



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano



Herramientas moleculares para el diagnóstico de micosis en Medicina Veterinaria

Autoras:

Edith Maldonado Castro
Carolina Segundo Zaragoza

Coordinadora:

Carolina Segundo Zaragoza

Volumen 11



Directorio

Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Leonardo Lomelí Vanegas
Rector

Dra. Patricia Dolores Dávila Aranda
Secretaria General

Mtro. Hugo Alejandro Concha Cantú
Abogado General

Mtro. Tomás Humberto Rubio Pérez
Secretario Administrativo

Dra. Diana Tamara Martínez Ruiz
Secretaria de Desarrollo Institucional

M. I. Fernando Macedo Chagolla
Secretario de Servicio y Atención a la Comunidad Universitaria

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar
Director

Dr. José Luis Dávalos Flores
Secretario General

L. C. Enrique López Martínez
Secretario Administrativo

M. en C. Mariano Hernández Gil
Secretario de Vinculación y Proyectos Especiales

MVZ Miguel Ángel Cuevas Díaz
Jefe del Departamento de Publicaciones

MVZ Enrique Basurto Argueta
Jefe del Departamento de Diseño Gráfico y Editorial

MPA Irma Eugenia Candanosa Aranda
Coordinadora del CEIEPAA, Tequisquiapan, Querétaro.



Primera edición, 11 de noviembre de 2025.

DR© 2025 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México.

ISBN Obra Completa: 978-607-30-1361-1

ISBN Volumen 11: 978-607-642-141-3

Hecho en México

Esta edición y sus características son propiedad de la UNAM.



El uso del material contenido en esta obra, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente mencionando el autor o autores.

Derechos de autor

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio, sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

El Comité Editorial de la FMVZ de la UNAM agradece el dictamen de contenido realizado por el **Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez**, de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán de la UNAM.

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por el apoyo recibido para la publicación de la presente obra, a través de los proyectos **PAPIME PE 205522 y PE 208324**.

Contenido

1.	Introducción	6
2.	Técnicas moleculares empleadas en el diagnóstico micológico	8
2.1	Extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN)	8
2.2	Técnicas de detección de ácidos nucleicos (ADN, ARN)	8
2.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)	8
2.2.2	PCR tiempo real o PCRq cuantitativa	12
2.2.3	PCR anidada	12
2.2.4	PCR multiplex	15
2.2.5	Análisis del polimorfismo de cadenas simples (PCR-SSCP, <i>Single Strand Conformational Polymorphisms</i>)	15
2.2.6	Polimorfismos en la Amplificación Aleatoria del ADN (RAPD, <i>Random Amplified polimorphic DNA</i>)	16



2.3	Uso de enzimas de restricción y sondas para la tipificación de hongos	17
2.3.1	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	17
2.3.2	<i>Southern blot</i>	17
2.3.3	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH, <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>)	17
2.3.4	Microarreglos de ADN	18
2.4	Detección de proteínas	19
2.4.1	Espectrofotometría de masas (MALDI-TOF, <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>)	19
2.4.2	<i>Western blot</i>	19
3.	Conclusiones	23
4.	Referencias	23



1. Introducción

El diagnóstico tradicional de las principales micosis de importancia en medicina veterinaria incluye: observación directa a partir de la/s muestra/s clínicas, el aislamiento e identificación del agente micótico con base en sus características bioquímicas y morfológicas—macroscópicas y microscópicas—¹.

Las pruebas serológicas son otra alternativa de diagnóstico, que permiten la detección de antígenos específicos del hongo, sobre todo cuando se presentan micosis sistémicas, donde se requiere emplear anticuerpos monoclonales contra diversos géneros micóticos, por ejemplo: *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. y *Aspergillus* spp. Los ensayos serológicos permiten diferenciar a los animales enfermos de entre los que están sanos ¹⁴. De igual manera se utilizan técnicas histopatológicas y moleculares para la detección e identificación de hongos; en particular, aquellos que son de lento crecimiento, de difícil aislamiento o que hasta el momento no se han encontrado sus condiciones de cultivo, como es el caso de *Rhinosporidium seeberi* ^{2,3} o *Pithyium insidiosum* ⁴.

Las técnicas moleculares se basan en la detección de los ácidos nucleicos (ADN o ARN), de genes específicos y proteínas del hongo involucrado. Se caracterizan por ser rápidas y aunque no sustituyen a los métodos de diagnóstico tradicional, permiten

identificar el agente infeccioso directamente en las muestras clínicas de animales, como sucede en diversas especies del género *Candida*, de *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*. Asimismo, es posible determinar las relaciones filogenéticas y la diferenciación de especies entre un mismo género, por ejemplo, el complejo de *Trichophyton* spp., aislado a partir de lesiones en piel de animales ^{5,6,7}.

La identificación de especies dentro de un mismo género micótico, emplea el ADN que codifica para los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S. También se emplean secuencias conservadas comunes a todos los hongos, detectando dominios o regiones espaciadoras internas que son secuencias variables, sobre las que se diseñan iniciadores o sondas de hibridación. Por ejemplo, en la identificación de levaduras, las secuencias más empleadas son de los dominios designados D1/D2 del extremo 5' del gen 28S y las regiones espaciadoras transcritas internas (*Internal Transcribed Spacer*) 1 y 2 del ADN, por sus siglas en inglés se designan como ITS ^{8,9,10}.

En los hongos filamentosos, las ITS no han permitido la identificación y clasificación de todas las especies, por lo que es recomendable el uso de genes específicos. Por ejemplo, para el género *Aspergillus* se utiliza el gen que codifica para la beta tubulina y el gen de elongación alfa para el género *Fusarium* ¹¹. En los casos de

la clasificación taxonómica, relación filogenética e identificación del género y de la especie del hongo, se hace necesaria la secuenciación del producto amplificado, aún cuando se empleen iniciadores específicos. Una vez que se obtiene la información se analiza y compara mediante análisis bioinformáticos, en los biobancos donde se tienen las secuencias de genes publicadas^{12,13}. Por ejemplo, las regiones genéticas RPB1, RPB2, tub2&/BenA y calmodulina parcial (CaM) son útiles para identificar a nivel de especie ciertos linajes de hongos como *Aspergillus spp*¹⁴.

Otra utilidad de las técnicas moleculares, es la detección de genes cuyas mutaciones están asociadas a los mecanismos de resistencia de fármacos antifúngicos; por ejemplo, se han demostrado mutaciones en los genes *ERG11* de levaduras y el gen *CYP51* que codifica la enzima 14 alfa lanosterol en hongos filamentosos relacionados con la resistencia hacia los azoles^{7,15,16}.

En la **figura 1** se presentan las técnicas moleculares más empleadas para la detección de los ácidos nucleicos y de las proteínas de los hongos de importancia en medicina veterinaria.

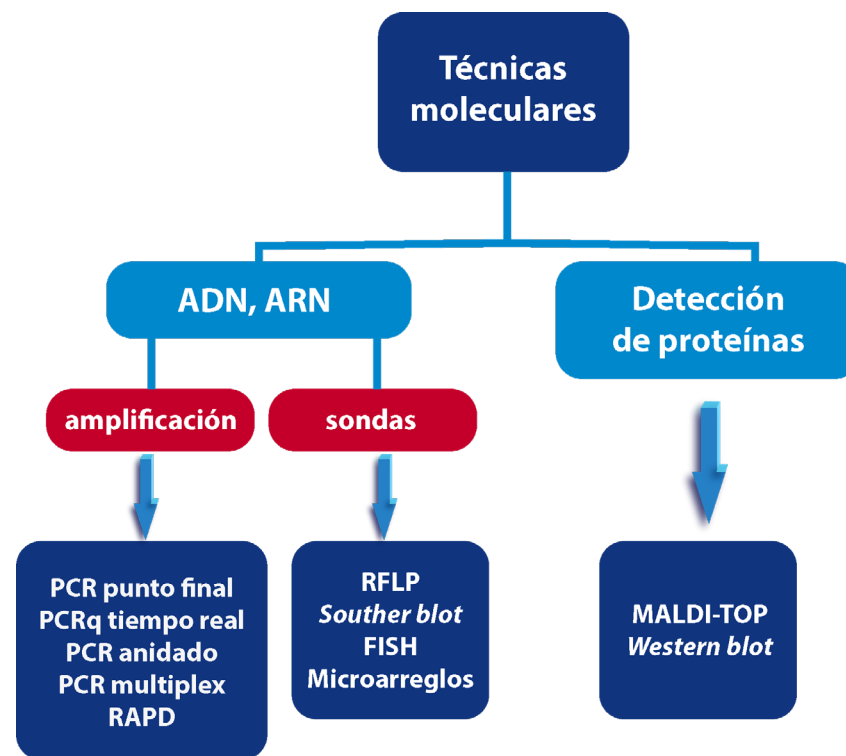


Figura 1. Pruebas moleculares frecuentemente empleadas para el diagnóstico de micosis en medicina veterinaria.



2. Técnicas moleculares empleadas en el diagnóstico micológico

2.1 Extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN)

Las técnicas de detección de ácidos nucleicos requieren de material genético íntegro y puro, de ahí la importancia del método de extracción a utilizar. El ADN, puede obtenerse ya sea de un cultivo puro o directamente de la muestra clínica. De los métodos de extracción utilizados para la obtención de ADN de hongos filamentosos y levaduriformes, se encuentran diversos protocolos basados en la ruptura mecánica utilizando temperaturas de 37°C por 72 horas y la maceración de la muestra. Otros protocolos utilizan perlas de vidrio o nitrógeno líquido provocando lisis celular y la posterior molienda en un mortero¹⁷. Las soluciones de lisis utilizan: a) detergentes como el bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB), duodecil sulfato de sodio (SDS), tritón y tween; b) enzimas como lisozima, proteinasa K o tripsina; c) soluciones saturadas de sales como el acetato de amonio, acetato de sodio y cloruro de sodio. Además, hay soluciones de lisis comerciales que se basan en el empleo de tiocianato de guanidina. Cuando se lisa la pared de los hongos, la purificación del ADN se realiza con solventes orgá-

nicos como el cloroformo, alcohol isoamílico y el fenol, ayudando a separar las proteínas y los lípidos presentes en la muestra. Posteriormente, se utiliza isopropanol o etanol al 70% para retirar el excedente de sales y finalmente el ADN se precipita con etanol absoluto^{7,17}. Otra alternativa para obtener el ADN es mediante el uso de columnas comerciales, para lo cual, es necesario la lisis celular, posteriormente se purifica el ADN mediante su unión a la membrana de sílice presente en la columna o mediante intercambio iónico, el ADN fijado, se libera por medio de una solución amortiguadora y se recupera por centrifugación. El objetivo de los protocolos de extracción y purificación de ADN es la obtención de ADN de buena calidad y con la menor cantidad de contaminantes, para que no interfieran con la amplificación del material genético^{7,37,38}.

2.2. Técnicas de detección de ácidos nucleicos (ADN, ARN)

2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction)

La PCR es una reacción química que permite el estudio detallado de la molécula del ADN al generar millones de copias, siendo la técnica más empleada en los laboratorios por su rapidez y especificidad.



De las aportaciones de la PCR destaca su empleo para identificar relaciones genéticas entre aislados de la misma especie, determinando la diferencia entre géneros que bioquímicamente se comportan de forma similar y que no es posible diferenciarlos mediante las pruebas tradicionales. Para ello, se realiza una secuenciación y se analiza, comparándola con las bases de datos documentadas y reportadas, con ello establecer la relación genética entre otros microorganismos fúngicos ^{7,18,45}.

La PCR punto final se ha empleado en muestras clínicas, para detectar hongos levaduriformes y filamentosos por ejemplo, *Candida* spp. (a partir de pliegues en piel, vulvovaginitis en hembras, en proventrículo en aves), *C. neoformans* (en perros y gatos), *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Absidia* spp., y *Aspergillus fumigatus*. De forma específica se ha empleado esta técnica amplificando el gen Ag2/PARA en *Coccidioides* (en perros jóvenes) y gp43 en el caso de *Paracoccidioides brasiliensis* ⁷. En la identificación de especies del género *Candida* se han utilizado iniciadores específicos para determinar hasta 4 especies distintas, logrando detecciones desde 1 picogramo de ADN genómico ^{19,20}.

La técnica consiste en una primera etapa de desnaturalización del ADN molde, lo cual se logra a 94°C por 1 minuto. La siguiente etapa de alineación, en la cual los iniciadores, cebadores o

primers, que son cadenas cortas y específicas de ADN, se unen a cada una de las cadenas sencillas de ADN para iniciar la replicación por la acción de la enzima polimerasa, generando exponencialmente copias de la cadena original. Se requerirá incluir un control positivo que consta del ADN del microorganismo conocido y el control negativo, al cual no se agrega ADN sino agua. En esta etapa, las condiciones de temperatura y de tiempo dependerán de la concentración de los iniciadores, del número de bases nitrogenadas y del porcentaje de guanina y citosina, a una temperatura de 45 °C a 65 °C por 1 min. Le sigue la etapa de extensión que consiste en la síntesis de la copia de ADN a partir del extremo 3' del iniciador, donde la polimerasa agrega dinucleótidos trifosfatados. Se realiza a una temperatura de 72 °C y el tiempo depende de la longitud del fragmento a amplificar, ya que la polimerasa une entre 500 a 1000 nucleótidos por minuto. Finalmente, se realiza una extensión final a 72 °C durante 5 minutos aproximadamente en un solo ciclo, para permitir sintetizar todos los fragmentos que no se sintetizaron en la etapa de extensión previa ¹⁸ (Fig. 2, etapa 1).

La visualización de los productos se realiza por electroforesis, donde los fragmentos son separados mediante una matriz semi-sólida de agarosa. (Fig. 2, etapa 2).

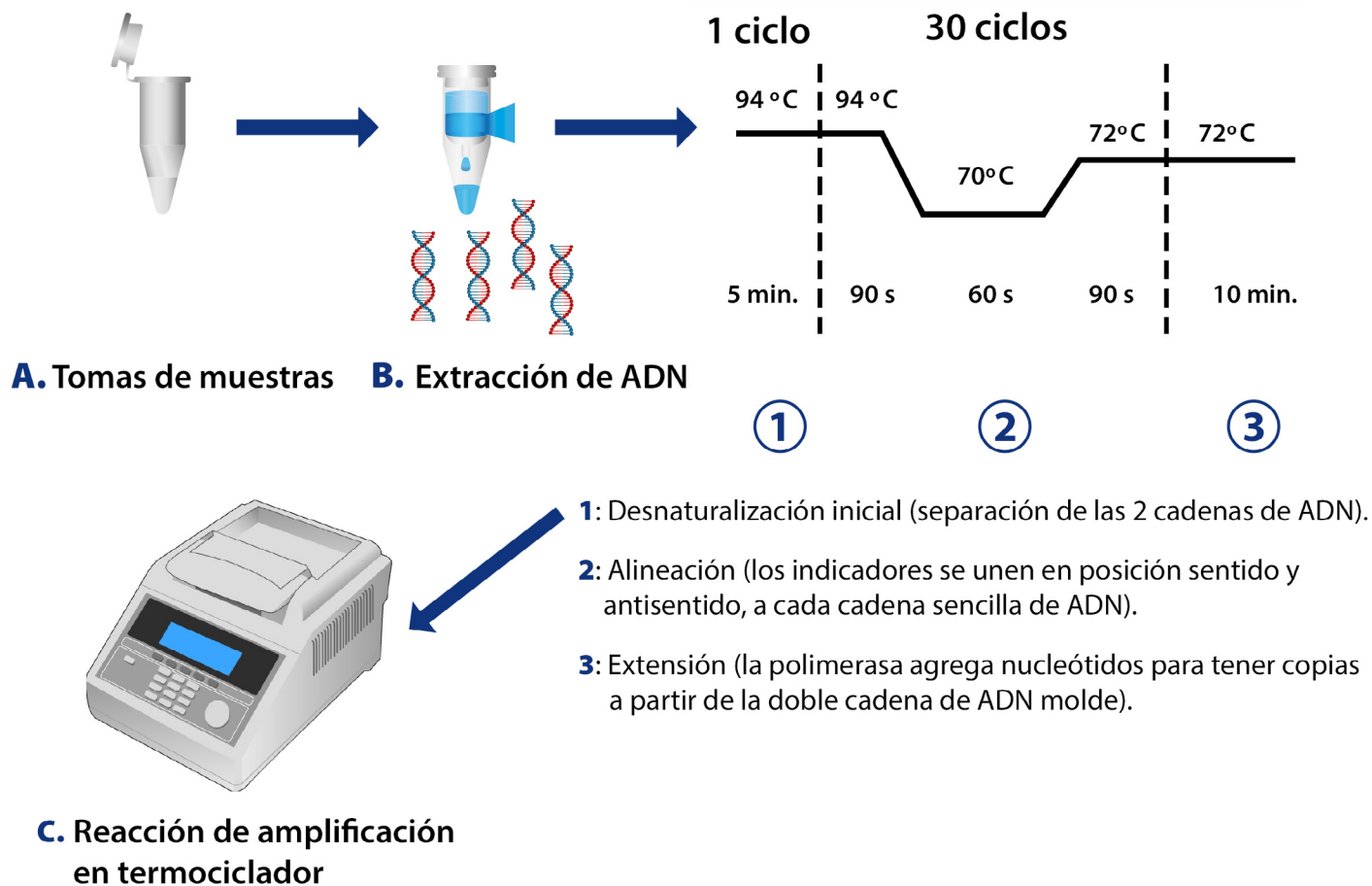
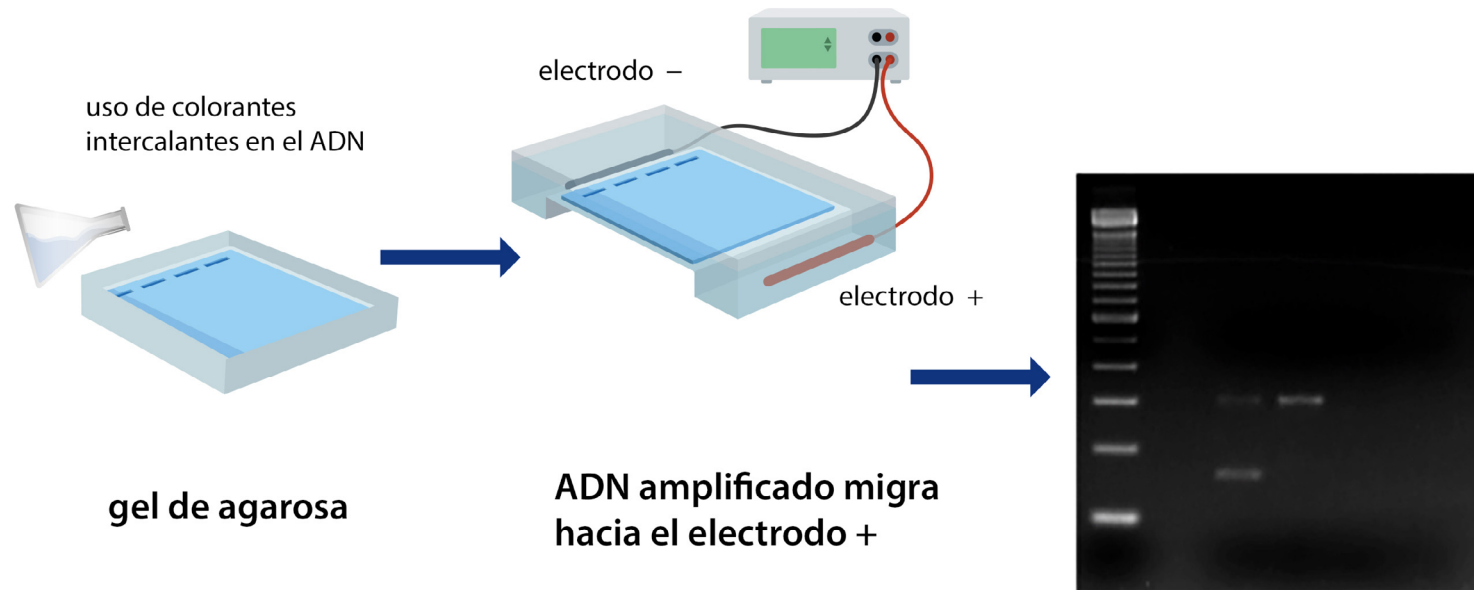


Figura 2, etapa 1. Técnica de PCR.

Paso 1. Desnaturalización de la doble cadena de ADN.

Paso 2. Alineación de los iniciadores, cebadores o *primers* a las cadenas sencillas de ADN.

Paso 3. Extensión de las cadenas de ADN por la taq polimerasa.



D. Electroforesis

**E. Visualización de fragmentos
de ampliación**

Figura 2, etapa 2. Visualización de los fragmentos de ADN amplificados en la PCR por electroforesis en un gel de agarosa.



2.2.2 PCR tiempo real o PCRq cuantitativa

La PCR tiempo real se basa en la detección de ADN amplificado determinado por la fluorescencia emitida, para la cuantificación del material genético producido a medida que avanzan los ciclos de amplificación. Se requiere el uso de sondas que realizan la misma función que los iniciadores o "primers" con la diferencia que tienen unida una molécula fluorescente que es detectada por el equipo de PCR de tiempo real ^{8,21}. La cuantificación del material genético emplea dos métodos: a) Cuantificación absoluta consiste en una relación de la señal obtenida con el número de copias amplificadas utilizando una curva de calibración, la cual emplea diluciones seriadas de concentraciones conocidas de ADN y b) Cuantificación relativa, la cual emplea un gen de referencia en concentraciones conocidas como el de b-actina o gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa para realizar una curva estándar. El número de copias de ADN de interés, se compara con los resultados obtenidos en la curva estándar y con ello determinar las diferencias en el nivel de expresión del gen en estudio ²² (Figura 3).

La PCRq es una herramienta útil en el diagnóstico de micosis, demostrando una sensibilidad del 80% y especificidad del 100% para histoplasmosis, blastomicosis, coccidioimicosis, paracocci-

doidomicosis y aspergilosis. Además, es útil en el seguimiento de respuesta a la terapia antimicótica. Sin embargo, tiene la desventaja de que requiere el diseño y el uso de una sonda distinta por cada especie micótica, lo que incrementa significativamente el costo de la prueba ⁷.

2.2.3 PCR anidada

Esta variante de PCR es muy útil cuando se tiene poca cantidad de ADN, del cual se busca detectar la secuencia de interés aumentando la especificidad de la técnica. A partir de una primera amplificación se realiza una segunda reacción empleando otros iniciadores que se unirán al ADN en una secuencia interna, amplificando un fragmento más pequeño que el primero. Antes de la segunda reacción de PCR, la muestra debe diluirse para reducir la presencia de inhibidores (Figura 4). La ventaja que tiene esta técnica es que disminuye la manipulación del ADN con lo cual se reduce el riesgo de contaminación. Esta técnica se ha empleado para detectar *Histoplasma capsulatum* empleando las secuencias HC1, 2, 3 y 4 y el ADN ribosomal 18S para la detección de *Paracoccidioides brasiliensis* ^{21,23,24,41}.

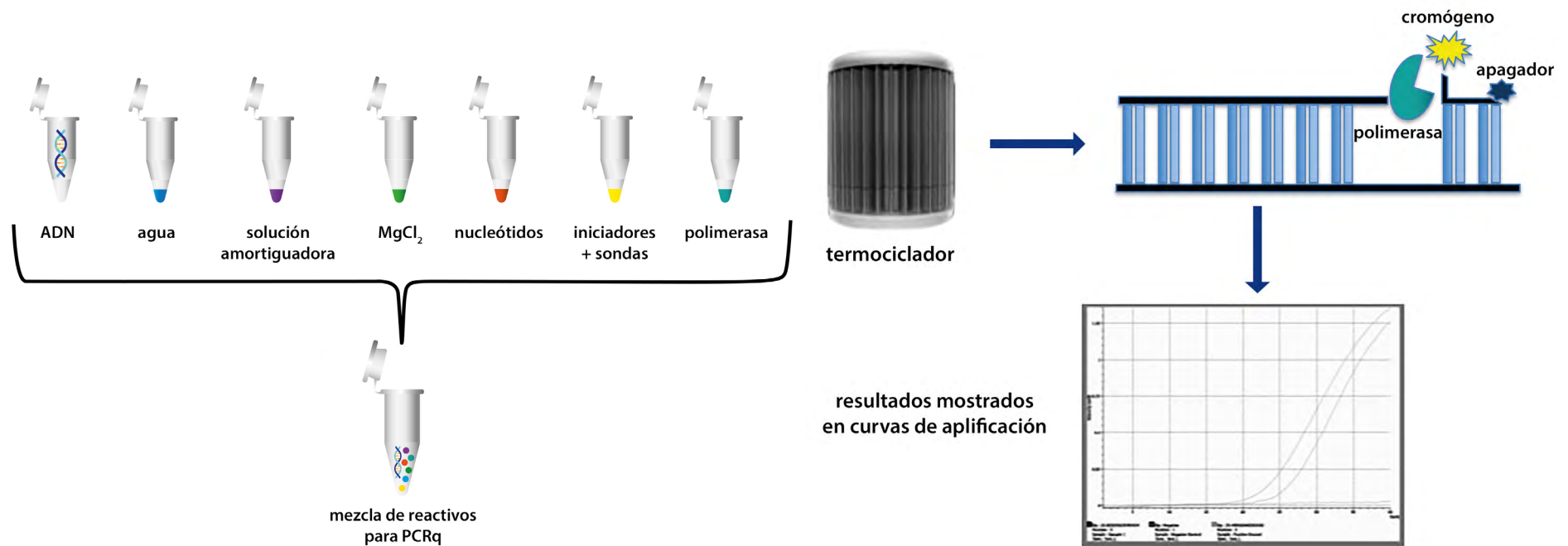


Figura 3. PCR tiempo real (PCRq).

Amplificación de una muestra de ADN en un termociclador. Los fragmentos amplificados son detectados mediante la emisión de fluorescencia, que es captada y cuantificada por el equipo en tiempo real. Los resultados se observan en gráficas de amplificación.

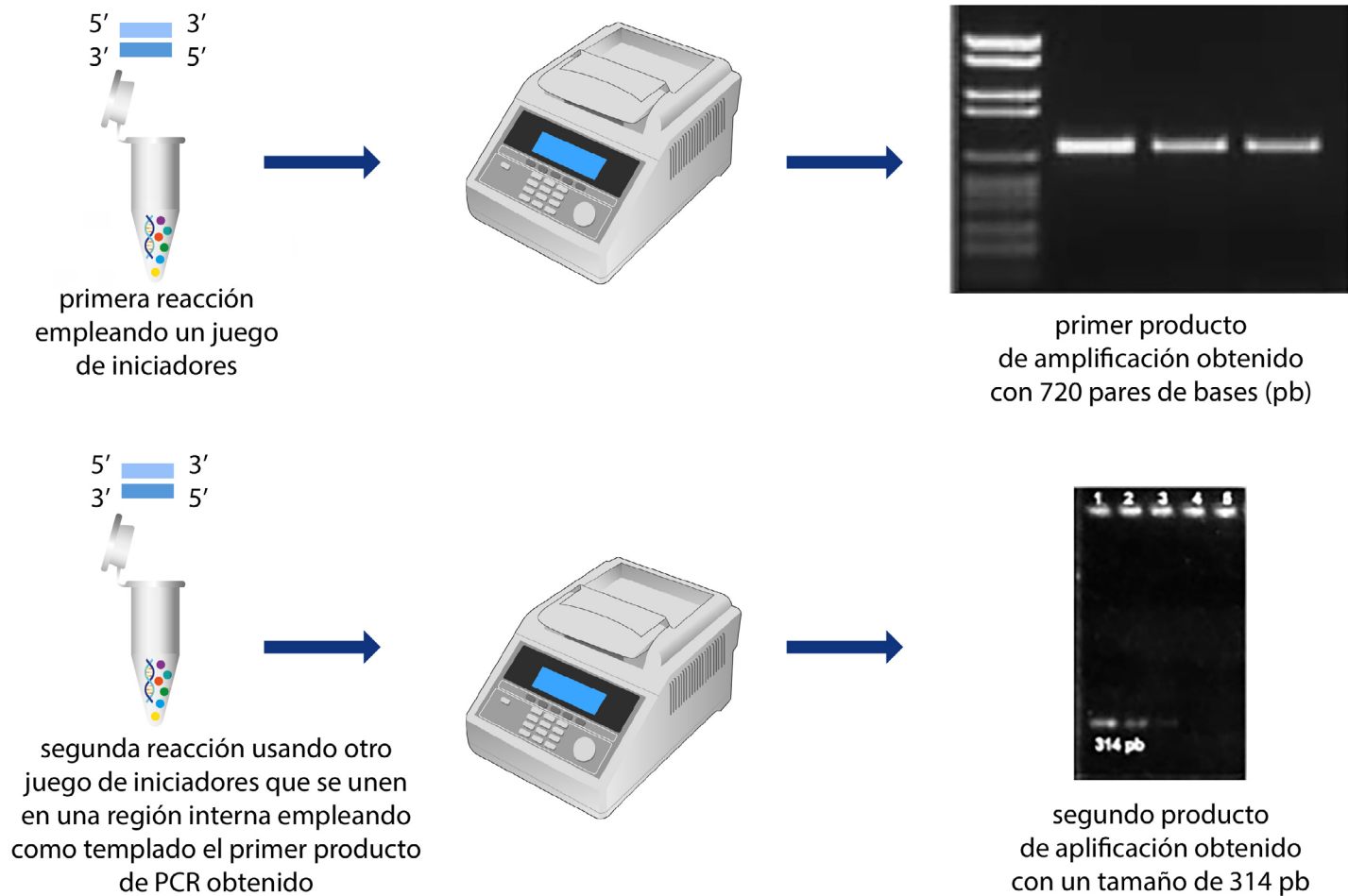


Figura 4. PCR anidada. Requiere el empleo de dos secuencias diferentes de iniciadores. Un par de iniciadores que se unen para amplificar un fragmento de mayor tamaño y otro juego de iniciadores que se alinean en una secuencia interna, usando como molde el producto de PCR de la primera reacción.

2.2.4 PCR multiplex

La PCR multiplex consiste en la amplificación de varios fragmentos de distintos microorganismos o genes de interés en una sola reacción, utilizándose hasta seis iniciadores diferentes (Figura 5). Esta técnica ha sido empleada para identificar y diferenciar a *Cryptococcus* spp y a 11 especies del género *Candida*, en particular a *C. albicans* y *C. glabrata* ²⁵.



Figura 5. PCR multiplex. Se observan fragmentos de amplificación de distinto tamaño que fueron obtenidos mediante PCR y empleando distintos iniciadores para detectar diferentes hongos en una misma muestra.

2.2.5 Análisis del polimorfismo de cadenas simples (PCR-SSCP, *Single Strand Conformational Polymorphisms*)

Esta variante de la PCR, basada en el polimorfismo de conformación de cadena individual del ADN, es útil para detectar mutaciones puntuales al comparar el genoma de dos microorganismos. El método emplea condiciones no desnaturalizantes, donde una hebra individual de ADN adopta una conformación específica debido a su secuencia nucleotídica. Esta configuración puede detectarse por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se han empleado marcadores como calmodulina para identificar *Aspergillus* y recientemente la secuencia de *Mini chromosome maintenance protein* MCM7 para determinar las relaciones filogenéticas entre los hongos filamentosos ^{6,14}.

2.2.6 Polimorfismos en la Amplificación Aleatoria del ADN (RAPD, *Random Amplified polymorphic DNA*)

Esta técnica se desarrolló como una opción para detectar polimorfismos de manera simultánea entre varios microorganismos. Se utilizan iniciadores inespecíficos que se unen al azar en diferentes regiones del ADN genómico, por lo que la secuencia

amplificada es desconocida. No se requiere gran cantidad y calidad del ADN, ni tener conocimientos sobre la secuencia del genoma ⁴⁰. Es una técnica cualitativa que determina distintos fragmentos de amplificación de ADN que estén presentes formen o no un patrón de productos de PCR entre distintos individuos relacionados genéticamente, por lo que permite realizar análisis de diversidad y mejoramiento genético. Esta técnica se ha utilizado para observar diferencias entre especies del género *Candida*, cuyo resultado consiste en un patrón de bandas específicas por especie ^{19,42} (Figura 6). Por ejemplo, la amplificación de regiones que codifican para la enzima aspartilproteasa (SAP) ha logrado diferenciar a *C. albicans* de *C. dubliniensis* ^{11,19}.

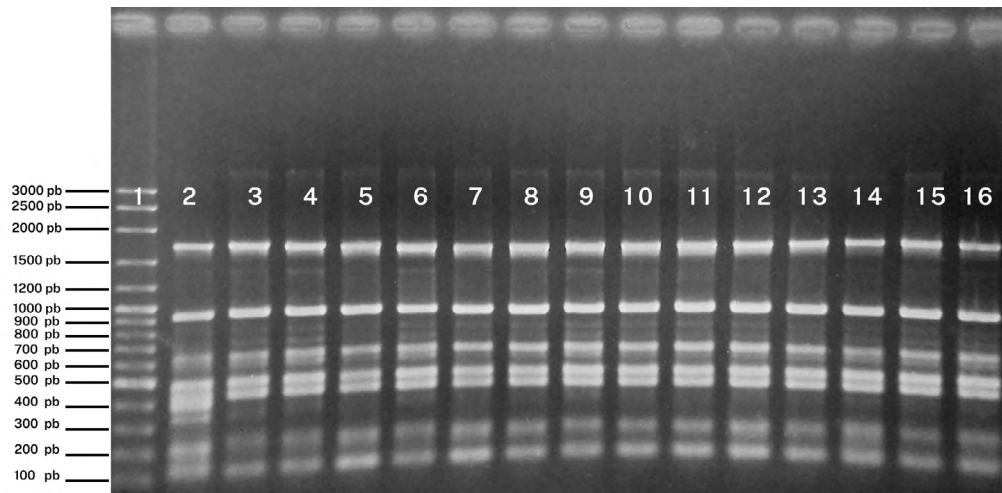


Figura 6. RAPD. Patrón de bandas de aislados de *C. glabrata* amplificados con el iniciador OPE 16, fragmentos visualizados en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1 = marcador de 100 pb, carriles 2-16 aislados.



2.3 Uso de enzimas de restricción y sondas para la tipificación de hongos

2.3.1 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Esta técnica requiere la amplificación de los fragmentos de ADN mediante PCR, los cuales se romperán con enzimas de restricción, como las endonucleasas que van cortando secuencias específicas del ADN. Posteriormente por electroforesis se obtienen por separación los fragmentos en geles de agarosa formando patrones específicos de acuerdo con las enzimas de restricción utilizadas, donde el grado de similitud de los patrones entre la cepa de referencia y los microorganismos desconocidos provee una relación genética entre las especies comparadas. Esta técnica ha sido empleada en estudios epidemiológicos para tipificar aislados de diversos microorganismos. Por ejemplo, con el gen de la calmodulina utilizando los iniciadores CL1 y CL2A digeridos con la enzima *HhaI*, se identificaron en muestras de animales domésticos y silvestres a *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. luriei* especies que conforman el complejo *Sporothrix* ²⁶.

2.3.2 *Southern blot*

Con esta técnica se puede determinar la presencia de una secuencia específica de ADN mediante la extracción directa a partir de una muestra clínica. Ya que se obtiene el ADN, se realiza una electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos con base en su tamaño. Posteriormente la secuencia de ADN se desnaturaliza y se transfiere a una membrana de nylon que se pone en contacto con una sonda radioactiva o quimioluminiscente para complementarse con las bases nitrogenadas del fragmento de interés. Esta prueba permite encontrar mutaciones en el genoma de microorganismos indetectables mediante la PCR punto final. Se ha empleado para la identificación de *Nanninzia gypsea* (*Microsporium gypseum*), y *M. canis* en muestras provenientes de perros y gatos ^{28,44}.

2.3.3 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*)

Las sondas son fragmentos de ADN o de ARN con longitud variable que son marcados con una molécula radioactiva o fluorescente ⁴³. Estas sondas se unen por complementaridad a las



secuencias de nucleótidos presentes en el material genético del hongo. Por principio se requiere que la muestra de tejido o de células quede fijada en un portaobjetos. El tejido de la muestra se trata enzimáticamente con proteinasa K para romper las membranas de las células y permitir el ingreso de la sonda. Después se desnaturaliza el ADN que está en el tejido a una temperatura de 95 °C y se agrega la sonda marcada con peroxidasa o biotina. La técnica de hibridación *in situ* se emplea en muestras tomadas de tejidos de perros y gatos, por su mayor especificidad respecto de las tinciones empleadas en histopatología. Es útil en el diagnóstico diferencial de *Blastomyces dermatitidis* y *Cryptococcus neoformans*. En 2002, esta metodología permitió la identificación de *Coccidioides posadasii* ^{29,30,39}.

2.3.4 Microarreglos de ADN

Es una técnica basada en la unión de varios fragmentos de ADN complementario, donde cada fragmento representa un gen específico que permite detectar y cuantificar la expresión simultánea de varios genes. Ha sido útil en el diagnóstico de enfermedades de

origen infeccioso y para detectar la presencia de genes asociados a la resistencia de los fármacos. El procedimiento general consiste en: a) Fijar las secuencias génicas conocidas en posiciones determinadas sobre un portaobjetos (*chip*), b) Marcar la muestra con una molécula fluorescente, c) Extraer el ARNm y sintetizar el ADN complementario, desnaturalizar el ADN para obtener cadenas sencillas, y d) Colocar la muestra en el microarreglo para la hibridación y formación de cadenas dobles. Se realiza un lavado para retirar las cadenas sencillas y al final se practica un escaneo mediante láser para cuantificar la fluorescencia emitida, donde un color rojo indica la expresión del gen, el color verde corresponde a la expresión del gen control, el verde amarillo indica una expresión disminuida y el rojo naranja corresponde a una expresión aumentada del gen. La ventaja principal es que permite el análisis de un gran número de secuencias de ADN y su desventaja es la baja sensibilidad, debido a que requiere una amplificación previa del material genético. Actualmente, existen microarreglos comerciales disponibles para el diagnóstico de micotoxinas producidas por *Alternaria* y *Penicillium* spp ³¹.



2.4 Detección de proteínas

2.4.1 Espectrofotometría de masas (MALDI-TOF, *matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry*)

Es una técnica basada en función de un espectro de proteínas cuyas comparaciones están establecidas dentro de una base de datos que permiten identificar aislados fúngicos, sin tratamiento previo de la muestra. Sobre una placa metálica conductora se mezcla la muestra de interés con una matriz orgánica, la cual es tratada con rayos láser. Así, la matriz transfiere iones a través de la muestra, generando la separación de iones de la fase sólida a la fase gaseosa. El analizador TOF detecta los iones liberados, dando como resultado un espectro específico de las proteínas presentes en la muestra. Entre las ventajas de esta metodología, se encuentran su rapidez, bajo costo y especificidad. Los resultados se obtienen en una hora como máximo y permite identificar hasta 96 muestras en cada ensayo. Se ha empleado para la detección de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium* spp.^{32,33,34}.

2.4.2 Western blot

Esta prueba consiste en la detección de proteínas específicas del hongo. Se requiere de una extracción proteica mediante métodos químicos o físicos. Las proteínas obtenidas, se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y con el empleo de un anticuerpo específico se acopla a una molécula fluorescente, quimioluminiscente o una enzima (por ejemplo, la fosfatasa alcalina). El tamaño y grosor de las bandas de proteínas son directamente proporcionales a su concentración. Esta técnica se ha empleado en el diagnóstico de *Microsporium canis*^{35,44}.

En el **cuadro 1** se indican algunas de las técnicas moleculares utilizadas para la detección de las micosis de importancia en medicina veterinaria.



Cuadro 1. Técnicas moleculares útiles para la detección de hongos en medicina veterinaria.

Técnica	Región Blanco	Agente Micótico	Referencia de Cita
PCR	genes ribosomales 5.8 S, 18 S, 28 S	levaduras	Fuentes-Feria and Illnait, 2020.
	calmodulina	<i>C. neoformans</i>	Tangarife-Castaño et al., 2015.
	β -tubulina	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	factor de elongación 1- α regiones no codificantes ITS1 e ITS 2	<i>Mucor spp., Rhizopus spp., Absidia spp., Histoplasma Paracoccidioides Blastomyces</i>	
	MEP3 (metaloproteasa)	<i>Microsporium canis</i>	Concha-Rubio et al., 2020.
ITS 1 e ITS 4	Lavari et al., 2022.		



Técnica	Región Blanco	Agente Micótico	Referencia de Cita
PCRq	locus GP43	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Semighini et al., 2002.
	ITS1	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Maubon et al., 2007.
	BD1,2,3,4	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Babady et al., 201
	HC1,2,3,4	<i>Histoplasma capsulatum</i>	
PCR anidada	HC1, HC2, HC3	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Bialek et al., 2002.
	ADN ribosomal 18S	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Braca et al., 2003.
PCR multiplex	ITS 1, ITS 2	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	Dudiuk et al., 2017.
PCR-SSCP	calmodulina	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Montoya et al., 2020.
RAPD	aspartilproteasa (SAD)	<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i>	Bautista et al., 2003.
RFLP	ITS 1, ITS2	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	Gherbawy, VK, 2010.
	Calmodulina B-tubulina	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Montoya et al., 2020.



Técnica	Región Blanco	Agente Micótico	Referencia de Cita
FISH	18S ARN ribosomal	<i>Candida</i> spp.	Lischewski et al., 1997. Van G et al., 2021.
	ADN ribosomal 28S	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Einsele et al., 1997.
	Gen URA 5	<i>Cryptococcus neoformans</i>	San Blas G, 2004.
	ITS	<i>Coccidioides immitis</i> <i>C. posadasii</i>	Lindsley et al., 2021.
Microarreglos ADN	ITS	<i>Candida</i> spp	Lezar and Barros, 2010.
	factor de elongación 1 α (EF-1 α)	<i>Aspergillus</i> spp <i>Alternaria</i> <i>Penicillium</i>	
MALDI-TOF	ITS ARN ribosomal	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	De Almeida et al., 2015.
	regiones D1, D2 de ADN ribosoma 28S	<i>Candida</i> spp.	Lacroix C, et al, 2014.
	ITS1, ITS2 ADN ribosomal 5.8S	<i>Aspergillus fumigatus</i>	De Carolis et al., 2012.
	B-tubulina calmodulina	<i>Fusarium</i> spp.	



3. Conclusiones

Las técnicas moleculares descritas en la presente obra constituyen una alternativa idónea para la identificación temprana de los agentes micóticos causantes de infecciones en los animales, lo cual dará la pauta para la elección del tratamiento adecuado y en su caso ejecutar las medidas de prevención correctas. Además, usar las herramientas moleculares corroboran la identificación tradicional de un hongo y contribuyen al conocimiento de los mecanismos de resistencia ante los antifúngicos que presentan algunos géneros y especies micóticas.

4. Referencias

1. Fuentes-Feria E, Illnait. Zaragozí M. Diagnóstico micológico por técnicas no convencionales en el siglo XXI. Revista Cubana de Medicina Tropical [Internet]. 2020 [citado 13 Jun 2024]; 72 (3) Disponible en: <https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/532>.
2. Ashworth JH. On *Rhinosporidium seeberi* (Wernike, 1903) with special reference to its sporulation and affinities. Trans Roy Soc Edin. 1923; 53(2): 301–342.
3. Tiwari RK, Karthik D, Kuldeep MZ, Shabbir KS. Rhinosporidiosis: A Riddled Disease of Man and Animals. Advances in Animal and Veterinary Sciences. 2015; 3: 54-63. 10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.54.63
4. Gaastra W, Lipman LJ, De Cock AW, Exel TK, Pegge RB, Scheurwater J, Vilela R, Mendoza L. *Pythium insidiosum*: an overview. Vet Microbiol. 2010 Nov 20;146(1-2):1-16. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.07.019. Epub 2010 Jul 24. PMID: 20800978.
5. Sparagano O, Foggett S. Diagnosis of clinically relevant fungi in medicine and veterinary sciences. Adv Appl Microbiol. 2009; 66:29-52. doi: 10.1016/S0065-2164(08)00802-2. PMID: 19203647.
6. Rodríguez-Tudela JL, Cuesta I, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M. Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008; 26 S13: 47-53.
7. Córdoba SB, Reynaldi FJ, Rosa DE. Micología en Medicina Veterinaria. Libros de Cátedra. 2021. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Facultad de Ciencias Veterinarias. ISBN: 978-950-34-2009-6.



8. Tsui CK, Woodhall J, Chen W, Lévesque CA, Lau A, Schoen CD, Baschien C, Najafzadeh MJ, de Hoog GS. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus*. 2011 Dec;2(2):177-89. doi: 10.5598/imafungus.2011.02.02.09. Epub 2011 Nov 18. PMID: 22679603; PMCID: PMC3359816.
9. Tangarife-Castaño VJ, Flóres-Muñoz SV, Mesa-Arango AC. Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares. *Medicina y laboratorio*. 2015; 21 (5-6): 211-242.
10. Verrier J, Monod M. Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology. *Mycopathologia*. 2017 Feb;182 (1-2):193-202. doi: 10.1007/s11046-016-0038-z. Epub 2016 Aug 1. PMID: 27480761.
11. Montoya-Villa YV, Montes CLA, López A, Hernández RO. Estandarización de técnicas moleculares basadas en la amplificación y análisis de restricción para la identificación de especies de *Aspergillus* spp. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.2020. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/14499/3/MontoyaYury_2020_t%C3%A9cnicasMolecularesAspergillus.pdf
12. Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AF, Bahram M, Bates ST, Bruns TD, Bengtsson-Palme J, Callaghan TM, Douglas B, Drenkhan T, Eberhardt U, Dueñas M, Grebenc T, Griffith GW, Hartmann M, Kirk PM, Kohout P, Larsson E, Lindahl BD, Lücking R, Martín MP, Matheny PB, Nguyen NH, Niskanen T, Oja J, Peay KG, Peintner U, Peterson M, Põldmaa K, Saag L, Saar I, Schüßler A, Scott JA, Senés C, Smith ME, Suija A, Taylor DL, Telleria MT, Weiss M, Larsson KH. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol*. 2013 Nov;22(21):5271-7. doi: 10.1111/mec.12481. Epub 2013 Sep 24. PMID: 24112409.
13. Irinyi L, Lackner M, de Hoog GS, Meyer W. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. *Fungal Biol*. 2016 Feb;120(2):125-36. doi: 10.1016/j.funbio.2015.04.007. Epub 2015 Apr 30. PMID: 26781368.
14. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod*. 2017 Mar 24;80(3):756-770. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085. Epub 2017 Feb 15. PMID: 28199101; PMCID: PMC5368684.



15. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. Clin Chest Med. 2009 Jun;30(2):391-408, viii. doi: 10.1016/j.ccm.2009.02.014. PMID: 19375643.
16. Gherbawy, VK. Molecular identification of fungi. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. Library of Congress Control Number: 2009938949 ISBN 978-3-642-05041-1. 2010. e-ISBN 978-3-642-05042-8, DOI 10.1007/978-3-642-05042-8.
17. Lurá M, Benítez J, Jáuregui S, & González, A. Evaluación de diferentes técnicas de extracción del ADN de hongos filamentosos. R Fabicib. 2003; 7: 37- 44.
18. Díaz AS, Rentería LF, Cortez JA, Palacios ES. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Semarnat-INECC-UAM-I. 2014.
19. Bautista-Muñoz C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C. Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 414-420. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.414-420.2003>.
20. Pilo P, Tiley AMM, Colleen L, Karki SJ, Burke J, Feechan A. A rapid fungal DNA extraction method suitable for PCR screening fungal mutants, infected plant tissue and spore trap samples. Physiological and Mol Plant Pathol. 2022; 117: 1-7.
21. Babady NE, Buckwalter SP, Hall L, Le Febre KM, Binnicker M, Wengenack NL. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* from culture isolates and clinical specimens by use of real-time PCR. J Clin Microbiol. 2011; 49(9): 3204-8. doi:10.1128/JCM.00673-11.
22. Rodríguez RG, Acono RMA, & Zarain AA. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Mens Bioquim. 2021; 45: 11-22.
23. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling G, Robertson VJ, Knobloch J. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. J Clin Microbiol. 2002; 40:1644–1647. doi: 10.1128/jcm.40.5.1644-1647.
24. Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. J Clin Microbiol. 2003; 41: 1753–1755. doi: 10.1128/jcm.41.4.1753-1755.



25. Dudiuk C, Morales-López SE, Podesta V, Macedo D, Leonardelli F, Vitale RG, Tosello ME, Cabeza MS, Biasoli M, Gamarra S, Garcia-Effron G. Multiplex PCR designed to differentiate species within the *Candida glabrata* complex. Rev Iberoam Micol. 2017 Jan-Mar;34(1):43-45. doi: 10.1016/j.riam.2016.04.007. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27810263.
26. Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. J Clin Microbiol. 2001 Oct;39(10):3505-11. doi: 10.1128/JCM.39.10.3505-3511.2001. PMID: 11574564; PMCID: PMC88380.
27. Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. J Appl Genet. 2004; 45(1): 3-15.
28. Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, Hasegawa, A. Identification of clinical isolates of *Microsporium canis* and *M. gypseum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization analyses: Die Identifizierung klinischer *Microsporium canis*-und *M. gypseum*-Isolate mittels RAPD und Southern Hybridization. Mycoses.1998; 41(3-4): 139-143.
29. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol. 1997 Jun;35(6):1353-60. doi: 10.1128/jcm.35.6.1353-1360.1997. PMID: 9163443; PMCID: PMC229748.
30. Lischewski A, Kretschmar M, Hof H, Amann R, Hacker J, Morschhäuser J. Detection and identification of *Candida* species in experimentally infected tissue and human blood by rRNA-specific fluorescent in situ hybridization. J Clin Microbiol. 1997 Nov;35(11):2943-8. doi: 10.1128/jcm.35.11.2943-2948.1997. PMID: 9350764; PMCID: PMC230092.
31. Lezar S, Barros E. Oligonucleotide microarray for the identification of potential mycotoxigenic fungi. BMC Microbiol. 2010 Mar 23;10:87. doi: 10.1186/1471-2180-10-87. PMID: 20307326; PMCID: PMC2858739.
32. De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenia C, Colozza C, Tortorano AM, Sanguinetti M. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and



- Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 475–484.
33. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, François N, Morio F, Desoubeaux G, Chandénier J, Kauffmann-Lacroix C, Hennequin C, Guitard J, Nassif X, Bougnoux ME. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Feb;20(2):153-8. doi: 10.1111/1469-0691.12210. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23594150.
 34. De Almeida JN, Del Negro GMB, Grenfell RC, Vidal MSM, Thomaz DY, de Figueiredo DSY, Bagagli E, Juliano Neto L, Benard G. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of the dimorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 1383–1386.
 35. Peano A, Min AM, Beccati M, Menzano A, Pasquetti M, Gallo MG. Use of western blot to study *Microsporum canis* antigenic proteins in canine dermatophytosis. *Mycoses.* 2011; 54(3), 223-229.
 36. Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, Weigl S, Danesi P, Capelli G, Otranto D. An improved molecular diagnostic assay for canine and feline dermatophytosis. *Medical Mycol.* 2013; 51(2): 136-143.
 37. Dial SM. Fungal diagnostics: current techniques and future trends. *Vet Clinics of North America: Small Animal Pract.* 2007; 37(2): 373-392.
 38. Lavari A, Eidi S, Soltani M. Molecular diagnosis of dermatophyte isolates from canine and feline dermatophytosis in Northeast Iran. *Vet Med Sci.* 2022 Mar;8(2):492-497. doi: 10.1002/vms3.698. Epub 2021 Dec 17. PMID: 34919354; PMCID: PMC8959315.
 39. Martínez CG, Ruales P. Coccidioidomycosis en caninos y felinos: hallazgos clínicos, diagnóstico y tratamiento. *Analecta Veterinaria.* 2018; 38: 33-44. 10.24215/15142590e023.
 40. Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America.
 41. Morales-Restrepo N, Cardona-Castro N. Métodos de diagnóstico en micología. *Rev CES Med.* 2018; 32(1): 41-52.



42. Pinheiro BG, Hahn RC, Camargo ZP, Rodrigues AM. Molecular Tools for Detection and Identification of *Paracoccidioides* Species: Current Status and Future Perspectives. J Fungi (Basel). 2020 Nov 18;6(4):293. doi: 10.3390/jof6040293. PMID: 33217898; PMCID: PMC7711936.
43. San Blas G. La micología molecular en la práctica médica del siglo XXI. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Centro de Microbiología y Biología Celular. Dermatol. Venez. 2004; 42 (1): 4-8.
44. Van Genechten W, Van Dijck P, Demuyser L. Fluorescent toys 'n' tools lighting the way in fungal research. FEMS Microbiol Rev. 2021 Sep 8;45(5):fuab013. doi: 10.1093/femsre/fuab013. PMID: 33595628; PMCID: PMC8498796.
45. Concha-Rubio D, Thomson P, Sandoval D, Medina AD. Detección rápida y precisa de *Microsporum canis*, principal agente etiológico de la tiña en Chile. Rev Med Vet Investig. 2020; 3(1): 7-16.
46. Jackson CJ, Barton RC, Evans EG. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J Clin Microbiol. 1999 Apr;37(4):931-6. doi: 10.1128/JCM.37.4.931-936.1999. PMID: 10074504; PMCID: PMC88627.



Disponible en:

Sitio WEB institucional de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Tema: MICOLOGÍA VETERINARIA

Publicaciones: COLECCIÓN [Temas Selectos de Micología Veterinaria](#)



Obra completa: Temas Selectos de Micología Veterinaria.
**Volumen 11: Herramientas moleculares para el diagnóstico
de micosis en Medicina Veterinaria.**

Fecha de aparición: 28 de noviembre de 2025.

Fecha de término: 25 de noviembre de 2025.

Editada por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Departamento de Diseño Gráfico y Editorial
de la Secretaría de Vinculación y Proyectos Especiales:
edificio 2, planta baja, FMVZ-UNAM.

Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria,
Coyoacán, 04510, México, Ciudad de México.

Formación y composición tipográfica
en tipos Myriad Pro y Dax.

Medio electrónico: internet

Formato: PDF

Tamaño: 3.4 MB

Diseño y formación editorial: Rosalinda Meza Contreras

Diseño de portada: Edgar Emmanuel Herrera López

Coordinadora editorial: Laura E. Martínez Alvarez.

Webmaster: Marco A. Domínguez Guadarrama.