

# DISEÑO DE UNA HERRAMIENTA MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE DERMATOFITOSIS

Gómez, María

Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (LMDM) de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas  
FBCB-UNL  
Directora: Dudiuk, Catiana

Área: Ciencias biológicas

## INTRODUCCIÓN

La dermatofitosis o tiña es la patología dermatológica de origen fúngico más común. A los agentes etiológicos que la desencadenan se los conoce como dermatofitos y se clasifican en tres géneros denominados *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Estos tienen la habilidad de invadir tejidos queratinizados (piel, pelos y uñas), limitándose a las capas cornificadas de la epidermis (Bonifaz, 2010). Dentro de estos géneros, existen seis especies con gran prevalencia en Argentina: *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. interdigitale* y *T. tonsurans* (Davel y col., 2007).

Para establecer un correcto diagnóstico y tratamiento de la dermatofitosis es importante una adecuada toma de muestra. El examen directo junto con el cultivo son los métodos de elección para poder identificar a nivel especie a los dermatofitos, permitiendo establecer un diagnóstico presuntivo que orientará al clínico en su tratamiento. En el caso que haya dificultad para su identificación, se suelen utilizar técnicas que incluyen pruebas bioquímicas, fisiológicas, ensayos nutricionales, medios de cultivos selectivos o semi-selectivos, entre otras. (Cabañes, 2001; Molina de Diego, 2011).

Sin embargo, la microscopía directa carece de especificidad y de sensibilidad, y se obtienen resultados falsos negativos. Por otra parte la identificación de especies a través del cultivo requiere de personal experimentado y demanda hasta 4 semanas de espera. Otro problema adicional es la alta tasa de contaminación que presentan los cultivos y la baja recuperación (Cabañes, 2001; Jackson, 2001). Estos inconvenientes evidencian la necesidad de desarrollar técnicas moleculares basadas en características genotípicas específicas y que tienden a estar menos afectadas por condiciones externas.

## OBJETIVO

Diseño de una herramienta molecular basada en PCR multiplex para la rápida identificación de *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans*, *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, del género *Trichophyton* y de dermatofitos en general.

## METODOLOGÍA

### Cepas fúngicas

Se utilizaron 22 cepas de dermatofitos pertenecientes a los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Estos hongos forman parte de la colección de cepas del Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (LMDM, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, CONICET, Santa Fe). Estas cepas fueron

Título del proyecto: Desarrollo de una plataforma de diagnóstico etiológico rápido por el estudio de genes blancos de drogas antifúngicas.

Instrumento: CAI+D.

Año convocatoria: 2016.

Organismo financiador: UNL.

Director/a: García-Effron, Guillermo.

empleadas para la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) y para la estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### Extracción de ADN

Las cepas de dermatofitos fueron sembradas en medio Agar Lactrimel de Borelli (LACT) para favorecer su crecimiento y esporulación, incubándose a 28°C entre 7-14 días. Luego, fueron repicadas en medio glucosa-extracto de levadura-peptona (GYEP), el cual se utiliza para el desarrollo de micelio a partir del cual se extrajo ADN.

Para la extracción del ADN de los distintos hongos dermatofíticos se empleó la técnica de Holden modificada (Holden, 1994).

### Diseño de PCR multiplex

Se realizó una búsqueda de las secuencias nucleotídicas de la región ITS1-5.8S-ITS2 de las distintas especies dermatofíticas, a través de la página web del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Luego, utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5.0 y las secuencias elegidas, se realizaron distintos alineamientos múltiples de los genes altamente conservados y de las regiones variables ITS, con el fin de diseñar primers específicos (uno *forward* (F) y cuatro *reverse* (R)) para la identificación del género *Trichophyton* y las especies: *T. interdigitale* (Tin)/*T. tonsurans* (Ton), *E. floccosum* (Ef), *M. canis* (Mc) y *M. gypseum* (Mg) en base a las diferencias y similitudes en sus secuencias nucleotídicas. A estos oligonucleótidos se les acoplaron los primers: PanDerm (F) y (R), DermUni (F) y Oligo Tr (R) (Brillowska-Dabrowska y cols., 2007), pudiendo crear así tres grupos de primers: primers para la detección de todas las especies de dermatofitos, primers para la detección de dermatofitos del género *Trichophyton* y primers de detección de especie.

Posteriormente, se estandarizaron las condiciones de reacción y perfil de tiempo/temperatura para las PCRs en formato multiplex. Todas las reacciones de amplificación se realizaron con la enzima Taq Pegasus® y ADN extraídos a partir de cultivo, como molde. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, en un termociclador Applied Biosystems (Biosystem, Argentina). Cada tubo del set de PCR multiplex contenía el primer DermUni (F) y uno o dos primers *reverse* específicos de detección de especies. A su vez, dos de los tubos tenían el oligonucleótido *forward* PanTricho y solo uno contenía, el par de oligonucleótidos PanDerm (F) y (R). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

### Clonado molecular

Se realizaron siete reacciones de PCR individuales en las condiciones estandarizadas con ADN de los dermatofitos en estudio. Los productos amplificados se ligaron al vector pGEM-T Easy Vector (Promega, Argentina) y fueron clonados en bacterias competentes de *Escherichia coli* Top 10 (previamente crecidas en el medio Luria-Bertani (LB) líquido a 37 °C, 220 rpm por 16-18 horas). Las bacterias transformadas mediante shock térmico (Sambrook y col., 2006), fueron sembradas en placas LB-agar con 20 µl X-gal (20 mg/ml), 10µl de IPTG (200 mg/ml) y 12,5 µl de Ampicilina (200 mg/ml) e incubadas a 37 °C durante toda la noche. Luego, se continuo con la extracción de ADN plasmídico (Sambrook y col., 2006) y se corroboró la inserción del inserto mediante digestión de los vectores con la enzima EcoRI (Promega, Argentina).

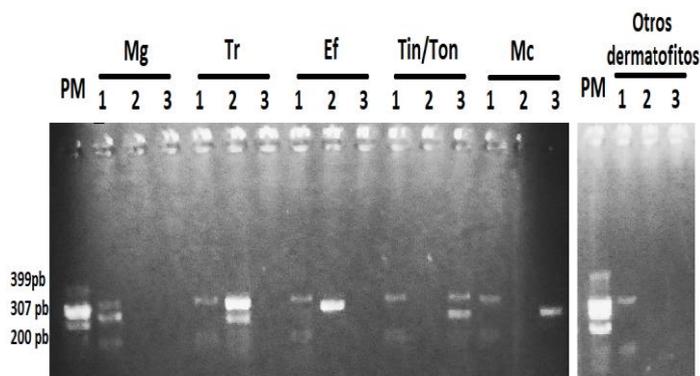
## RESULTADOS/CONCLUSIONES

### Diseño de PCR multiplex

La región genómica comprendida entre ITS1-5,8S-ITS2 se caracteriza por presentar zonas muy conservadas como son los genes ribosomales, y regiones muy variables con alta susceptibilidad a acumular mutaciones (ITS1 e ITS2). Utilizando la variabilidad de las regiones ITS se diseñaron dos grupos de primers: primers para la detección del género *Trichophyton* y primers de detección específica de especie. El primer PanTricho (F) se diseñó en las regiones específicas y conservadas dentro de la región ITS1 del género *Trichophyton* pero distintas para los otros dos géneros. Mientras que los cuatro primers específicos de especie se generaron teniendo en cuenta las discrepancias observadas en las secuencias nucleotídicas de la región ITS2 pertenecientes a *T. interdigitale*/*T. tonsurans*, *E. floccosum*, *M. canis* y *M. gypseum*. A estos oligonucleótidos se les acoplaron los primers: PanDerm (F), PanDerm (R), DermUni (F) y Oligo Tr (R), diseñados por Brillowska-Dabrowska y cols. (2007). Basandonos en las diferencias de tamaño de los fragmentos de amplificación obtenidos utilizando los respectivos pares de primers, se diseñó un set de PCR multiplex compuesto por 3 tubos, a partir de los cuales se puede determinar las especies de dermatofitos con mayor prevalencia en nuestro país.

Otras variables de reacción tales como temperaturas de ciclado, concentraciones de MgSO<sub>4</sub> y de los primers se tuvieron en consideración para el diseño de PCR con el fin de unificar todas las condiciones para así utilizar el mismo programa de PCR cualquiera sea el grupo de primers utilizado.

Luego de la corrida electroforética de las reacciones de PCR se obtuvo, para *M. gypseum*: dos bandas de 366 y 253 pb correspondientes al tubo 1, amplificadas por los primers PanDerm (F)-PanDerm (R) y DermUni (F)-Oligo. Mg (R), respectivamente y ninguna banda en lo que respecta al resto de los tubos; para *T. rubrum*: se obtuvo una banda de 366 pb correspondiente al tubo 1 amplificado por los primers PanDerm (F) y PanDerm (R) y dos bandas de 375 y 200 pb para el tubo 2 (primers PanTricho (F)-Oligo. Tr (R) y DermUni (F)-Oligo. Tr (R), respectivamente) pero ninguna para el tubo 3; para *E. floccosum* se observó una banda de 366 pb y otra de 307 pb propios del tubo 1 y 2, que corresponden a productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos PanDerm (F) y PanDerm (R) y DermUni (F)-Oligo. Ef (R), respectivamente; para *T. interdigitale*/*T. tonsurans*: se observó un producto de amplificación de 366 pb para el tubo 1 (PanDerm (F) y PanDerm (R)) y dos bandas de 399 y 226 pb, los cuales son productos de reacción del tubo 3 (PanTricho (F)-Oligo. Tin/Ton (R) y DermUni (F)-Oligo. Tin/Ton (R), respectivamente) y, por último, una banda de 366 pb y otra de 265 pb, obtenidas a partir de los primers PanDerm (F)-PanDerm(R) y DermUni (F)-Oligo. Mc (R), respectivamente, para la identificación de *M. canis*. En la tabla 1 se muestra la interpretación de resultados para el set PCR y en la figura 1 se observan los resultados de la corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%.



**Figura 1:** Corrida en gel de agarosa 1% para las reacciones de PCR master mix del tubo 1 (1), tubo 2 (2) y tubo 3 (3), utilizando como molde ADN de *T. rubrum* (Tr), *E. floccosum* (Ef), *M. gypseum* (Mg), *T. interdigitale* (Tin) o *T. tonsurans* (Ton), *M. canis* (Mc), *T. violacium* para "Otros dermatofitos" y patrones de peso molecular (PM) de 399 pb, 307 pb y 200 pb.

**Tabla 1:** Interpretación de los resultados de las reacciones de PCR en un gel de agarosa.

Dermatofitos	N° de bandas		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
<i>M. gypseum</i>	2	0	0
<i>M. canis</i>	1	0	1
<i>E. floccosum</i>	1	1	0
<i>T. rubrum</i>	1	2	0
<i>T. interdigitale/ T. tonsurans</i>	1	0	2
Otros dermatofitos	1	0	0

### Clonado molecular

Para obtener fragmentos de ADN estables en grandes cantidades tales que puedan ser utilizados como controles positivos de las reacciones de PCR mastermix, se procedió a la construcción de vectores plasmídicos. Se logró obtener bacterias de *E. coli* Top 10 transformadas con los siete vectores construidos (cada uno conformado por un plásmido pGEM T-Easy® que contiene en su polilinker una secuencia de nucleótidos obtenidos por PCR). La correcta transformación se corroboró mediante corridas electroforéticas, empleando un control negativo (colonia azul) correspondiente al plásmido cerrado.

Como conclusión, se puede decir que el set de PCR Multiplex diseñado es capaz de identificar las especies de dermatofitos desde cultivo, con mayor incidencia en Argentina, con un 100% de concordancia con el método de secuenciación considerado como gold estándar. Además, es rápida (4 horas), de bajo costo, robusta y altamente reproducible. También, se obtuvieron bacterias transformadas con fragmentos de ADN de dermatofitos que podrán ser utilizadas posteriormente como controles positivos de las reacciones de PCR.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bonifaz, A.**, 2012. Micología médica básica, México DF, México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Brillowska-Dabrowska, A., Saunte D. M., Arendrup, M. C.**, 2007. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *Journal of clinical microbiology*, 45, 1200–1204.
- Cabañes, F.** 2001. Identificación de hongos dermatofitos. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. *Revista Iberoamericana de micología*, 12-1.
- Davel, G., Canteros, C.E.**, 2007. Epidemiological status of mycoses in the Argentine Republic. *Revista Argentina Microbiología*, 39, 28-33.
- Holden, D. W.**, 1994. DNA mini prep method for *Aspergillus fumigatus* (and other filamentous fungi). Maresca and G.S.Kobayashi (ed.). *Molecular Biology of pathogenic fungi, a laboratory manual*. 3-4. Telos Press, New York.
- Jackson, C. J.**, 2001. Molecular Identification and strain typing of dermatophyte fungi. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 42, 7-10.
- Molina de Diego, A.**, 2011. Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of dermatophytosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29, 33-39.
- Sambrook, J., Russell, D. W.**, 2006. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot3932.
- Sambrook, J., Russell, D. W.**, 2006. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: miniprep. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot4084.