97-121.
77. Portón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19:25-29.
78. Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, Vivanco A, Bikandi J, Pontón J, Garaizar J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22: 1-23.
79. Reséndiz-Morán MA, Velázquez-González G, Pérez-Espinosa J, Chávez-Macías L, Olvera-Rabiela JE. Criptococosis cerebral: análisis de 29 casos en 23 años de autopsias en el Hospital General de México. *Patol.* 2008;46:222-227.
80. Reséndiz-Sánchez J, Morales-Aguirre JJ. Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* sp. en niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 2007;64:91-98.
81. Rhodes C *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Med Mycol.* 2006;44:S77-S81.
82. Ribes J, Vanover C, Baker J. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:236-301.
83. Rippon JW. Medical Mycology. *Micología Médica. Hongos y actinomicetos patógenos.* 3ª ed McGraw-Hill Interamericana. 1990
84. Romero-Zamora JL, Bonifaz A, Sánchez CJ, Lagunas-Ramírez A, Hidalgo-Loperena H. Mucormicosis rinocerebral. Reporte de doce casos. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2000;63: 178-184.
85. Salas E. Arenas R. Biología molecular en micología médica. *Derm. Venez.* 2001;39: 7-10.
86. Satishchandra P, Mathew T, Gadre G, Nagarathna S, Chandramukhi A, Mahadevan A, Shankar SK. Cryptococcal meningitis: Clinical, diagnostic and therapeutic overviews. *Neurol India.* 2007;55:226-232.





87. Schwarz P, Bretagne S, Gantier JC, Garcia-Hermoso D, Lortholary O, Dromer F, Dannaoui E. Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. *J Clin Microbiol.* 2006;44:340-349.
88. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1454-1459.
89. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mösch C, Hehlmann R. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3865-3871.
90. Spellberg B, Edwards J, Ibrahim A. Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation and management. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:556-569.
91. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brouwn A, Bainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1993;31:615-621.
92. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from Humans. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:891-896.
93. Subramanian S, Mathai D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. *J Postgrad Med.* 2005;51:S21-26.
94. Sullivana DJ, Morana GP, Pinjona E, Al-Mosaida A, Stokesa C, Vaughana C, Colemana DC. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2004;4:369-376.
95. Topley and Wilson. Merz WG, Hay RJ. *Microbiology and Microbial infection. Medical Microbiology.* 10th ed. ASM Press. USA. 2005





96. Tortorano M, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler C, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R, ECMM Working Group on Candidaemia: Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:317-322.
97. Tuon F. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24:89-94.
98. Voigt K, Cigelnik E, O'donnell K. () Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3957-3964.
99. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27:245-251.
100. www.genome.ou.edu/cneo.html
101. www.sequence.stanford.edu/group/C.neoformans/
102. 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.
103. Yuan-Chen B, Janes HW. *PCR Cloning Protocols.* 2a ed. Humana Press 2003
104. Zunino M, Zullini A. *Biogeografía. La dimensión espacial de la evolución.* ...Fondo de Cultura Económica. México. 2003





APÉNDICE A

MEDIOS DE CULTIVO MICOLÓGICOS

Agar dextrosa Sabouraud sin antibióticos BD Bioxon®

| | |
|--------------------|--------|
| Agar | 15,0 g |
| Dextrosa | 40,0 g |
| Peptona de carne | 5,0 g |
| Peptona de caseína | 5,0 g |
| pH final 5.6+/-0.2 | |

Suspender 65 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Caldo dextrosa Sabouraud DB Bioxon®

| | |
|--------------------|--------|
| Dextrosa | 20,0 g |
| Peptona de carne | 5,0 g |
| Peptona de caseína | 5,0 g |
| pH final 5.7+/-0.2 | |

Suspender 30 g de polvo en un litro de agua purificada. Distribuir y esterilizar a 121°C por 15 minutos.





Agar Czapek Difco®

| | | | |
|---------------------|--------|---------------------|--------|
| Sacarosa | 30,0 g | Cloruro de magnesio | 0,5 g |
| Nitrato de sodio | 2,0 g | Sulfato ferroso | 0,01 g |
| Fostato dipotasico | 1,0 g | Bacto-agar | 15,0 g |
| Sultato de magnesio | 0,5 g | | |

Suspender 49 g de medio en 1000 ml de agua, calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Evitar el sobrecalentamiento. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Agar papa dextrosa BD Bioxon®

Infusión de papa

| | |
|----------|--------|
| (sólido) | 4,0 g |
| Dextrosa | 20,0 g |
| Agar | 15,0 g |

pH final 5.6±0.2

Suspender 39 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.





Agar Dixon modificado

| | | |
|--------------------------------------|------|-------|
| Extracto de malta Oxoid [®] | 3.6% | 36 g |
| Peptona Oxoid [®] | 0.6% | 6 g |
| Bilis de buey BD Bioxon [®] | 20% | 20 g |
| Tween 40 Baker [®] | 1% | 10 ml |
| Glicerol Baker [®] | 0.2% | 2 ml |
| Ácido oléico Baker [®] | 0.2% | 2 ml |
| Agar-agar BD Bacto [™] | 1.2% | 12 g |

Adicionar cada uno de los ingredientes en 1 litro de agua destilada. Calentar a ebullición agitando constantemente y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.





APÉNDICE B

SOLUCIONES DE TRABAJO PARA EL AISLAMIENTO DE DNA

Buffer de lisis

En un tubo Falcon estéril mezclar:

2ml de Tris HCL 50 mM (ph7.2)

2ml de EDTA (50 mM)

6 ml de SDS 3%

200 µl de beta-marcaptoetanol 1%

2.8 ml de agua destilada estéril

Reactivos

Nitrógeno líquido

Fenol cloroformo alcohol isoamílico (25-24-1)

Acetato de sodio 3M

Etanol absoluto (100%)

Proteinasa K (20 mg/ml) Invitrogen®

Etanol al 70%

RNAasa (10mg/ml) Invitrogen®

Agua MilliQ

Gel de agarosa

Mezclar en un matraz:

Agarosa Invitrogen®

TBE 1X

Bromuro de etidio (10 mg/ml) SIGMA®.

Buffer de carga:

Azul de bromofenol 0.25%

Azul de xilencianol 0.25%

Glicerol en agua 30%

Conservar a 4°C





Buffer de corrimiento de gel (TAE 50X)

242 g de Tris base

57.1 ml de ácido acético glacial

100 ml de EDTA 0.5 M (ph 8.0)

Diluir el buffer a una concentración 1X para corre los geles

Reactivos para la PCR

Amortiguador 10X Invitrogen®

Cloruro de Magnesio 30 mM Invitrogen®

Oligonucleótidos Invitrogen®

Taq polimerasa 5U Invitrogen®

dATP 10 mM Invitrogen®

dCTP 10 mM Invitrogen®

dGTP 10 mM Invitrogen®

dTTP 10 mM Invitrogen®

