



Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp mediante técnicas moleculares en Colombia.

Yesid Fabián Acevedo-Granados¹, Luz Elena Cano², Adelaida María Gaviria-Rivera¹.

¹. Grupo de Sistemática Molecular, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia.

².Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

RESUMEN

Fusarium es un género fúngico amplio y diverso de diferentes complejos de especies, causante de una gran variedad de enfermedades en plantas, productor de diversas toxinas y representa un importante patógeno oportunista en humanos. La identificación de las especies de *Fusarium* ha sido por mucho tiempo una tarea compleja y controversial. Esto es debido principalmente a la aplicación de diferentes sistemas taxonómicos y la inherente variabilidad morfológica de algunas de estas especies. Estas características requieren de la revisión por parte de un experto micólogo, con el fin de lograr un acertado y confiable diagnóstico, el cual es crucial en el manejo de enfermedades o infecciones y estudios de diversidad genética. En Colombia, se ha reportado un incremento anual del 317 % de casos de infecciones causadas por *Fusarium*, entre 1995 y 2003, sin embargo en centros especializados a nivel nacional en micología médica, no se lleva a cabo un diagnóstico a nivel de especie. El objetivo de este estudio fue el de establecer la identidad de aislamientos clínicos de *Fusarium*, mediante el uso de un marcador molecular. Para lograr este objetivo se llevó a cabo la identificación de los 59 aislamientos mediante consulta en la base de datos Fusarium-ID con base en secuencias codificantes del factor de elongación de la traducción EF-1 α . Los resultados obtenidos permitieron observar la agrupación de los 59 aislamientos en tres complejos de especies: *Fusarium oxysporum* (FOSC), *Fusarium solani* (FSSC) y *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC). Basado en los resultados, se observa que el uso de las secuencias codificantes para el factor de elongación de traducción permiten una confiable clasificación de los aislamientos de origen clínico y permite ratificar la utilidad que posee este marcador molecular en los distintos complejos de *Fusarium*.

Palabras Clave: EF-1 α , Complejos de especie, Infección fúngica, Fusarium-ID.



Identification of clinical isolates of *Fusarium* spp by molecular methods in Colombia

ABSTRACT:

Fungal genus *Fusarium* is a large and diverse species of different complexes, causing a variety of diseases in plants, producing various toxins and represents an important opportunistic pathogen in humans. Identification of *Fusarium* species has long been a complex and controversial. This is mainly due to the application of different taxonomic and morphological variability inherent to some of these species. These features require review by an expert mycologist, in order to achieve an accurate and reliable diagnosis, which is crucial in the management of diseases or infections and genetic diversity studies. In Colombia, the Medical Mycology Laboratory, Faculty of Medicine, University of Antioquia has reported an annual increase of 211% of cases of infections caused by *Fusarium*, between 1990 and 2000 and the Medical Mycology Unit and Experimental Corporation Biological Research (CIB) of 317 % between 1995 (29 isolates) and 2003 (92 isolates), however in such centers nationwide in medical mycology, not carried out a diagnostic at the species level . The objective of this study was to establish the identity of clinical isolates of *Fusarium*, by using a molecular marker. To achieve this goal was conducted to identify the 59 isolates by consulting the database Fusarium -ID based on the coding sequences of elongation factor EF- 1 α translation. The results allowed us to observe the grouping of the 59 isolates into three species complexes: *Fusarium oxysporum* (FOSC), *Fusarium solani* (FSSC) and *Fusarium incarnanatum - equiseti* (FIESC). Based on the results, it appears that the use of coding sequences for translation elongation factor permit reliable classification from clinical isolates and can confirm the usefulness of this marker has different molecular complexes on *Fusarium*.

Keywords: EF-1 α , Complex of species, Fungal infection, Fusarium-ID.

*Para citar este artículo: Acevedo-Granados YF, Cano LE, Adelaida María Gaviria-Rivera AM. Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp mediante técnicas moleculares en Colombia. Bistua.2014.12(1):143-159

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Gaviria-Rivera A.M.. Grupo de Sistemática Molecular, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia email: amgavirr@unal.edu.co

Recibido: Noviembre 05 de 2013 Aceptado: Mayo 16 de 2014

144

Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2014 .12 (1):143-159. Acevedo-Granados Y F¹ , Cano L E² , Gaviria-Rivera A M¹. Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp mediante técnicas moleculares en Colombia.



INTRODUCCION

Fusarium es uno de los géneros fúngicos más importantes a nivel mundial por su patogenicidad a plantas, humanos y animales y la producción de toxinas. Las especies de este género durante años recientes han aumentado su implicación en enfermedades en humanos y hoy en día representan la segunda causa de infecciones fúngicas invasivas en humanos con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Alastruey-Izquierdo *et al.* 2008). El espectro de infecciones pueden ser desde tipo superficial (onicomicosis y queratitis), invasivas locales, hasta diseminadas; estas últimas se presentan exclusivamente en pacientes severamente inmunocomprometidos (Guilhermetti *et al.* 2007). De igual manera especies de *Fusarium* también pueden causar enfermedades alérgicas como es la sinusitis en individuos inmunocompetentes (Nucci y Anaissie, 2007).

La taxonomía de *Fusarium* es muy compleja y ha sufrido varios cambios (Llorens *et al.* 2006). En especial las secuencias de ADN de varios loci han permitido establecer varios complejos de especies, como: *F. solani* (FSSC), *F. oxysporum* (FOSC), *F. incarnatum-equiseti* (FIESC), *F. chlamydosporum* (FCSC), *F. tricinctum* (FTSC), *F. dimerum* (FDSC) y *Gibberella fujikuroi* (GFSC) (O'Donnell *et al.* 2010e, Park *et al.* 2011). Actualmente es aceptado

que los taxones que anteriormente se pensaba representaban como especies, actualmente son complejos de especies. (Kvas *et al.* 2009).

La identificación precisa y rápida de la especies de *Fusarium* es crítica para predecir el potencial patógeno de dichos aislamientos y administrar el mejor tratamiento (Alastruey-Izquierdo *et al.* 2008, Landlinger *et al.* 2009, Sampietro *et al.* 2010). Los métodos moleculares que se fundamentan en la comparación de secuencias de ADN son actualmente los más utilizados para el estudio de genética de poblaciones, taxonomía, filogenia y sistemática de *Fusarium*. La secuenciación de múltiples loci, como el factor de elongación de la traducción 1 α (EF-1 α , TEF), una región de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2), la topoisomerasa II y las regiones ITS del ADN ribosomal se han utilizado para sistemática molecular (Balajee *et al.* 2009).

Genes codificantes de proteínas, con numerosas porciones intrónicas, se consideran potenciales marcadores en estudios taxonómicos a nivel de especie en hongos, dado que estos tienden a variar a altas tasas en comparación con los marcadores utilizados comúnmente como el ITS y las regiones del ARN ribosomal nuclear (Harrow *et al.* 2010). El gen EF-1 α ha mostrado una alta señal taxonómica para todos los complejos de especies del género (FSSC,



FOSC, FIESC, FCSC, FTSC, FDSC y GFSC) (O'Donnell *et al.* 2009d).

Solo los genes EF-1 α y RPB2 tienen un adecuado nivel de resolución y han demostrado un alto grado de concordancia en sus resultados al ser usados de forma individual y conjunta (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz 2003, Balajee *et al.* 2009). Por todo lo anterior los genes EF-1 α y RPB2 fueron utilizados para estudiar la taxonomía de aislamientos clínicos de *Fusarium* provenientes de diferentes pacientes de la población del Valle de Aburra (Antioquia).

Metodología.

Aislamiento de Cepas.

Los aislamientos de *Fusarium* fueron obtenidos a partir de 59 personas que acudieron al laboratorio de Micología Médica y Experimental (MME) de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) entre los años 2004 y 2006. Las muestras fueron obtenidas a partir de uñas de manos y pies, córnea, piel, abdomen y fueron sembradas en agar Saboraud, PDA y Mycosel, e incubadas a 25°C entre 1 y 3 semanas. La confirmación de la identidad de cada aislamiento como perteneciente al género *Fusarium* por descripción de las características morfológicas y por detección molecular fue llevada a

cabo por Giraldo D. en 2010 (Giraldo 2010).

Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN por el método de Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico descrito previamente por Sambrook y Russell (2001). Posterior a la extracción, el ADN se resuspendió en 40 μ L de agua estéril, se cuantificó a 260nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific) y se cualificó mediante electroforesis en gel de Agarosa al 2% teñido con 5 μ l de Bromuro de Etidio 0.5 μ g/ml en Buffer TBE 1.0 X a 70 V por una hora. Después de conocer la concentración de ADN se hizo la correspondiente dilución con el fin de tener una concentración de 25 ng/ μ l de ADN para todas las cepas.

Amplificación por PCR del gen EF-1 α .

La amplificación del fragmento de 716 pb del gen que codifica para el factor de elongación de la traducción EF-1 α se hizo con el par de oligonucleótidos ef1H y ef2T (Tabla 1) (O'Donnell *et al.* 2008c), bajo las siguientes condiciones: una etapa de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 57°C por 1 min y extensión a 72°C por 1min, por último una etapa de extensión a 72°C por 10 min (O'Donnell *et al.* 2008c).



147

Las condiciones de las mezclas de PCR para cada fragmento se detallan en la Tabla 2. Como control negativo se utilizó la misma mezcla para la PCR pero sin ADN. Cepas de referencia de *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* se utilizaron como control positivo. Los productos finales de la amplificación fueron purificados con el kit de Qiagen, siguiendo las indicaciones del fabricante y mantenidos a -20°C hasta el momento de su secuenciación.

Electroforesis, procesamiento y análisis de imágenes

Todos los productos de PCR amplificados fueron confirmados mediante electroforesis. De cada producto se corrió 4 μl en un gel de agarosa al 1% teñido con 5 μl de Bromuro de Etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en Buffer TBE 1.0 X a 70V por una hora. Posteriormente se observaron a través de un transiluminador de luz ultravioleta, para ser fotografiados y grabados en un computador. El tamaño de cada fragmento se determinó por comparación con el marcador de peso molecular de 100 pb Plus DNA Ladder (Fermentas®) (Sambrook y Russell 2001) (Figura 3).

Secuenciación de fragmentos de los genes EF-1 α y RPB2 de aislamientos de *Fusarium sp.*

Los productos de la amplificación por PCR del gen EF-1 α , fueron secados en una *Eppendorf Vacufuge*

Concentrator Basic, a temperatura ambiente, resuspendidos en 10 μl de agua Mili-Q y se enviaron a MacroGen® Korea para su secuenciación. Los fragmentos del gen EF-1 α fueron secuenciados con los cebadores ef3 y ef22T (Tabla 1) (O'Donnell et al., 2008c).

Edición, análisis de secuencias e identificación molecular de *Fusarium* a nivel de complejos de especies

La edición de secuencias que codifican para el factor de elongación de la traducción EF-1 α , la obtención de la secuencia consenso y alineamiento de las secuencias, se hizo con el programa BioEdit (Hall 1999). Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple con todas las secuencias de cada gen con el programa Clustal W (Larkin et al. 2007). Seguidamente se realizó un análisis BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*), de cada secuencia, en la base de datos Fusarium-ID disponible en la página web:

(<http://isolate.Fusariumdb.org/blast.php>) de la base de datos *Cyber-infrastructure for Fusarium* (CiF) con el objetivo de determinar el complejo de especie a que pertenece cada aislamiento.

Resultados.

Amplificación por PCR de los genes EF-1 α y RPB2.



La amplificación por PCR, con el juego de cebadores ef-1H y ef-2T, del fragmento de EF-1 α de 59 aislamientos de *Fusarium* dio como resultado un amplicon de aproximadamente 716 pares de bases que corresponde a la región comprendida entre el primer y cuarto (ultimo) exón del gen, el cual a su vez contiene 3 intrones (Figura 1). Los cebadores fueron diseñados mediante la comparación de las secuencias de miembros de los complejos de más representativos de *Fusarium* como son sus teleomorfos *Gibberella fujikuroi*, *G. zaeae*, y *F. solani*, y *F. oxysporum*, (O'Donnell *et al.* 2008c) (Figura 1). En el presente estudio se amplificó esta región génica a partir del ADN total de todos los 59 aislamientos estudiados.

Identificación molecular a nivel de complejo de especie de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp.

En este estudio el análisis BLAST de las secuencias del gen EF-1 α en la base de datos Fusarium-ID permitió identificar cada uno de los 59 aislamientos, 33 de estos pertenecen al complejo *F. oxysporum* (FOSC), 25 al complejo *F. solani* y un único aislamiento (56665) al complejo *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) (Tabla 3). Los resultados estadísticos referentes a valores de coincidencia exacta o de similitud absoluta (100%),

con las secuencias de aislamientos encontradas en la base de datos fue solo observada en 33 aislamientos (19 aislamientos de FOSC y catorce aislamientos de FSSC) y los 26 aislamientos restantes presentaron porcentajes de similitud por encima del 98.25%.

Consideraciones Finales-Discusión.

Identificación molecular a nivel de género y especie de aislamientos clínicos de *Fusarium*

Las regiones codificantes de proteínas, a partir de ADN nuclear, implicadas en procesos celulares vitales y altamente conservados han sido ampliamente usadas en la identificación de diferentes microorganismos; particularmente, en la identificación de especies *Fusarium* se han usado las regiones ITS, β -tubulina, Calmodulina y las regiones 28S y 5.8S del ADN ribosomal (Hennequin *et al.* 1999, Balajee *et al.* 2007, Dyavaiah *et al.* 2007).

En la actualidad las regiones más utilizadas para la identificación de *Fusarium* a nivel de especie son el gen del factor de elongación de la traducción 1 α (EF-1 α), y los genes de la segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2 y RPB1). Otras regiones también estudiadas con fines de identificación a nivel de especie incluyen, genes de apareamiento (MAT), genes que



codifican para la Celobiosa C y la Topoisomerasa II, el gen que codifica para la β -tubulina, Calmodulina, entre otros (Atkins y Clark 2004, Hatsch et al. 2004, Hinojo et al. 2004, Wilson et al. 2004, Bogale et al. 2006, Dyavaiah et al. 2007, Alustrey-Izquierdo et al. 2008). Esto demostrando la poca utilidad de las regiones ribosomales para la identificación de *Fusarium* a nivel de especie, ya que son demasiado conservadas y por la tanto tienen menor capacidad de resolución y ha generado taxonomías y filogenias erróneas y junto con ello el bajo grado de confiabilidad en procesos de identificación (Dyavaiah et al. 2007, Zaccardelli et al. 2008).

La identificación molecular a nivel de complejo de especies mediante análisis BLAST en la base de datos de *Fusarium-ID*, nació como respuesta a la imperante necesidad de determinar la especie de aislamientos de *Fusarium* de importancia toxigena y clínica, antes reconocidas solo por caracteres morfológicos (Geiser et al. 2004). En sus inicios esta base de datos conto únicamente con secuencias correspondientes al gen EF-1 α ; que es a la fecha el mejor marcador molecular para identificar aislamientos de *Fusarium*, pero a medida que aumentó la facilidad en los procesos de secuenciación, aumentó el número de aislamientos y el número de marcadores empleados

en la identificación, como son RPB2, RPB1, IGS, ITS1, ITS2, ADNr (Geiser et al. 2004).

Al momento de comparar las secuencias codificantes para el factor de elongación de la traducción EF-1 α de los 59 aislados de *Fusarium* sp por medio de la herramienta BLAST en la base de datos *Fusarium-ID*, se logró determinar que los aislamientos pertenecen a uno de los tres complejos de especies, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. incarnatum-equiseti*, con altos valores estadísticos de soporte (Tabla 3). La mayoría de ellos, 33, se ubicaron en el complejo FOOSC, seguido por 22 en FSSC. Estos datos, concuerdan con los reportados por Giraldo (2010) que detectó por PCR 52 y 28 aislamientos de FOOSC y FSSC, respectivamente, a partir de un total de 101 aislamientos de *Fusarium*.

Con respecto a los valores de E todas las secuencias de EF-1 α obtuvieron valores de 0, lo que indica que la posibilidad de observar cambios o múltiples coincidencias en la búsqueda es nula (Tabla 3); adicionalmente valores de similitud (*score*), revelan niveles de coincidencia de la secuencia consulta frente a las secuencias de referencia dispuestas en dicha base de datos, obteniéndose los máximos valores posibles, siendo de 999.99 y E (*Expect* = Esperado), lo cual indica la



150

posibilidad de cambio o coincidencia múltiple de secuencias, durante la búsqueda en la ya mencionada base de datos y cuyo valor máximo es 0, siendo similar para todos los aislamientos identificados, correspondiendo a valores de 999.99 y 0 respectivamente (Tabla 3). Todo lo anterior puede ser debido a la posible presencia de variantes alélicas, existencia de nuevas especies, falta de una secuencia representativa en la base de datos o a que la secuencia consultada no se encuentra bien definida o al bajo grado de resolución (Geiser *et al.* 2004), este último factor ya se ha reportado a nivel del complejo de especies FOSS (O'Donnell *et al.* 2007b).

El gen nuclear del factor de elongación de la traducción 1- α (EF-1 α), codifica una parte esencial de la maquinaria de traducción proteica, dicho gen codifica una proteína G que hace entrega del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma, durante el proceso de traducción de proteínas. La estructura primaria del EF-1 α es altamente conservada entre todos los eucariotas y procariotas, además se ha identificado como una de las proteínas de mayor abundancia en eucariotas (más del 5% del total de proteínas del citosol) (Mateyak y Kinzy 2010, Eltschinger *et al.* 2012).

La utilidad de EF-1 α se basa en que cerca del 6% de los nucleótidos que lo conforman son considerados cladísticamente significativos (39/656

nucleótidos), el 95% de estos nucleótidos se encuentran en regiones exónicas, en donde se han detectado procesos de transición de bases, lo que genera un 50% más de información que otros genes usados en *Fusarium*, tal como mtSSU, β -tubulina, Calmodulina, que le otorga un mayor nivel de confianza y utilidad (Geiser *et al.* 2004). Todo lo anterior al parecer indica que el gen EF-1 α ha estado bajo pocas restricciones evolutivas, como se deduce de los patrones de mutación que incluyen deleciones de bases (O'Donnell *et al.* 1998a, Kristensen *et al.* 2005). Otra ventaja del gen EF-1 α es que este se presenta en una única copia en el genoma de *Fusarium* (Geiser *et al.* 2004).

Agradecimientos

Posgrado Ciencias – Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y Unidad de Micología Médica y Experimental de la Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB.

Referencias

Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2008 Apr [cited 2014 Jul 17];61(4):805–9. Available from:



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18263569>
Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. J Appl Genet [Internet]. 2004 Jan;45(1):3–15. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960763>

Balajee S a, Borman a M, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? J Clin Microbiol [Internet]. 2009 Apr [cited 2014 Jul 17];47(4):877–84. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2668331&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Bogale M, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET. Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2007 Jun [cited 2014 Jul 17];271(1):27–32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17391363>

Dyavaiah M, Ramani R, Chu DS, Ritterband DC, Shah MK, Samsonoff W a, et al. Molecular characterization, biofilm analysis and experimental biofouling study of *Fusarium* isolates from recent cases of fungal keratitis in New York State. BMC Ophthalmol [Internet].

2007 Jan [cited 2014 Jul 17];7:1. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1794232&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Eltschinger S, Greganova E, Heller M, Bütikofer P, Altmann M. Eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) domain I from *S. cerevisiae* is required but not sufficient for inter-species complementation. PLoS One [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Jul 17];7(7):e42338. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3408446&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Geiser DM, del Mar Jiménez-Gasco M, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, et al. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying *Fusarium*. Eur J Plant Pathol [Internet]. 2004 Jun;110(5/6):473–9. Available from:
<http://link.springer.com/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>

Giraldo DA. Identificación morfológica y molecular a nivel de especie de aislamientos del hongo *Fusarium* obtenidos a partir de muestras clínicas. [tesis de maestría]. Medellín: Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2010



Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TIE. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *Int J Dermatol* [Internet]. 2007 Aug;46(8):822–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651164>

Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT . *Nucleic Acids Symposium Series* 42: 95-98

Harrow S a, Farrokhi-Nejad R, Pitman AR, Scott I a W, Bentley A, Hide C, et al. Characterisation of New Zealand *Fusarium* populations using a polyphasic approach differentiates the *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tricinctum* species complex in cereal and grassland systems. *Fungal Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Apr [cited 2014 Jul 17];114(4):293–311. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943139>

Hatsch D, Phalip V, Jeltsch J-M. Use of genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of *Fusarium*. *Res Microbiol* [Internet]. 2004 May [cited 2014 Jul 17];155(4):290–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142627>

152

Hennequin C, Benailly N, Silly C, Sorin M, Scheinmann P, Gaillard JL, et al. In vitro susceptibilities to amphotericin B , itraconazole , and miconazole of filamentous fungi isolated from patients with cystic fibrosis . *In Vitro Susceptibilities to Amphotericin B , Itraconazole , and Miconazole of Filamentous Fungi Isolated from P.* 1997;

Hinojo MJ, Llorens A, Mateo R, Patiño B, González-Jaén MT, Jiménez M. Utility of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms of the intergenic spacer region of the rDNA for characterizing *Gibberella fujikuroi* isolates. *Syst Appl Microbiol* [Internet]. 2004 Nov;27(6):681–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15612625>

Jiménez-Gasco, Jiménez-Díaz. Development of a Specific Polymerase Chain Reaction-Based Assay for the Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and Its Pathogenic Races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* 93: 200-209. 2003.

Kristensen R, Torp M, Kosiak B, Holst-Jensen A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycol Res* [Internet]. 2005 Feb [cited 2014 Jul 17];109(2):173–86. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756208613945>

Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Basicas. 2014 .12 (1):143-159. Acevedo-Granados Y F¹ , Cano L E² , Gaviria-Rivera A M¹. Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp mediante técnicas moleculares en Colombia.



Kvas M, Marasas W, Wingfield B, Wingfield M, Steenkamp E. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34: 1-21. 2009

Landlinger C, Basková L, Preuner S, Willinger B, Buchta V, Lion T. Identification of fungal species by fragment length analysis of the internally transcribed spacer 2 region. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 Jul 17];28(6):613–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104852>

Larkin M a, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan P a, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2014 Jul 9];23(21):2947–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17846036>

2005 and 2006 Phylogenetic Diversity and Microsphere Array-Based Geno. 2007.

O'Donnell K, Sutton D a, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2008 Aug [cited 2014 Jul 17];46(8):2477–90. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2519483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Llorens a, Hinojo MJ, Mateo R, González-Jaén MT, Valle-Algarra FM, Logrieco a, et al. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2006 Feb 15 [cited 2014 Jul 17];106(3):297–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246443>

Mateyak MK, Kinzy TG. eEF1A: thinking outside the ribosome. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Jul 9 [cited 2014 Jul 17];285(28):21209–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2898402&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2007 Oct [cited 2014 Jul 15];20(4):695–704. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2176050&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998 Mar 3;95(5):2044–9. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19243&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Donnell KO, Sarver BAJ, Brandt M, Chang C, Noble-wang J, Park BJ, et al. Phylogenetic Diversity and Microsphere Array-Based Genotyping of Human

Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Basicas. 2014 .12 (1):143-159. Acevedo-Granados Y F¹, Cano L E², Gaviria-Rivera A M¹. Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp mediante técnicas moleculares en Colombia.



Pathogenic *Fusaria* , Including Isolates from the Multistate Contact Lens-Associated U . S . Keratitis Outbreaks of O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, et al. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet Biol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 Dec [cited 2014 Jul 17];46(12):936–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19715767>

O'Donnell K, Sutton D a, Rinaldi MG, Sarver B a J, Balajee SA, Schroers H-J, et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2014 Jul 17];48(10):3708–18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2953079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Park B, Park J, Cheong K-C, Choi J, Jung K, Kim D, et al. Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Jul 17];39(Database issue):D640–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3013728&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Sambrook J. Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York. Third edition. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press, 999 p. 2001

Sampietro D a, Marín P, Iglesias J, Presello D a, Vattuone M a, Catalan C a N, et al. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Jul 17];114(1):74–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20965064>

Wilson A, Simpson D, Chandler E, Jennings P, Nicholson P. Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2014 Jul 17];233(1):69–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15043871>

Zaccardelli M, Vitale S, Luongo L, Merighi M, Corazza L. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* isolates. *Journal of Phytopathology* 56: 534-541. 2008

Tabla 1. Descripción de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación parcial de los genes EF-1 α y RPB2 de aislamientos de *Fusarium* spp. procedentes de muestras clínicas.

Región de amplificación	Cebador	Uso	Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento	Temperatura de alineamiento (°C)
EF-1 α	ef-1H ef-2T	Amplificación	5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3' 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'	~716 pb	57
EF-1 α	ef3 ef22 T	Secuenciación	5'-GTAAGGAGGAS AAGACTACC-3' 5'-AGGAACCCTTA CCGAGCTC -3'	N/A	N/A

(N/A: No aplica).

Tabla 2. Composición de las mezclas de PCR para la amplificación de los fragmentos de los genes EF-1 α y RPB2 de aislamientos de *Fusarium* sp., procedentes de muestras clínicas.

Reactivo	EF-1 α
Agua Mili-Q	16.49 μ l
Buffer de Taq polimerasa	2.5 μ l (10X)
MgCl ₂	1.5 μ l (25 mM)
dNTP's	2 μ l (20 mM)
Cebadores	0.63 μ l (20 μ M)
Taq polimerasa	0.25 μ L (5U/ μ l)

ADN molde	1 μ l (25 μ g)
Volumen final (μ l)	25 μ l

Tabla 3. Identificación molecular a nivel de complejos de especie de aislamientos del género *Fusarium* obtenidos de muestras clínicas.

Aislamiento	Generalización de los pedregón	Identidad molecular asignada (%) BLAST <i>Fusarium-ID EF-1α</i>	Puntaje /Valor E de EF-1 α
55347	Fañapie	<i>F. solani</i> species complex 2-b NRRL43373 (100%)	999.99/0
55349	Fañapie	<i>F. solani</i> species complex 2-a NRRL43433 (99.85%)	999.99/0
55444	Mañapie	<i>F. oxysporum</i> species complex 5 NRRL22533 (99.7%)	999.99/0
55466	Mañapie	<i>F. oxysporum</i> species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0



		e		
55 49 6	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 52 NRRL38540 (99.54%)	999.99/0
55 49 8	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 22 NRRL38608 (99.7%)	999.99/0
55 52 9	M	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 147 NRRL36251 (99.85%)	999.99/0
55 58 3	M	D e s c o n o c i d o	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
55 58 5	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (99.7%)	999.99/0
55 58 8	F	Pi el	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
55 76 2	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (99.85%)	999.99/0
55 78 7	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 195 NRRL38322 (100%)	999.99/0
55 82 7	F	U ñ a	F. oxysporum species complex 16 NRRL38597	999.99/0

		pi e	(99.68%)	
55 86 1	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
55 94 5	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
55 97 9	M	C ó r n e a	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
56 05 4	M	Pi el	F. solani species complex 3+4-ss NRRL32729 (100%)	999.99/0
56 09 4	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
56 21 2	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
56 24 0	F	U ñ a pi e	F. solani species complex 1-a NRRL28546 (100%)	999.99/0
56 30 1	F	U ñ a pi e	F. solani species complex 2- b NRRL43373 (100%)	999.99/0
56 32 0	F	U ñ a pi e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
56 32	F	U ñ	F. solani species complex 29-a	999.99/0

Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Basicas. 2014 .12 (1):143-159. Acevedo-Granados Y F¹, Cano L E², Gaviria-Rivera A M¹.Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp mediante técnicas moleculares en Colombia.



1		amano	NRRL28008 (99.12%)	
5633	F	Uña pite	F. oxysporum species complex 232 NRRL39464 (100%)	999.99/0
56337	F	Uña pite	Fusarium solani FD_01371 (100%)	999.99/0
56340	F	Uña pite	F. solani species complex 34-a NRRL46703 (99.4%)	999.99/0
56363	F	Uña pite	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
56604	F	Uña pite	F. solani species complex 2-v NRRL32838 (99.85%)	999.99/0
56665	F	Piel	F. incarnatum-equiseti species complex 1-a (98.25%)	999.99/0
56780	F	Uña pite	F. solani species complex 2-NRRL31165 (99.85%)	999.99/0
56868	F	Uña pite	F. solani species complex 2-b NRRL43373 (99.7%)	999.99/0
56891	M	Uña	Fusarium solani FD_01371 (100%)	999.99/0

		pie		
56894	M	Uña pite	F. solani species complex 1-a NRRL28546 (100%)	999.99/0
56988	M	Córnea	F. solani species complex 25-a NRRL31169 (99.11%)	999.99/0
57221	F	Uña pite	F. solani species complex 1-a NRRL28546 (100%)	999.99/0
57228	F	Uña pite	F. oxysporum species complex 47 NRRL26225 (100%)	999.99/0
57335	F	Uña pite	F. solani species complex 2-b NRRL43373 (100%)	999.99/0
57560	F	Uña pite	F. oxysporum species complex 195 NRRL38322 (99.56%)	999.99/0
57721	F	Uña pite	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
57885	M	Uña pite	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (99.85%)	999.99/0
57949	F	Uña pite	F. solani species complex 3+4-c NRRL43536 (100%)	999.99/0

Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Basicas. 2014 .12 (1):143-159. Acevedo-Granados Y F¹, Cano L E², Gaviria-Rivera A M¹. Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp mediante técnicas moleculares en Colombia.



58 02 3	F	U ñ a p i e	F. oxysporum species complex 232 NRRL39464 (99.12%)	999.99/0
58 02 5	M	U ñ a p i e	F. solani species complex 7- b NRRL32323 (99.7%)	999.99/0
62 69 8	M	A b d o m e n	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
62 80 2	F	U ñ a p i e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (99.56%)	999.99/0
63 14 5	F	U ñ a p i e	F. oxysporum species complex 195 NRRL38322 (100%)	999.99/0
63 20 0	F	U ñ a p i e	F. solani species complex 2-v NRRL32838 (100%)	999.99/0
63 31 6	F	U ñ a p i e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (99.85%)	999.99/0
63 41 4	M	U ñ a p i e	F. oxysporum species complex 5 NRRL22533 (99.7%)	999.99/0
63 44 7	F	U ñ a p i e	F. solani species complex 2-b NRRL43373 (100%)	999.99/0

63 61 3	F	U ñ a m a n o	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (99.41%)	999.99/0
63 63 5	F	U ñ a p i e	F. solani species complex 2-k NRRL31165 (99.85%)	999.99/0
63 64 9	F	U ñ a p i e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
63 66 6	F	U ñ a m a n o	F. oxysporum species complex 195 NRRL38322 (100%)	999.99/0
63 74 9	M	U ñ a m a n o	F. solani species complex 20- d NRRL32858 (99.1%)	999.99/0
63 76 8	F	U ñ a p i e	F. oxysporum species complex 33 NRRL38515 (100%)	999.99/0
63 91 7	F	U ñ a p i e	F. solani species complex 2- b NRRL43373 (99.85%)	999.99/0
64 76 5	F	U ñ a p i e	F. solani species complex 1- a NRRL28546 (100%)	999.99/0

Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Basicas. 2014 .12 (1):143-159. Acevedo-Granados Y F¹ , Cano L E² , Gaviria-Rivera A M¹.Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp mediante técnicas moleculares en Colombia.



65 06 8	F	U ñ a p i e	F. solani species complex 1- a NRRL28546 (100%)	999.99/0
------------------------	---	----------------------------	--	----------

Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Basicas. 2014 .12 (1):143-159. Acevedo-Granados Y F¹, Cano L E², Gaviria-Rivera A M¹.Identificación de aislamientos clínicos de *Fusarium* spp mediante técnicas moleculares en Colombia.