



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Estudio de la distribución
ambiental de los hongos del género
Scedosporium en el País Vasco.
Identificación de especies por
técnicas moleculares.

Desiree Santano Rivero

Leioa, Junio 2013.

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Índice:

1. Resumen.	3
2. Introducción.	4
3. Objetivo.	8
4. Materiales y métodos.	9
4.1. Realización del muestreo.	9
4.2. Aislamiento de especies el género <i>Scedosporium</i> .	9
4.3. Identificación microscópica a nivel de género.	10
4.4. Identificación de especies por PCR.	10
5. Resultados.	12
6. Discusión.	17
7. Bibliografía.	20

1. **Resumen:**

El complejo de especies *Scedosporium/Pseudallescheria* está compuesto por diferentes especies de hongos filamentosos. De las cinco más habituales y utilizadas en este estudio existen tres especies de patógenos oportunistas clínicamente importantes, *S. apiospermum*, *S. prolificans* y *S. aurantiacum*, que generan scedosporiosis especialmente en individuos inmunocomprometidos. El aumento del número de este tipo de pacientes en los últimos años está elevando la incidencia de los casos de scedoporiosis. *Scedosporium* spp. se encuentran frecuentemente en hábitats humanizados y con presencia de contaminación. En este trabajo, se ha realizado un estudio para determinar su presencia en algunos hábitats de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) y conocer su distribución, empleando técnicas microbiológicas y moleculares. No se aisló ninguna cepa del género en las playas de la CAPV, mientras que si que se encontraron en parques urbanos, aislándose la mayor cantidad de cepas y variedad de especies del género en las muestras de Araba. Por otro lado, se identificaron las especies del género mediante PCR, encontrándose cepas de *S. prolificans*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii* y *P. minutispora*. Además, se comprobó que los primers disponibles *S. apiospermum* no permitían discriminarlo del resto de especies.

2. Introducción.

El complejo de especies *Scedosporium/Pseudallescheria* está compuesto por nueve especies de hongos filamentosos del Filo *Ascomycota*: *S. prolificans*, *S. apiospermum/P. boydii*, *S. aurantiacum*, *P. minutispora*, *S. dehoogii*, *P. ellipsoidea*, *P. angusta*, *S. deficiens*, y *P. fusioidea*. Entre ellas existen tres especies de patógenos clínicamente importantes, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum*, y *S. prolificans*.

La taxonomía del género *Scedosporium* es compleja. Pertenece al Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Clase *Euascmycetes*, Orden *Microascales* y Familia *Microascaceae*. No obstante, la clasificación de las especies del género ha sido controvertida a lo largo de su estudio. La similitud morfológica, tanto macroscópica como microscópicamente, entre las diferentes especies ha contribuido a la complejidad taxonómica, obligando a los investigadores a referirse al género como complejo de especies *Pseudallescheria / Scedosporium*. Estudios moleculares recientes han permitido diferenciar mejor las especies por análisis de la secuencia de ADN de algunos loci como “internal transcribed spacers” (ITS), β -tubulina, o calmodulina (Gilgado *et al.* 2005, Gilgado *et al.*, 2008).

Por otra parte, las especies de este género tienen importantes diferencias morfológicas entre sus etapas sexual y asexual. Estas características facilitan la separación entre ellas, pero complican la situación taxonómica porque, al igual que en otros hongos (e incluso en otros organismos, como las algas), las fases sexuales se nombran como otros géneros y especies distintas. Las formas sexuales (teleomórficas) que se encuentran en este complejo de especies son las llamadas *Pseudallescheria*, pero no se ha encontrado evidencia de su existencia para todas las especies (como en el caso de *S. prolificans*). Además, siempre hay una fase asexual (anamórfica), conocida como *Scedosporium*. Pero es posible que existan otras formas asexuales que hayan sido clasificadas dentro de otros géneros como *Petriella* o *Graphium*, en función de sus características (Cortez *et al.*, 2008).

Las especies del género *Scedosporium* crecen formando colonias pilosas, grises y marrones. Presentan conidios en forma libre o en células conidiógenas que pueden ser cilíndricas o con forma de frasco. En caso de que presenten células conidiógenas éstas pueden estar separadas o formando agregados. Se aprecian además, zonas condensadas

poco visibles formadas por cabezas conidiales viscosas. Los conidios son unicelulares y su coloración varía desde hialino hasta marrón (de Hoog *et al.*, 2000).

La patogenicidad de los hongos oportunistas de este género está relacionada con diversos cuadros clínicos denominados conjuntamente como scedosporiosis, entre los que se encuentran infecciones localizadas, extendidas a tejidos próximos al lugar de infección, o diseminadas hematogéneamente. Se manifiestan como patógenos en individuos inmunocomprometidos aunque, en ocasiones, pueden infectar a individuos sanos. Hay varios factores de riesgo asociados a la scedosporiosis, el trasplante de órganos es uno de ellos, donde el porcentaje de muertes supera el 58% de los afectados. Otros grupos susceptibles de contraer scedosporiosis son individuos con linfopenia, neutropenia, tratados con esteroides, o con infecciones producidas por microorganismos tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Cortez *et al.*, 2008). Debido al aumento del número de pacientes inmunocomprometidos, estos hongos son cada vez más prevalentes calificándose como patógenos emergentes, este hecho se produce de la misma manera en la Comunidad Autónoma del País Vasco según Idígoras *et al.* (2001) y López *et al.* (2001).

Por otro lado, una característica importante del género *Scedosporium*, y especialmente de *S. prolificans* es la elevada resistencia que presenta a una amplia gama de antifúngicos. La mayoría de estudios publicados al respecto sobre pruebas realizadas *in vitro*, utilizando antifúngicos tradicionales (anfotericina B, fluconazol) o más recientes (voriconazol), muestran una alta resistencia en casi todas las cepas estudiadas (Cortez *et al.* 2008). Con el uso del antifúngico voriconazol se obtuvieron resultados interesantes. Este antifúngico mostró una concentración mínima inhibitoria 50 (MIC₅₀) de 4 µg/ml, aunque este valor excede la concentración utilizable a nivel clínico en la mayoría de los pacientes. El resto de los antifúngicos probados (azoles, polienos, alilaminas, pirimidinas y equinocandinas) no mostraron ningún efecto sobre los hongos.

Debido a la baja eficacia de los agentes antifúngicos por separado se iniciaron estudios para evaluar su efecto combinado. A pesar de la alta MIC₅₀ encontrada en ensayos utilizándolos por separado, terbinafina en combinación con itraconazol, miconazol o voriconazol reduce hasta en 16 veces los valores de MIC₅₀. Esto significa que las concentraciones utilizadas en clínica (es decir, en dosis no tóxicas) podrían

alcanzarse en combinación. Por otra parte, se observó una reducción de 4 veces para la MIC₅₀ de anfotericina B cuando se aplica junto con pentamidina. Estas situaciones revelan una relación sinérgica entre estos compuestos con respecto a su actividad antifúngica.

Los estudios *in vitro* no muestran una precisa correlación con los ensayos *in vivo*. No obstante, se acepta el hecho de que si una cepa es sensible *in vitro* no es suficiente para predecir el éxito terapéutico del tratamiento. Pero, si una cepa muestra resistencia *in vitro*, es más probable el fracaso en el tratamiento con este compuesto. Se han desarrollado varios estudios *in vivo* en modelos animales con scedosporiosis, que demuestran que las dosis de antifúngico de uso común suelen ser ineficaces contra estos hongos. Sin embargo, dosis mayores de anfotericina B y caspofungina reducen la mortalidad en un 60% y un 30%, respectivamente.

Por lo tanto, el tratamiento para scedosporiosis es bastante complicado. Actualmente, las infecciones localizadas en pacientes inmunocompetentes no requieren terapia antifúngica, ya que la posibilidad de que el hongo en estos pacientes produzca una invasión sistémica es remota. En general, la supervivencia del paciente se asocia con el estado de su sistema inmunitario, siendo una prioridad tratar de invertir la inmunosupresión tan pronto como sea posible. En cuanto al tratamiento de scedosporiosis diseminada en pacientes inmunocomprometidos, se recomienda el voriconazol combinado a menudo con otros antifúngicos como terbinafina o posaconazol (Cortez *et al.*, 2008).

Algunos autores sugieren que las especies de *Pseudallescheria* y *Scedosporium* prefieren entornos afectados por actividades humanas, tales como suelos agrícolas, jardines, alcantarillado, estanques contaminados y sedimentos. Además, la contaminación del suelo con hidrocarburos está relacionada con la presencia de estos hongos (Guarro *et al.*, 2006). Existen cepas de *P. boydii* que son capaces de usar gas natural (Davies *et al.*, 1973) y los compuestos aromáticos como fuente de carbono (García-Peña *et al.*, 2001). Se ha observado crecimiento a presiones parciales de oxígeno muy bajas, así como tolerancia a una concentración del 5% de NaCl en el medio de cultivo (de Hoog *et al.*, 1994). Kaltseis *et al.* (2009) encontraron una

correlación positiva entre la concentración de amonio y la abundancia de cepas de los géneros *Scedosporium* en áreas industriales y parques y juegos infantiles.

La especie *P. boydii* ha sido aislada de agua salobre y salada, tanto en estuarios (Kirk, 1967), como en áreas de subida y bajada de mareas, y en el suelo marino (Dabrowa *et al.*, 1964) (Padhye *et al.*, 1967). A partir de estos informes, se ha considerado que el nicho ecológico de *P. boydii* y *S. prolificans* han de ser hábitats ricos en nutrientes y pobremente aireados. Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido publicados antes de la diversidad taxonómica observada recientemente en los géneros *Pseudallescheria* y *Scedosporium* (Kaltseis *et al.*, 2009).

3. Objetivo:

El objetivo del proyecto es realizar un estudio de la distribución ambiental de los hongos del Género *Scedosporium* en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), aislando e identificando las diferentes especies mediante cultivo microbiológico y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4. **Materiales y métodos:**

4.1. **Realización del muestreo.**

Se tomaron muestras de suelo en las tres provincias de la CAPV en dos entornos diferentes: playas y jardines urbanos según la metodología descrita en Kaltseis *et al.* (2009) tanto para la toma de muestras como para el procesamiento de las mismas. Las muestras fueron tomadas a nivel superficial en tubos estériles de 50 ml, con la ayuda de una espátula. Tras esto, se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

El muestreo de cada entorno consta de cuatro replicas. En Bizkaia se tomaron muestras en las playas de Getxo, Sopelana y Muskiz y en el parque de Doña Casilda. En Gipuzkoa se muestrearon las playas de Donosita (La Concha) y Zumaia. En Araba se obtuvieron muestras del jardín de La Florida (Vitoria).

4.2. **Aislamiento de especies del Género *Scedosporium* mediante el medio semi-selectivo SceSel+.**

El aislamiento de especies del género *Scedosporium* se realizó en el medio semi-selectivo *Scedosporium* Selective Agar con benomyl (SceSel+) (Rainer *et al.*, 2007) (**Tabla 1**).

Tabla 1: Composición detallada del medio SceSel+ (Rainer *et al.*, 2007).

Compuesto	Concentración
Extracto de malta	6,25 g/l
Maltosa	6,25 g/l
Fosfato monopotásico	1,25 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Sulfato de Magnesio (7H ₂ O)	0,625 g/l
Peptona de soja	0,625 g/l
Agar	20 g/l
Agua destilada	983 ml
Cloramfenicol	0,1 g/l (diluido en 5 ml de etanol al 96 %)
Ciprofloxacina	0,1 g/l (diluido en 1 ml 1M NaOH y esterilizar por filtración)
Sulfato de estreptomicina	0,1 g/l (diluido en 5 ml H ₂ O destilada esterilizada por filtración)
Dicloran	0,002 g/l (diluido en 1ml de etanol puro)
Benomyl	0,006 g/l (diluido en 5 ml etanol puro)

Para ello, se pesaron 10 g de cada muestra, y se incubaron durante 1h a 37 °C en 40 ml de solución salina estéril (0,9 % NaCl/0,01% Tween 80). Se inocularon 10 placas de medio semi-selectivo SceSel+ por cada muestra con 250 µL de la suspensión. Tras la incubación de las placas 7 días a 37°C, se procedió al recuento de unidades formadoras de colonias y al aislamiento, de nuevo en SceSel+, de una colonia de cada fenotipo observado para su posterior identificación.

4.3. Identificación microscópica a nivel de género.

Una vez aisladas las colonias se realizaron preparaciones utilizando la tinción de Azul de Algodón Lactofenol (LAA) para visualizar microscópicamente los hongos. En caso de que presentasen morfologías características de las especies del género bajo estudio (Cortez *et al.*, 2008), tales como la morfología de las células conidiógenas y de los conidios, se procedió a su identificación a nivel de especie.

4.4. Identificación a nivel de especie por PCR.

4.4.1. Obtención de conidios.

Se sembraron las colonias de los aislamientos en SceSel+ en Agar Patata Dextrosa (APD) (Provadisa, Madrid, España) e incubaron durante 7 días a 37°C para obtener conidios aislados. Se cosecharon los conidios de los aislamientos con solución salina estéril según el siguiente procedimiento: se vierte solución salina estéril sobre la placa y se frota las colonias con un asa de siembra. Se recoge la suspensión en tubos y se filtra con una gasa, introducida dentro de una jeringuilla, autoclavadas previamente. Todo el proceso se realiza manteniendo condiciones asépticas. La suspensión de conidios se conservó a 4°C.

4.4.2. Obtención de micelio.

Se inoculó 1 ml de cada extracto de conidios en matraces con 50 ml de Caldo Sabouraud. (Panreac, Barcelona, España). Tras 24 h de crecimiento a 37°C, se obtuvieron los micelios de las diferentes colonias aisladas mediante centrifugación a 2500 r.p.m durante 10-15 min en tubos de 50 ml. Se eliminó el sobrenadante y las células se conservaron a 4°C.

4.4.3. Extracción de ADN.

La extracción de ADN a partir de los micelios obtenidos se realizó siguiendo el procedimiento expuesto por Liu *et. al* (2000). Se realizaron dos lavados de las pastillas de células con solución salina estéril. Se añadieron 150-200 mg de bolitas de cristal a un eppendorf con la pastilla y 500 μ L de tampón de lisis y se agitó durante 2 min en el vortex. Tras esto, se añadieron 50 μ L de solución de acetato potásico (3 M acetato potásico/11,5% ácido acético glacial) y se centrifugó a 8000 g durante 5 min. Se traspasó el sobrenadante con el ADN disuelto a otro eppendorf y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. Posteriormente, se añadió un volumen de isopropanol frío y se precipitó el ADN centrifugando a 14000 g 15 min. Descartando el sobrenadante se hizo un lavado de la pastilla de DNA con 300 μ L de etanol frío, y se volvió a centrifugar a 14000 g 10 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol unos 10-15 min. Finalmente se resuspendió la pastilla de ADN en 50 μ L de agua destilada estéril y se conservó a -20°C. La cuantificación de ADN se realizó mediante espectrofotometría a 260 nm.

4.4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La identificación de las colonias a nivel de especie se realizó mediante PCR. En la PCR se emplearon cebadores específicos para las especies *P. boydii* / *S. apiospermum*, *S. prolificans*, *P. minutispora*, *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* (Harun *et al.*, 2011). Los cebadores amplifican las regiones desaminadas ITS en todos los casos. Sin embargo, el tamaño del amplicón difiere según la especie (**Tabla 2**).

Tabla 2: Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR y el tamaño de los fragmentos que amplifican (Harun *et al.*, 2011).

Especie	Secuencia de cebadores	Tamaño del amplificado
<i>P. boydii</i> / <i>S. apiospermum</i>	5'AGGCCTGCCGTCAAACCACCTAAC 3' 5'CTACTCGACTCGTCAAGGAGC 3'	300
<i>S. prolificans</i>	5' CATTACCGAGTTATTACTCCAAACC 3' 5'TCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTGT 3'	180
<i>P. minutispora</i>	5' CTCTGTTTCGTTAGCGAAAGCTCAG 3' 5'CTACTCGACTCGTCAAGGAGC 3'	450
<i>S. aurantiacum</i>	5' TAGCGGATTACAAGCTCTGATTG 3' 5' CTACTCGACTCGTCAAGGAGC 3'	650
<i>S. dehoogii</i> .	5' CGCCCCGAAAGGACGACGGC 3' 5' CTACTCGACTCGTCAAGGAGC 3'	700

El volumen final del tubo de reacción fue de 25 μ L. De los cuales 12,5 μ L eran de GoTaq Mastermix (Biotech Iberica, Madrid, España) que contenía 1,5 mM de $MgCl_2$, 1,25 U de Taq polimerasa, 0,2 mM de dNTPs y buffer (10 mM de Tris-HCl, 50mM KCl). Además, la mezcla de reacción contenía 0,4 mM de cada primer, 50 ng DNA y H_2O .

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: predesnaturalización durante 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, anillamiento 65 °C durante 45 s y extensión a 72°C durante 60 s, con una extensión adicional de 10 min a 72°C. Como control positivo se utilizaron las cepas: *S. apiospermum* UPV 93-251, *S. prolificans* UPV 99-059, *P. minutispora* CBS 116911, *S. aurantiacum* CBS 116910, *S. dehoogii* CBS 117406. Y como control negativo tubos de reacción sin DNA.

Los productos de PCR se separan en geles de agarosa 1% en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X teñidos con GelRed (Biotium, Hayward, USA) y se visualizan mediante un transiluminador UV. Como marcadores se emplearon los 1 kb DNA Ladder RTU (Nippon Genetics, Dueren, Alemania) (**Figura 1**).

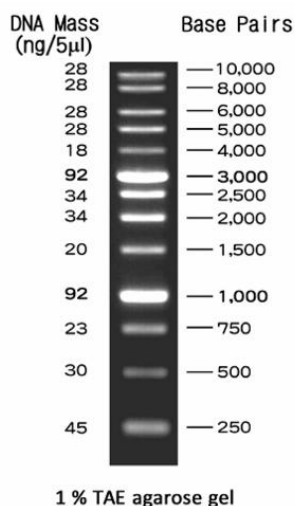


Figura 1: Detalle del tamaño de los marcadores que se utilizaron en el estudio, los 1 kb DNA Ladder RTU (Nippon Genetics, Dueren, Alemania).

5. **Resultados:**

El estudio macroscópico y microscópico del género *Scedosporium/Pseudallescheria* dio como resultado colonias pilosas y algodonosas, de coloraciones blanquecinas en su parte superior y con tonos marronaceos o grisáceos en la parte inferior. Los conidios tienen forma de limón, y se observan aislados o formando agregados según las especies (**Figura 2**).

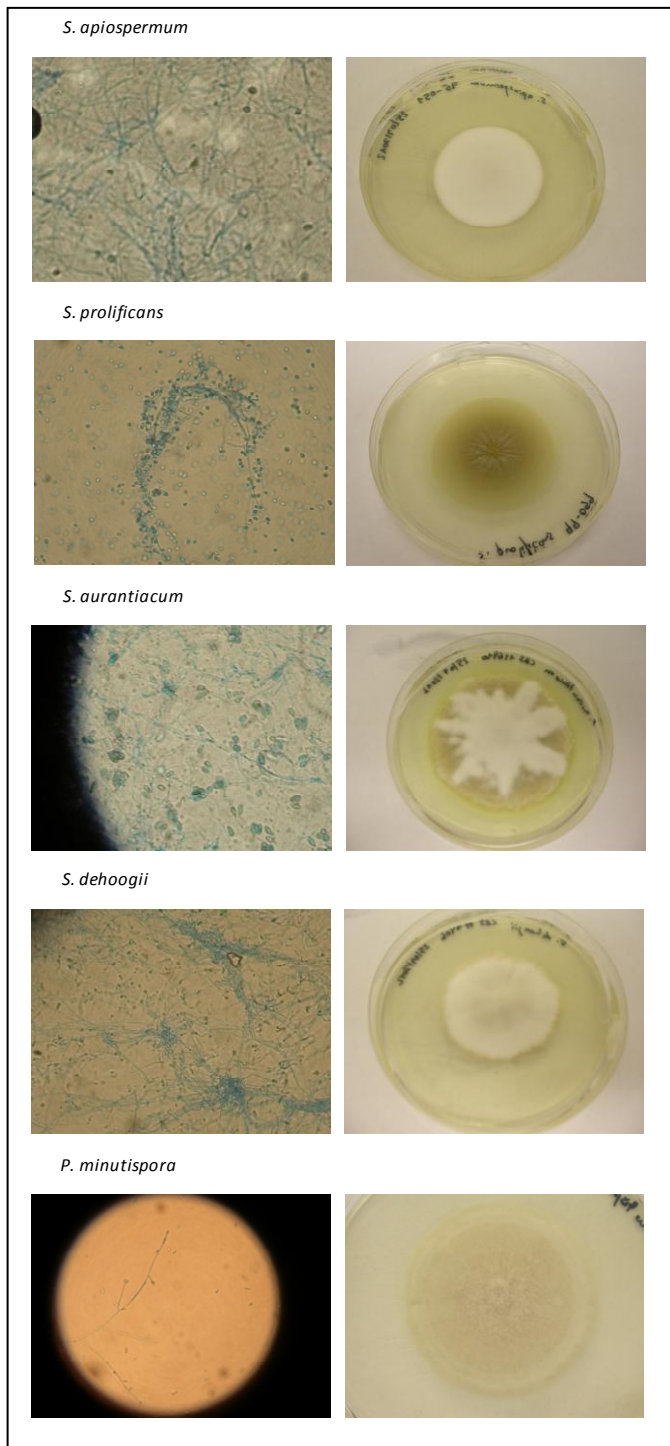


Figura 2: Imágenes microscópicas con tinción Azul de Algodón Lactofenol (izquierda) y macroscópicas de las colonias de las cepas control del género *Scedosporium* creciendo en Agar Patata Dextrosa (derecha).

En el aislamiento inicial de las muestras en medio SceSel+ se observaron colonias que presentaban estas características pero también colonias pertenecientes a otros grupos no esperados: levaduras, *Zygomycetes*, etc. La visualización de dichas colonias al microscopio confirmó los resultados con la presencia de elementos característicos de otros géneros (**Figura 3**).

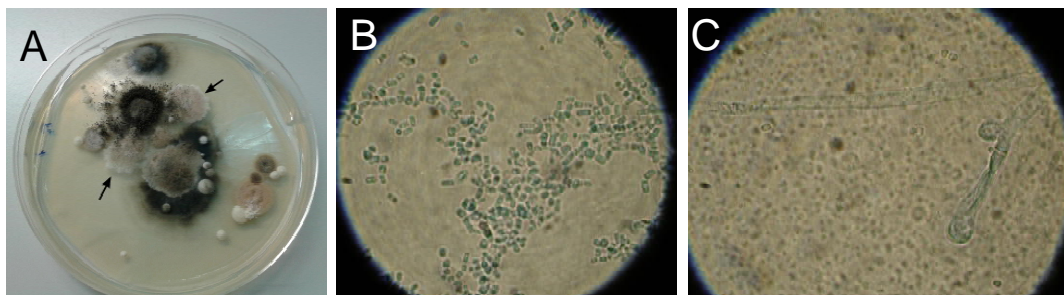


Figura 3: A) Ejemplo de un aislamiento obtenido en SceSel+ a partir de las muestras ambientales. Las colonias señaladas con flechas son ejemplos con aspecto típico del género *Scedosporium*. B) Observación al microscopio de artrosporas. C) Observación al microscopio de cuerpos fructíferos característicos de *Zygomycetes*.

El recuento de colonias totales aisladas en el medio selectivo SceSel+ a partir de las muestras de playa dio como resultado valores muy bajos. En todos los casos el valor fue inferior a 1,5 unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g), llegando a ser 0 en la playa de Muskiz (Bizkaia). Cabe destacar, tal y como se observa en la **figura 4**, que su visualización al microscopio reveló que ninguna pertenecía al género *Scedosporium*.

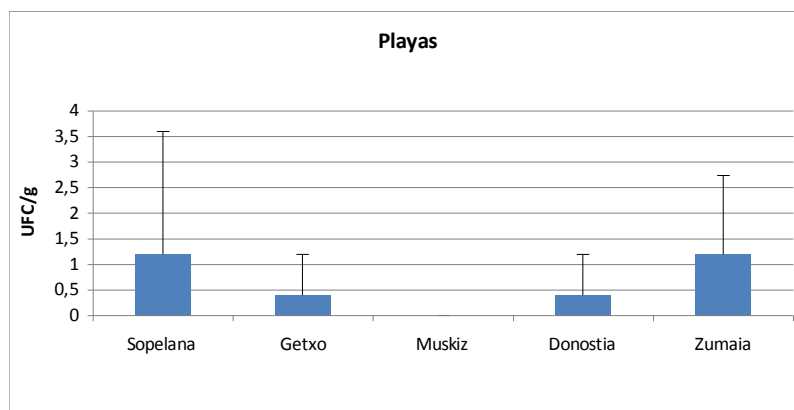


Figura 4: Recuento total de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra en las muestras obtenidas a partir de las playas de Sopelana, Getxo, Muskiz (Bizkaia) y Donostia y Zumaia (Gipuzkoa).

El recuento de las colonias totales desarrolladas sobre las placas a partir de las muestras de jardines tanto de Vitoria como Bilbao dieron valores más elevados en comparación con los obtenidos a partir de las muestras de playas. Se obtuvieron en este caso unos valores de 148 UFC/g en el caso de La Florida (Vitoria) y 1106 UFC/g en Doña Casilda (Bilbao). Por tanto, la cantidad de UFC/g de muestra es un orden superior en el jardín de Bilbao que en el de Vitoria (**Figura 5**).

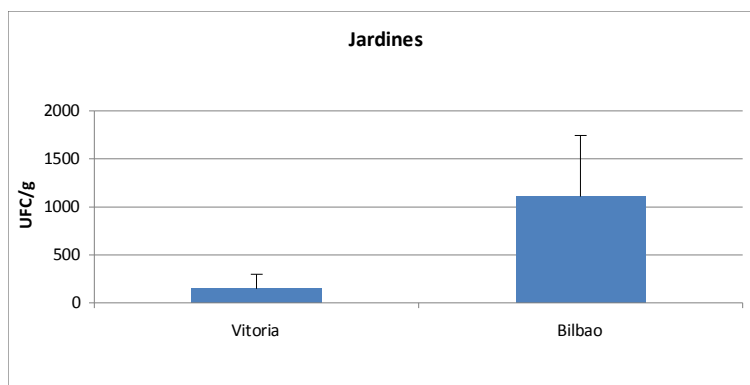


Figura 5: Recuento total de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra en las muestras obtenidas a partir de los jardines de La Florida (Vitoria) y Doña Casilda (Bilbao).

La identificación a nivel de especie mediante PCR ofreció resultados para las especies *S. aurantiacum*, *S. prolificans*, *S. dehoogii*, y *P. minutispora*. Sin embargo, no fue posible determinar la presencia de *S. apiospermum* en las muestras. Los resultados del procedimiento llevado a cabo con la especie *S. apiospermum* daba resultados positivos en casi todos los casos. Por ello han sido desestimados (**Figuras 6 y 7**).

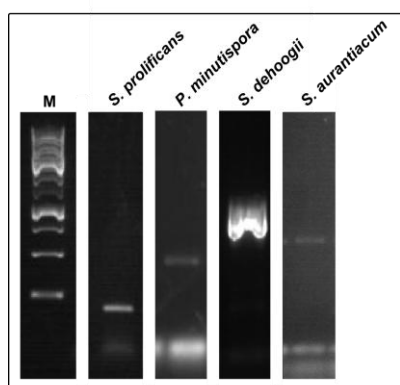


Figura 6: Ejemplos representativos de resultados obtenidos a partir de muestras ambientales con resultados positivos para los amplificadores correspondientes a *S. aurantiacum*, *S. prolificans*, *S. dehoogii* y *P. minutispora*.

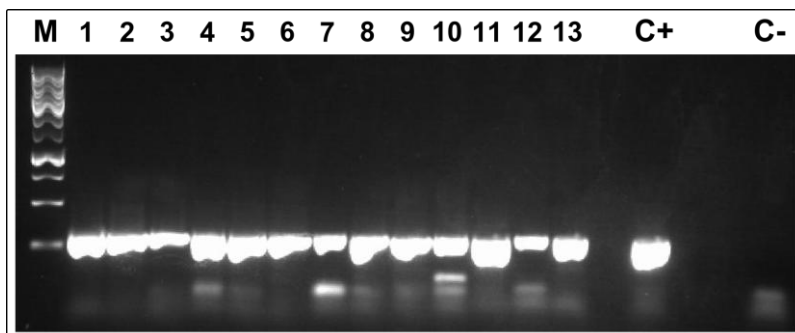


Figura 7: Resultado de la PCR empleando los cebadores específicos de *S. apiospermum*. La primera calle pertenece a los marcadores empleados 1 kb DNA Ladder RTU (Nippon Genetics, Dueren, Alemania), de la 1 a la 13 son ejemplos de especies aisladas a partir de las muestras ambientales y las otras dos calles pertenecen al control positivo (C+) y al control negativo (C-). De las especies ilustradas como ejemplo la 2, 6 y 13 dieron positivo en su identificación con los cebadores específicos para otras especies.

En las muestras del parque Doña Casilda solo se obtuvieron resultados positivos para la especie *S. aurantiacum*. En las muestras del jardín La Florida, en cambio, aparecieron también colonias de *S. dehoogii*, *S. prolificans* y *P. minutispora*. En conjunto, la presencia del género *Scedosporium* es superior en la muestras de Vitoria que en las de Bilbao (**Figura 8**).

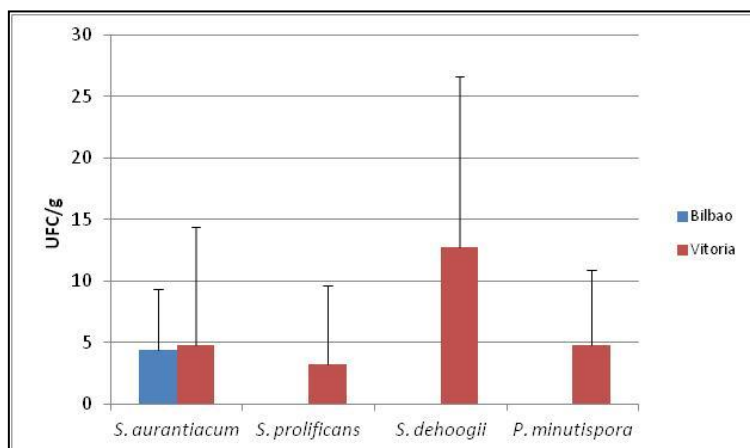


Figura 8: Resultados de la identificación de especies mediante PCR. Se detalla el número de unidades formadoras de colonias por gramo en las muestras obtenidas de cada especie en las muestras de La Florida (Vitoria) y Doña Casilda (Bilbao).

6. Discusión

El género *Scedosporium* se distribuye principalmente en ambientes humanizados y posee especies clínicamente importantes, como *S. apiospermum*, *S. aurantiacum*, y *S. prolificans*. Por esto, se ha realizado un muestreo ambiental para determinar su presencia en la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV). Para ello se ha empleado el medio semi-selectivo SceSel+ y la técnica de PCR con cebadores específicos para cinco especies del género.

Rainer *et al.*, (2007) afirman que el medio SceSel+ es selectivo para el género *Scedosporium*. La composición del medio en cuanto a compuestos nutricionales, los antibióticos y las condiciones de incubación impiden, según sus autores, el crecimiento de otras especies. Además, se ha empleado en trabajos posteriores con muestras ambientales con resultados exitosos (Kaltseis *et al.*, 2009). Sin embargo, en el estudio realizado se ha comprobado el crecimiento de otros grupos como *Zygomycetes* cuyo crecimiento debería estar inhibido por la adicción al medio del antibiótico dicloran.

Teniendo en cuenta que debido al aumento del número de pacientes inmunocomprometidos estos hongos son cada vez más prevalentes, sería de gran interés disponer de un medio realmente selectivo para este género de patógenos emergentes que pudiera ser usado tanto para muestras clínicas como ambientales.

Por otro lado, las especies del género *Scedosporium* se han vinculado a ambientes afectados por la actividad del ser humano, tales como zonas agrícolas, zonas industriales, parques urbanos, etc. Sin embargo, la presencia de estos hongos filamentosos en ambientes menos contaminados es muy baja e incluso nula. Por ello, este estudio está centrado en entornos fuertemente humanizados (Kaltseis *et al.*, 2009).

Los hongos tienen predilección por ambientes húmedos. Aun así, debido a la importancia y la actividad existente en el litoral de la CAPV se consideró necesario incluir playas en el muestreo. De Hoog *et al.* (1994) indican la tolerancia del género a una concentración del 5% de NaCl en el medio de cultivo. Pese a ello, en el estudio que se ha realizado de la distribución del género en la CAPV no ha sido posible confirmar dichos datos puesto que no se han encontrado unidades formadoras de colonias (UFC) de ninguna especie *Scedosporium* en las playas de Bizkaia ni de Gipuzkoa. La ausencia

de especies del género *Scedosporium* en las muestras analizadas puede deberse a diferentes factores que no han sido analizados.

No obstante, si fue posible demostrar la presencia de las especies *Scedosporium* en los parques de la CAPV. Se analizaron muestras en los parques Doña Casilda (Bilbao) y La Florida (Vitoria) encontrándose grandes diferencias entre ellos respecto al número de UFC/g de muestra. Se obtuvo un recuento total de UFC/g en las muestras de Doña Casilda superiores a los del parque La Florida, siendo la media diez veces mayor en el primero que en el último. Las posibles causas de ésta diferencia son diversas, pudiendo ser importantes las características físico-químicas del hábitat. *Scedosporium spp.* se han relacionado con determinados ambientes físico-químicos como zonas con altos contenidos en materia orgánica e incluso suelos contaminados con hidrocarburos (Guarro et al., 2006). Además, Kaltseis et al. (2009) describieron una correlación positiva entre el contenido de amonio y la cantidad de especies del género. En cambio, la presencia de estos hongos se correlaciona de forma negativa con el pH del suelo.

Una vez procesadas las muestras ambientales se seleccionaron aquellas colonias cuyas características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas, eran similares a las del género bajo estudio. Para llevar a cabo su identificación se realizaron pruebas de PCR utilizando cebadores específicos para cada especie. Sorprendentemente, a pesar de que el número de UFC totales que crecieron en el medio semi-selectivo SceSel+ presentaban valores superiores en Doña Casilda que en La Florida, se encontró mayor variedad de especies del género *Scedosporium* en el parque La Florida. Esto sugiere que éste entorno posee unas condiciones más favorables para el desarrollo de las mismas. En éste parque se identificaron UFC de las especies *S. prolificans*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii* y *P. minutispora*, mientras que en Doña Casilda solo se consiguió identificar la especie *S. aurantiacum*.

Por otro lado, los resultados para la especie *S. apiospermum* demostraron la existencia de un error en la metodología. Puesto que el procedimiento se ha realizado siempre en condiciones de asepsia y los controles negativos están libres de amplificación se deduce que el problema debe estar en la especificidad de los cebadores. Harun et al. (2011) diseñaron unos cebadores específicos basándose solamente en dos cepas de cada especie. Además, se trata de un estudio realizado exclusivamente con

cepas clínicas. Aplicando el procedimiento a muestras ambientales, donde se pudieron encontrar un rango más amplio de especies y de cepas de *Scedosporium spp.* se ha demostrado que los cebadores no son específicos, y no son útiles para la identificación de la especie *S. apiospermum*.

Para concluir, se ha detectado la presencia de especies pertenecientes al género *Scedosporium* en la CAPV. Sería interesante disponer de un medio selectivo para *Scedosporium spp.*, eficiente tanto para muestras clínicas como para ambientales, y poseer un sistema de identificación a nivel de especie para *S. apiospermum*. Por otro lado, realizar un análisis de los parámetros físico-químicos de los ambientes susceptibles de albergar especies de este género podría ayudar a profundizar en el conocimiento general del género y su distribución.

7. **Bibliografía.**

- Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, Rinaldi MG, Shea YR, Zaoutis T, Kottitil S, Walsh TJ. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21:157-97.
- Dabrowa N, Landau JW, Newcomer VD, Plunkett OA. A survey of tide-washed coastal areas of Southern California for fungi potentially pathogenic to man. *Mycopathologia* 1964; 24: 136 150.
- Davies JS, Wellman A, Zajic JE. Hyphomycetes utilizing natural gas. *Can J Microbiol* 1973; 19: 81 85.
- de Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, et al. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria, boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* 1994; 37: 223 224.
- García-Peña EI, Hernández S, Favela-Torres E, Auria R, Revah S. Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnol Bioeng* 2001; 76: 61 69.
- Gilgado F, Cano J, Gene J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10):4930-42.
- Gilgado F, Cano J, Gene J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and Phenotypic Data Supporting Distinct Species Statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the Proposed New Species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:2,766–771.
- Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre´ R, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol* 2006; 44: 295 327.
- Harun A, Blyth CC, Gilgado F, Middleton P, Chen SC, Meyer W. Development and validation of a multiplex PCR for detection of *Scedosporium* spp. in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2011; 49(4):1508-12.
- Idigoras P, Pérez-Trallero E, Piñeiro L, Larruskain J, López-Lopategui MC, Rodríguez N, González JM. Disseminated infection and colonization by *Scedosporium prolificans*: a review of 18 cases, 1990-1999. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:158-65.

- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. *Universitat Rovira I Virgili*; 2000; 305-309, 899-901.
- Kaltseis, J, Rainer, J and de Hoog, GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in humandominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol*. 2009; 47:4,398-405.
- Kirk PW. A comparison of saline tolerance and sporulation in marine and clinical isolates of *Allescheria boydii* Shear. *Mycopathologia* 1967; 33: 65-75.
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pederson J. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38, 471.
- López L, Gaztelurrutia L, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Barrón J, Hernández JL, Pérez R. Infection and colonization by *Scedosporium prolificans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2001; 19:308-13.
- Padhye AA, Pawar VH, Sukapure RS, Thirumalachar MJ. Keratinophilic fungi from marine soils of Bombay, India. *Hindustan Antibiot Bull* 1967; 10: 138-141.
- Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Anton Leeuw*. 2007; 93:315–322.