



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Análisis feno y genotípico de dermatofitos procedentes de México y
República Dominicana

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta

Moreno Bonilla Diego Jhonatan

Directora:

Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes

Asesora:

Q.F.B. Patricia Vidal Millán



Ciudad de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Micología Molecular de la Facultad de Medicina, UNAM, por confiar en mí y permitirme comenzar con un nuevo proyecto.

A la **Dra. María del Rocío Reyes Montes**, por su paciencia, por su tiempo, sus consejos, la tolerancia que me demostró, los conocimientos que me brindó desde el principio, hasta el final de este recorrido, así como el gran apoyo que me dio para concluir este trabajo.

A la **Dra. Esperanza Duarte Escalante**, por su paciencia, sus conocimientos y su apoyo brindado para llevar a cabo cada día éste trabajo.

Al **Dr. Erick Obed Martínez Herrera**, por su apoyo en el desarrollo de ésta tesis y la facilitación de los aislados utilizados.

A mis compañeros en la Unidad de Micología, **Mayra, Isai, Ana, Isabel, Swetia, Hugo, Adrián y Thania**, y especialmente a **Angélica**, por su apoyo paciencia, y por ayudarme a culminar con éste trabajo, haciendo más amena la estancia en el laboratorio.

A la **M. en C. Hortensia Navarro**, la **Q.F.B. Erika Córdova** y la **Q.F.B. Amelia Pérez**, por sus consejos y apoyo dentro del laboratorio.

A mi asesora, la **Q.F.B. Patricia Vidal Millán**, por la motivación brindada, y a mis sinodales, el **Q.F.B. Pablo Juárez de los Santos**, la **Q.F.B. María Galia Martínez Flores** y el **Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara**, por el tiempo que me concedieron, tanto para las correcciones de la tesis, así como en las aulas durante mis estudios.

A mis amigos, presentes dentro y fuera de las aulas, por su apoyo y palabras de aliento.

A la UNAM, a la FES Zaragoza y especialmente a todos mis profesores, por formarme moral y profesionalmente, y brindarme los conocimientos necesarios para ejercer la profesión de Q.F.B.

A Dios, por permitirme llegar hasta ésta instancia.

DEDICATORIA

A mis padres, **Herminia** y **Francisco**, que durante tanto tiempo me han apoyado incondicionalmente, por su paciencia, su tolerancia, su respeto. Por darme la confianza, y creer que esto era posible, por una vida de sacrificio y amor. Quiero que sepan que éste logro no es solo mío, es nuestro.

A mi hermana, **Estela**, que me ha apoyado tanto y de tantas formas, por su tolerancia, su respeto, su paciencia, por la compañía y por el cariño que me ha dado.

A mis sobrinos, **Francisco**, **Jazmín** y **Alejandro**, me han brindado mucho amor, y fuerzas para seguir un día más.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
IMPACTO CIENTÍFICO.....	7
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
Objetivos Particulares	8
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Diagrama de flujo.....	10
Análisis fenotípico	12
Primoaislamiento de los dermatofitos	12
Obtención de cultivos monospóricos	12
Macromorfología.....	13
Micromorfología	13
Tamaño de conidios	14
Análisis estadístico	14
Análisis genotípico.....	15
Extracción de DNA genómico.....	15
Amplificación de un fragmento del gen <i>BT2</i>	17
Purificación de productos de PCR.....	18
Secuenciación de los fragmentos amplificados	18
Edición e identidad de las secuencias de los aislados de dermatofitos.....	18
Análisis filogenético.	19
RESULTADOS	19
Análisis fenotípico	19
Identificación de primoaislamientos	19
Obtención de cultivos monospóricos	21
Macromorfología.....	21
Micromorfología	25

Tamaño de conidios	27
Análisis estadístico	28
Caracterización genotípica.....	28
Extracción de DNA genómico	28
Amplificación de la secuencia parcial del gen <i>BT2</i>	30
Identidad de las secuencias de los dermatofitos procedentes de México y República Dominicana.....	31
Análisis de las secuencias del gen <i>BT2</i>	33
Máxima Verosimilitud con el gen <i>BT2</i>	33
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES.....	41
PERSPECTIVAS.....	42
REFERENCIAS.....	42

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la identificación genotípica de aislados clínicos de dermatofitos.....	17
Tabla 2. Aislados de dermatofitos identificados con la técnica de Rush-Munro....	20
Tabla 3. Morfología macroscópica de dermatofitos procedentes de México y República Dominicana en los medios Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol y agar papa dextrosa.....	24
Tabla 4. Tamaño de conidios de aislados de dermatofitos.....	28
Tabla 5 .Cuantificación de DNA por espectrofotometría.....	29
Figura 1. Cuantificación de DNA obtenido de distintos aislados de dermatofitos...30	
Figura 2. PCR con el gen <i>BT2</i> de DNA de aislados de dermatofitos.....	30
Tabla 6. Identidad de las secuencias de los dermatofitos procedentes de México y República Dominicana.....	32
Figura 3. Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud....	35

RESUMEN

Los dermatofitos son hongos que invaden y se propagan en la piel queratinizada de los mamíferos, éstos pertenecen principalmente a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Con base en su ecología, se han dividido en tres grupos: antropofílicos, zoofílicos, y geofílicos. Estos hongos pueden producir infecciones superficiales (dermatofitosis) en la piel de huéspedes sanos y pueden penetrar en tejidos profundos en huéspedes inmunocomprometidos. El objetivo de este trabajo fue identificar las especies de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, por características feno y genotípicas, utilizando aislados clínicos procedentes de México y República Dominicana.

Se estudiaron 59 aislados de dermatofitos, procedentes de México (36) y República Dominicana (23), los cuales fueron identificados por macro y micromorfología. Además, se obtuvo el DNA de éstos y posteriormente se amplificó con el gen *BT2*. Las secuencias obtenidas, se compararon con todas las secuencias depositadas en el GenBank, a través del algoritmo BLASTn. Los alineamientos de las secuencias se analizaron tomando en cuenta los porcentajes de similitud, identidad y valores de expectación. Asimismo, se construyó un árbol utilizando el método de Máxima Verosimilitud. Los resultados mostraron que la identificación fenotípica coincidió con la morfología descrita en la literatura, para cada una de las diferentes especies. Los hongos identificados fueron: 46 aislados como *Trichophyton rubrum*; cinco aislados como *T. mentagrophytes*; cuatro como *M. canis*; dos como *E. floccosum*; uno como *T. erinacei* y uno como *M. gypseum*. La identificación genotípica permitió la discriminación a nivel de especie de los aislados, los cuales fueron identificados como: 41 aislados como *T. rubrum*; cinco

como *T. interdigitale*; cinco como *A. otae*; cuatro como *T. tonsurans*; dos como *E. floccosum*; uno como *A. benhamie* y uno como *M. audouinii*.

INTRODUCCIÓN

Los dermatofitos son hongos que invaden y se propagan en la piel queratinizada de los mamíferos, incluidos los seres humanos (Weitzman y Summerbell, 1995). Éstos, pertenecen principalmente a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* (en su estado anamórfico) y *Arthroderma* y *Nannizzia* (en su estado teleomórfico) e incluyen cerca de 30 de las 40 especies conocidas como posibles agentes patógenos de los seres humanos y otros mamíferos (Kanbe, 2008). Con base en su ecología, los dermatofitos se han dividido en tres grupos: antropofílicos, que son principalmente asociados con los humanos (Cafarchia *et al.*, 2006; Graser *et al.*, 2008; Weitzman y Summerbell, 1995), zoofílicos, que son patógenos comunes de los animales y ocasionalmente infectan a los humanos, y geofílicos, que están asociados principalmente con materiales queratinizados presentes en el medio ambiente (Weitzman y Summerbell, 1995). Estos hongos pueden producir infecciones superficiales (dermatofitosis) en la piel de huéspedes sanos y pueden penetrar en los tejidos más profundos en huéspedes inmunocomprometidos (Squeo *et al.*, 1998).

MARCO TEÓRICO

La filogenia de los dermatofitos, permanece poco clara, porque sus miembros están muy estrechamente relacionados en su filogenia y taxonomía, aunado a esto las características fenotípicas en ocasiones son poco informativas, como es el caso de los dermatofitos obtenidos a partir de muestras médicas y veterinarias, que en ocasiones han perdido su habilidad para reproducirse sexualmente (Takashio *et al.*, 1977). Durante mucho tiempo, los métodos fenotípicos, incluyendo la morfología, la fisiología y la bioquímica fueron la base de la taxonomía e identificación de dermatofitos, pero estos consumen mucho tiempo, son inexactos, y en muchos casos insuficientemente concluyentes para identificar los taxones menos comunes o aislados que representan potencialmente nuevas especies (Hubka *et al.*, 2014a, 2014b). Durante las dos últimas décadas, la secuenciación del DNA y la sistemática molecular han generado nuevos conceptos de especie en dermatofitos, además se han obtenido avances importantes con la sistemática moderna. Dentro de la tipificación molecular, los marcadores moleculares que se han utilizado son: regiones del espaciador interno transcrito 1 ITS1 e ITS2 del rDNA (Gräser *et al.*, 2008). Los análisis filogenéticos y el uso de conceptos de especies filogenéticas con base en las regiones ITS del rDNA mejoraron la taxonomía (Gräser *et al.*, 2008). Un segmento del gen que codifica para la β -tubulina (*BT2*), que es una proteína globular monomérica involucrada en la generación de microfilamentos, ha sido utilizada con éxito para la delimitación de las especies en otros grupos de hongos, tales como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Scedosporium*, y *Phaeoacremonium* (Gilgado *et al.*, 2005; Balajee *et*

al., 2009; Serra and Peterson, 2007; Mostert *et al.*, 2005). Este locus incluye algunos intrones, que son buenos estimadores para distinguir especies estrechamente relacionadas, por lo que Rezaei-Matehkolaei *et al.* (2014) utilizaron este marcador (*BT2*) junto con la región ITS para evaluar la variación intra e interespecífica de 26 aislados de dermatofitos, incluidos en los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. El dendrograma obtenido con las secuencia del gen *BT2*, presentó una topología casi compatible con la construida con base en la región ITS y se formaron clados similares, sin embargo, mostró mejor resolución el árbol construido con el gen *BT2*.

En México, las dermatofitosis constituyen del 70-80% de todas las micosis, por ejemplo la *tinea unguium* representa un 30% de las dermatofitosis y del 85-87% de las onicomycosis. En las onicomycosis, la relación hombre:mujer es de 2:1 y el agente causal más frecuentemente aislado es *T. rubrum*, seguido de *T. mentagrophytes*, ambos suman más del 90% de los casos (Arenas, 2002; Arenas *et al.*, 2010). Un estudio epidemiológico realizado por Welsh *et al.* (2006), en el cual de 2,397 casos de dermatofitosis reportados en la ciudad de Monterrey, México, mostró que 613 correspondieron a *tinea unguium*, siendo *T. rubrum* el principal agente causal en un 60%. Otro estudio realizado en pacientes pediátricos, ha evidenciado que la prevalencia de las onicomycosis se ha incrementado en los últimos años, mostrando que el grupo etario de 12 a 16 años, es el más afectado, además las uñas de los pies son las zonas más frecuentemente infectadas y *T. rubrum* es el principal agente etiológico (Morales-Mendoza y Arenas-Guzmán, 2012).

López-Martínez *et al.* (2010) analizaron 15,101 muestras biológicas de pacientes con micosis superficiales, obtenidas de diferentes servicios de dermatología de la ciudad de México durante un período de 10 años. El examen de laboratorio confirmó 4,709 casos de micosis superficial (31.18%), de los cuales 2,084 (44.26%) fueron dermatofitosis. Las especies más frecuentes fueron *T. rubrum* (71.2%), seguido de *T. tonsurans* (6.9%), *T. mentagrophytes* (5.5%), *M. canis* (4.5%), *E. floccosum* (1.3%), *M. gypseum* (0.4%), *M. audouinii* (0.05%), *T. verrucosum* (0.05%) y *Trichophyton* spp. (10.1%). La forma clínica más frecuente fue la *tinea unguium* (59.9%), seguida de *tinea pedis* (24.5%), además mostraron que el número de casos de *T. rubrum* está aumentando en México, esta tendencia coincide con otros trabajos que mencionan que *T. rubrum* continúa en aumento con una frecuencia de 60–80% en su aislamiento (Bonifaz, 1988; López-Martínez *et al.*, 1972, 1985; Manzano-Gayosso *et al.*, 1994).

En República Dominicana, la situación epidemiológica no es diferente, ya que no existen estudios formales de las dermatofitosis, solo existen reportes aislados como el trabajo de Espinal *et al.* (2010), quienes estudiaron 265 muestras positivas para *tinea capitis*, mostraron que el sexo masculino presentó un alto predominio y el agente causal responsable de la mayoría de los casos fue *M. canis* seguido de *M. audouinii*. En otro estudio realizado por Arenas *et al.* (2010), analizaron muestras de pacientes con *tinea capitis*, ellos reportaron un cambio emergente en lo que respecta a los agentes causales de esta infección, evidenciando a *T. tonsurans* y *M. audouinii* como los principales responsables, donde se pudo observar que existe predominio en el sexo masculino con 71.18%.

Habitualmente, a nivel mundial, incluyendo países de Centroamérica, la delimitación de especies en dermatofitos en la mayoría de los laboratorios se realiza con base en criterios micológicos o microbiológicos, incluyendo micro y macromorfología de la colonia, así como su habilidad de apareamiento y características bioquímicas/fisiológicas (Rezaei-Matehkolaei *et al.*, 2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas dos décadas, el concepto filogenético de las especies sorprendentemente ha revolucionado la taxonomía de los dermatofitos, y para facilitar la identificación precisa de estos hongos, se ha enfocado la atención hacia estrategias independientes del cultivo, como los métodos moleculares. Estos procedimientos tienen la ventaja de ser rápidos y presentan mayor sensibilidad y reproducibilidad en comparación con el diagnóstico convencional (Kanbe *et al.*, 2008). Así, la combinación de los métodos convencionales y moleculares, han evidenciado diferentes frecuencias de especies de dermatofitos, de acuerdo a su origen geográfico (Bassiri-Jahromi *et al.*, 2009; Mirzahoseini *et al.*, 2009; Rezaei-Matehkolaei *et al.*, 2013).

Considerando estos antecedentes, la correcta identificación de los agentes causantes de dermatofitosis es importante para fines epidemiológicos (diferenciación exacta entre infecciones superficiales causadas por dermatofitos y no dermatofitos), ya que en las últimas décadas como consecuencia de las modificaciones en las condiciones ambientales, la distribución de los agentes etiológicos, el envejecimiento de la población, el aumento de las terapias inmunosupresoras y de enfermedades como el VIH, además del incremento de la

resistencia secundaria al uso indiscriminado de agentes antifúngicos; la epidemiología de esta micosis ha mostrado cambios, lo cual se refleja también en cambios en los patrones clínicos (Ameen, 2010; Vena *et al.*, 2012). Por lo que la identificación a nivel de especie de los dermatofitos es muy importante ya que permitirá controlar las fuentes potenciales de infección, elección de una terapia antifúngica adecuada y prevención de la transmisión (Panasiti *et al.*, 2007), pues la profilaxis y el tratamiento pueden variar dependiendo de la especie involucrada. Debido a las dificultades que presenta la taxonomía de estos hongos, el presente trabajo plantea identificar las especies de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, por métodos fenotípicos y genotípicos, utilizando aislados clínicos procedentes de México y República Dominicana.

IMPACTO CIENTÍFICO

En México y República Dominicana, los dermatofitos solo se identifican mediante sus características fenotípicas, por lo que no se identifican adecuadamente las especies, debido a estas carencias, es necesario llevar a cabo estudios filogenéticos con el fin de distinguir especies relacionadas, como *T. rubrum* y *T. soudanense* o *T. quinckeanum* y *T. schoenleinii*. Este estudio permitirá tener un panorama general de las especies que persisten en estos países, así como evidenciar nuevas especies.

HIPÓTESIS

Utilizando un esquema polifásico, a través de la caracterización feno y genotípica de aislados clínicos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, permitirá ubicarlos en los complejos y especies correctas.

OBJETIVO GENERAL

Identificar aislados clínicos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* procedentes de México y República Dominicana a través métodos feno y genotípicos.

Objetivos Particulares

Identificar aislados clínicos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* por métodos fenotípicos (macro y micromorfología, tamaño de conidios).

Amplificar y secuenciar un fragmento de gen *BT2* de los aislados clínicos estudiados.

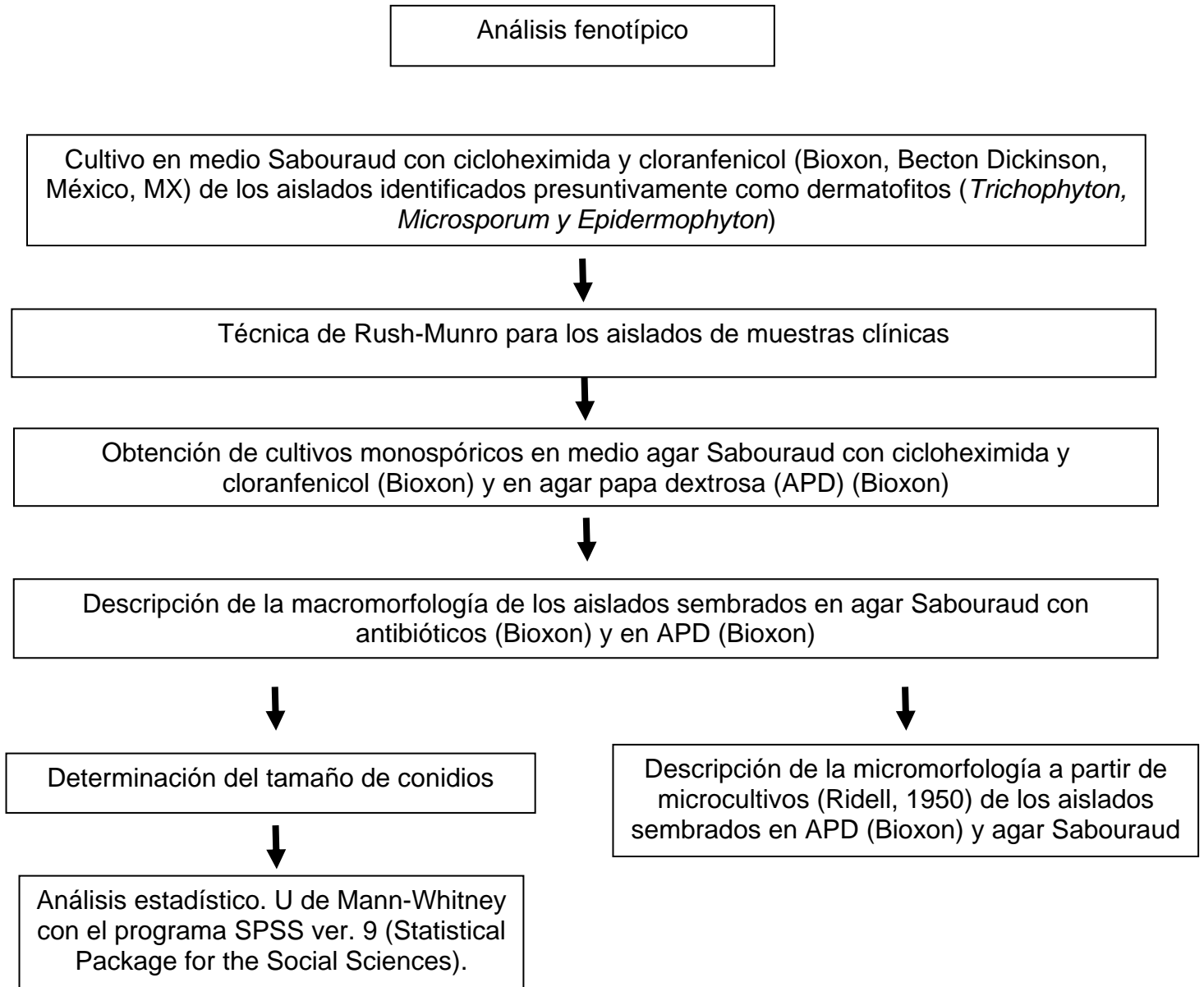
Comparar las secuencias obtenidas de los dermatofitos estudiados, con todas las secuencias de nucleótidos pertenecientes a hongos depositadas en el GenBank, a través del algoritmo BLASTn, para confirmar la identidad de la secuencia.

Realizar la identificación de los dermatofitos por inferencia filogenética, a través de un dendrograma construido por el método de Máxima Verosimilitud, con las secuencias estudiadas y las de todos los dermatofitos, depositadas en el GenBank, para identificar las especies, a través de su asociación con las especies de referencia de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama de flujo

Análisis feno y genotípico de dermatofitos procedentes de México y República Dominicana



Análisis genotípico

Sembrar el hongo en medio líquido YEPD (extracto de levadura, peptona, dextrosa) para la obtención de biomasa



Filtración de biomasa y extracción de DNA con el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)



PCR con los oligonucleótidos T1-F y Bt2b-R reportados por Rezaei-Matehkolaei *et al.* (2014)



Purificación de los productos de PCR con el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)



Secuenciación de los fragmentos amplificados (Macrogen Inc. Seoul, KOREA)



Edición de las secuencias con el programa BioEdit ver 7.2.5 (Hall, 1999)



Comparación de las secuencias obtenidas el gen *BT2*, con las secuencias depositadas en el GenBank (URL4), a través del algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997)



Construcción de la filogenia con las secuencias de los dermatofitos estudiados a través del método de Máxima Verosimilitud

Aislados. Se utilizaron 59 aislados de dermatofitos, correspondientes a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*: 23 aislados del Instituto Dermatológico y Cirugía de Piel “Prof. Dr. Huberto Díaz Boagert” de Santo Domingo, República Dominicana; 36 aislados del Hospital General Dr. Manuel Gea González de la Ciudad de México, México.

Análisis fenotípico

Primoaislamiento de los dermatofitos. Las muestras de los dermatofitos procedentes de México y República Dominicana, se sembraron en agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon, Becton Dickinson, México, MX) y se incubaron a 28 °C por 2 semanas, o hasta que se observó crecimiento de hongos filamentosos. Estos hongos fueron observados por la técnica de la cinta adhesiva transparente (Rush-Munro), que consiste en tomar una muestra del hongo con una cinta adhesiva teniendo como soporte, un portaobjetos al cual se le añadió una gota de azul de algodón. La muestra se observó en un microscopio óptico con los objetivos 10x y 40x, con la finalidad de identificar los dermatofitos. Los hongos identificados presuntivamente como dermatofitos, fueron aislados y sembrados en agar Sabouraud con antibióticos e incubados a 28 °C por 8-10 días para realizar el cultivo monospórico.

Obtención de cultivos monospóricos. Para la obtención de los cultivos monospóricos se utilizó la metodología reportada por Frías De León *et al.* (2011). A partir del primoaislamiento de los aislados, éstos fueron sembrados en medio agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y se incubaron durante

8-10 días a 28 °C, enseguida se procedió a obtener una suspensión de conidios agregando 1 mL de Tween 80 al 0.5% a cada tubo de cultivo y se ajustó la cantidad de conidios a una concentración de 50 a 100 conidios/mL, utilizando una cámara de Neubauer (BRAND, Wertheim, DE). Para obtener el número de conidios/mL se utilizó la siguiente fórmula: $(A \times 10,000)/B = N$ (A= número de células; B= número de cuadrados de la cámara contados y N= número de conidios por mL).

Una vez ajustada la concentración de conidios, se sembraron 25 µL en una caja de Petri con medio agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), el inóculo se extendió en la placa con una varilla de vidrio, las cajas se incubaron a 28 °C haciendo observaciones a las 24 y 48 horas, con el fin de obtener colonias separadas, jóvenes, sin esporular. De las colonias crecidas se eligió una y se sembró en una caja con agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y APD (Bioxon, Becton Dickinson, México, MX) y se incubó a 28 °C hasta observar esporulación abundante.

Macromorfología. La macromorfología se describió de acuerdo con lo reportado por Frías De León et al. (2011). Los aislados se sembraron en cajas de Petri con APD (Bioxon) y agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y se incubaron a 28 °C durante 4-8 días, posteriormente se observaron las características morfológicas coloniales de cada cultivo (color y aspecto de la colonia). Para el registro de los aislados se tomaron fotografías con una cámara digital (SONY Cyber-shot 8.1 mega pixeles, México, MX).

Micromorfología. Las características micromorfológicas de los dermatofitos, se analizaron mediante la técnica de microcultivo de Ridell (1950), que consiste en

cortar asépticamente bloques de 1 cm² de medio agar Sabouraud, cada bloque se colocó sobre un portaobjetos estéril y se inoculó con el aislado correspondiente, en las cuatro aristas superiores del medio de cultivo, sobre el bloque se colocó un cubreobjetos estéril y se incubó dentro de una caja de Petri a 28 °C de 4-8 días. Para evitar la deshidratación del agar durante la incubación, se colocó un algodón humedecido con agua estéril dentro de las cajas de Petri. Posteriormente, se separó cuidadosamente el cubreobjetos del agar y se depositó sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se observó al microscopio (Olympus América Inc., Melville, NY, USA), con el fin de analizar las características morfológicas de los conidios (tamaño y forma). El registro de las características microscópicas de los aislados se realizó con una cámara digital (SONY).

Tamaño de conidios. A partir de los microcultivos obtenidos de los aislados de dermatofitos, cultivados en agar Sabouraud con antibióticos e incubados a 28 °C durante 4-8 días, se midió el diámetro de 30 microconidios y 10 macroconidios, dependiendo de la especie de dermatofito, siguiendo la metodología descrita por Frías de León et al. (2011).

Análisis estadístico. Con los datos de tamaño de conidios se llevó a cabo un análisis con la prueba de U de Mann-Whitney para comparar el tamaño de los conidios de *T. rubrum* procedentes de los dos países. Los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS ver. 9 (Statistical Package for the Social Sciences).

Análisis genotípico

Extracción de DNA genómico. A partir de cada cultivo monospórico del dermatofito sembrado en APD o Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol, se inoculó el hongo en 50 mL de medio líquido YEPD (extracto de levadura, peptona, dextrosa) y se incubó a 37 °C en agitación durante 2 días o hasta observar crecimiento micelial. Se cosechó individualmente la biomasa micelial de cada aislado por filtración en filtros swinex, utilizando papel Whatman No. 1 (Merck, New York, USA) estéril. Enseguida, se lavó el micelio con agua Milli Q estéril y se secó con papel filtro estéril, posteriormente, la extracción del DNA se llevó a cabo con el Kit DNeasy Plant Mini Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, DE), de la siguiente manera: se tomaron 100 mg de masa micelial húmeda y se depositaron en microtubos de 1.5 mL con 0.2 g de perlas de vidrio previamente estériles (400 a 455 µm de diámetro lavadas previamente con ácido clorhídrico) y se adicionó el amortiguador de extracción AP1 del Kit DNeasy Plant Mini Qiagen (Qiagen). Los tubos se colocaron en un equipo FastPrep (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA) y se realizaron pruebas para definir la velocidad y tiempos óptimos de agitación para obtener la mayor cantidad de masa fúngica rota, el método que se utilizó para el rompimiento de la pared del micelio del hongo fue el propuesto por Williams *et al.* (2001).

El ensayo se inició con las siguientes condiciones: 3 periodos de 40 s a 6 m/s con 5 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Se analizaron las suspensiones de micelio resultantes bajo el microscopio (Olympus), para determinar el tiempo y velocidad óptima con la que se obtiene el mayor porcentaje de micelio roto y su contenido liberado dentro de la suspensión. Después de que se rompió el micelio,

se adicionó 4 μL de RNAsa a 100 mg/mL, se agitó vigorosamente en el vórtex y se incubó la mezcla por 10 min a 65 °C, mezclando 2 ó 3 veces, sólo por inversión. Pasados los 10 min se adicionaron 130 μL del amortiguador AP2 y se incubaron por 5 min en hielo, se centrifugaron durante 5 min a 372 g. Se transfirió el volumen total del sobrenadante a la columna lila QIAshredder mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL para centrifugarse a 427 g por un min.

El sobrenadante obtenido en el tubo colector se transfirió a un nuevo tubo y se le adicionó 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E y se mezcló rápidamente con ayuda de una micropipeta. Se transfirieron 650 μL de la mezcla anterior a la columna DNeasy mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó 1 min a 427 g desechando el sobrenadante obtenido, se repitió este paso hasta acabar el volumen. Posteriormente, se cambió el tubo colector, y se realizaron dos lavados con 500 μL del amortiguador AW, el primero se centrifugó por 1 min a 427 g y el segundo 2 min a 427 g. Por último, la columna se colocó en un microtubo nuevo de 1.5 mL, adicionándole a la membrana 100 μL de agua Milli Q, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 427g para eluir. La concentración del DNA se determinó comparando los DNAs problema con diferentes concentraciones del fago Lambda (GIBCO, Brooklyn, USA) de 10, 30 y 50 ng, por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% teñido con GelRed™ (10,000 X, Biotium Inc., Hayward, USA) dejándolo correr por un tiempo aproximado de 60 min a 100 V y se observó el gel en un fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). La concentración de los DNAs también fue calculada por espectrofotometría, se calculó la concentración de DNA considerando el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm

y la pureza se evaluó a través de la relación de absorbancias a 260/280 utilizando el espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Wilmington, DE, USA). Posteriormente, el DNA obtenido de cada uno de los aislados fue ajustado a una concentración final de 15 ng/μL para su utilización.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la identificación genotípica de aislados clínicos de dermatofitos.

Gen	Primer	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
β-tubulina (BT2)	T1-F	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	750	O'Donnell K y Cigelnik, 1997 Glass y Donaldson, 1995
	Bt2b-R	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC		

Amplificación de un fragmento del gen BT2. Se utilizaron los oligonucleótidos T1-F y Bt2b-R reportados por O'Donnell y Cigelnik (1997) y Glass y Donaldson (1995) (Tabla 1). En un volumen final de reacción de 25 μL, se emplearon 15 ng de DNA genómico, 2.0 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTPs (Applied Biosystems Inc. Foster, CA, USA), 1.0 U de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems Inc.) y 0.5 μM de cada oligonucleótido y amortiguador 1X. La amplificación se realizó en un termociclador MJ Mini™ Thermal Cycler (BioRad) con el siguiente programa de amplificación: un ciclo a 96 °C por 6 min; 35 ciclos a 94 °C por: 1 min, 56 °C por 1 min y 72 °C por 45 s y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ (10,000X). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V durante 60 min en amortiguador TBE 0.5X. El estándar de tamaño molecular que se empleó fue 100 pb DNA Ladder. Se utilizó como testigo negativo

(mezcla de reacción de PCR sin DNA). Las imágenes de los geles se capturaron en un MultiDoc-It™ Imaging System (Upland, CA, USA).

Purificación de productos de PCR. Se realizó la purificación de los productos de amplificación siguiendo el protocolo establecido por el fabricante del kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), como se menciona a continuación: se cortó el fragmento que contenía la banda para purificar asegurándose de eliminar el exceso de agarosa y se colocó en una columna de 1.5 mL, se pesó el fragmento asegurándose de no exceder los 400 mg por tubo, se agregaron 3 volúmenes de Buffer QG por un volumen de gel. Se incubó a 50 °C por 10 min o hasta que se observó la disolución del gel. Posteriormente se colocó la columna en un tubo de colección de 2 mL. Se agregó 800 µL de la muestra en el tubo de colección y se centrifugó a 427 g por 1 min, se repitió este paso hasta terminar la muestra y se centrifugó nuevamente por 1 min, se descartó el líquido del tubo y se volvió a colocar en el mismo tubo de colección. Para lavar, se agregó 750 µL de Buffer PE a la columna y se centrifugó 1 min. Se descartó el líquido del tubo de colección y se centrifugó 1 min adicional, se colocó la columna en un tubo limpio de 1.5 mL. Finalmente, se eluyó el DNA con 50 mL de agua Milli Q y se centrifugó por 1 min.

Secuenciación de los fragmentos amplificados. Una vez purificados los fragmentos de los 59 aislados de dermatofitos, se enviaron a secuenciar en ambos sentidos (Macrogen Inc. Seoul, KO).

Edición e identidad de las secuencias de los aislados de dermatofitos. Las secuencias de los aislados estudiados fueron editadas con el programa BioEdit ver. 7.1.9. (Hall, 1999). Inicialmente se revisó la secuencia para buscar la presencia de bases degeneradas, éstas fueron comparadas con el

electroferograma respectivo y se corrigieron las bases editando la secuencia. Posteriormente, se analizaron las secuencias con el algoritmo Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) para verificar la Identidad (coincidencia total entre dos secuencias), similitud (grado de coincidencia entre dos secuencias), y “e-valor” (estimación del número de alineamientos que esperamos para una puntuación X [o superior] en la búsqueda que realizamos, para que los valores fueran reales y no al azar, el valor de “e-valor” debe ser cercano a cero).

Análisis filogenético. Se utilizó el método estadístico de Máxima Verosimilitud, se utilizó una prueba de filogenia que incluye el método de bootstrap con 1,000 réplicas y el modelo evolutivo GTR G+I; se aplicó el método heurístico NNI (Nearest-Neighbor-Interchange) y el análisis se llevó a cabo con el programa MEGA7 (www.megasoftware.net/) (Kumar *et al.*, 2016).

RESULTADOS

Análisis fenotípico

Identificación de primoaislamientos. Los aislamientos de los dermatofitos obtenidos de pacientes procedentes de México y República Dominicana, que fueron sembrados en agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), e incubados a 28°C, presentaron distintas características microscópicas por la técnica de la cinta adhesiva transparente (Rush-Munro) y fueron identificadas en los tres géneros de los dermatofitos, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Aislados de dermatofitos identificados con la técnica de Rush-Munro

No. de cepa	Clave	Dermatofito
DO01	19077/15	<i>Trichophyton rubrum</i>
DO02	19102/15	<i>Microsporum canis</i>
DO03	19131/15	<i>M. canis</i>
DO04	19288/15	<i>Trichophyton</i> sp.
DO05	19321/15	<i>T. mentagrophytes</i>
DO06	19342/15	<i>T. rubrum</i>
DO10	19108/15	Pendiente
DO11	19148/15	<i>T. rubrum</i>
DO12	19373/15	<i>T. rubrum</i>
DO13	19384/15	<i>T. rubrum</i>
DO14	18733	<i>Trichophyton</i> sp.
DO15	18736	<i>T. rubrum</i>
DO17	19158/15	<i>T. rubrum</i>
DO19	19385	<i>T. rubrum</i>
DO20	19060	<i>T. rubrum</i>
DO22	19362	<i>T. rubrum</i>
DO23	19348 a	<i>T. rubrum</i>
DO24	19348 b	<i>Epidermophyton floccosum</i>
DO25	19112 a	<i>E. floccosum</i>
DO26	19112 b	<i>M. canis</i>
DO28	19074	<i>T. mentagrophytes</i>
DO30	19322	<i>M. canis</i>
MX01	JEM	<i>T. rubrum</i>
MX02	877A-15	<i>T. rubrum</i>
MX03	A16	<i>T. rubrum</i>
MX04	191-16	<i>T. rubrum</i>
MX05	Blanca Sofía	<i>T. rubrum</i>
MX06	Arturo TNK	<i>T. rubrum</i>
MX07	51-16	<i>T. rubrum</i>
MX09	88-16	<i>T. rubrum</i>
MX10	163-16	<i>T. rubrum</i>
MX11	170-16	<i>T. rubrum</i>
MX12	175-16	<i>M. canis</i>
MX14	187-16	<i>T. rubrum</i>
MX15	188-16	<i>T. rubrum</i>
MX16	194-16	<i>T. rubrum</i>
MX17	195-16	<i>T. rubrum</i>

MX18	198-16	<i>T. rubrum</i>
MX19	209-16	<i>T. rubrum</i>
MX20	212-16	<i>T. rubrum</i>
MX21	218-16	<i>T. rubrum</i>
MX23	231-16	<i>T. rubrum</i>
MX24	244-16	<i>T. rubrum</i>
MX25	250A-16	<i>T. rubrum</i>
MX26	251-16	<i>T. rubrum</i>
MX27	254B-16	<i>T. rubrum</i>
MX28	271-16	<i>T. rubrum</i>
MX29	280-16	<i>T. rubrum</i>
MX30	325	<i>T. mentagrophytes</i>
MX31	462-16	<i>T. erinacei</i>
MX32	840-15	<i>T. rubrum</i>
MX33	62C-16	<i>T. rubrum</i>
MX34	122-16	<i>T. rubrum</i>
MX35	153A-16	<i>T. rubrum</i>
MX37	276B-16	<i>T. rubrum</i>
MX38	281A-16	<i>T. rubrum</i>
MX40	510b	<i>T. rubrum</i>
MX41	882B-16	<i>T. rubrum</i>

DO-República Dominicana, MX-México

Obtención de cultivos monospóricos. Se obtuvieron cultivos monospóricos de los 59 aislados incluidos en el estudio y se conservaron como se menciona en Materiales y Métodos.

Macromorfología. De acuerdo a la morfología macroscópica, 46 aislados fueron identificados como *T. rubrum*, los cuales mostraron dos tipos de colonias en medio APD, unas de aspecto algodonoso ilimitadas, secas, de color blanco y en algunos casos de color rosa; el reverso presentó un pigmento difuso de color rojo vino, en raras ocasiones las colonias jóvenes (cuatro a cinco días) iniciaron con un color amarillento, que más tarde se transformó a rojo. El otro tipo de colonias presentaron aspecto pulverulento, planas, limitadas, radiales, de color blanco o

blanco-amarillento; el reverso de la mayoría de las colonias, presentaron pigmento rojo vino (Tabla 3).

Por otro lado, los aislados identificados como *T. rubrum*, crecidos en medio de Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol, mostraron colonias de aspecto aterciopelado, blancas, en algunos casos fueron de color amarillo, secas; sin embargo, algunos desarrollaron un pigmento difuso color rojo tenue (Tabla 3).

Cinco aislados fueron identificados como *T. mentagrophytes*. Se observaron dos tipos de colonias en medio APD: unas fueron de aspecto algodonosas, secas e ilimitadas; y no produjeron pigmento; las otras colonias presentaron un aspecto pulverulento o polvoso, planas, secas, ilimitada, de color blanco a blanco-amarillento; el reverso de la mayoría de las colonias presentaron un pigmento color beige. En ambos casos, en el medio de Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol se desarrollaron colonias pulverulentas, de color ante, que mostraron formaciones algodonosas en cultivos viejos, de borde ilimitado, y mostraron difusión de pigmento café en el reverso (Tabla 3).

Cuatro aislados fueron identificados como *M. canis*, crecidos en medio APD, los cuales mostraron colonias ilimitadas, de aspecto vellosa, planas, radiales, de color blanco; el reverso de las colonias presentó un pigmento amarillo-naranja, difusible a través del medio. Estos aislados, cultivados en medio de Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol, presentaron pleomorfismo, observándose colonias con aspecto de rebanadas de toronja, de color amarillo paja (Tabla 3).




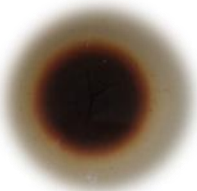









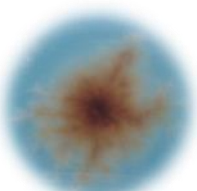
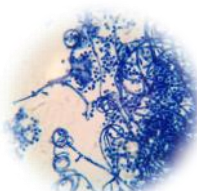









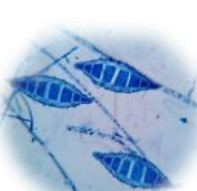
Asimismo, se identificó un solo aislado correspondiente a *M. gypseum*, el cual en medio APD, mostró colonias ilimitadas, pulverulentas, de color beige, el reverso no desarrolló pigmento. En el medio de Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol,

desarrolló colonias irregulares, pulverulentas, de color blanco, mientras que el reverso mostró un color de café claro (Tabla 3).

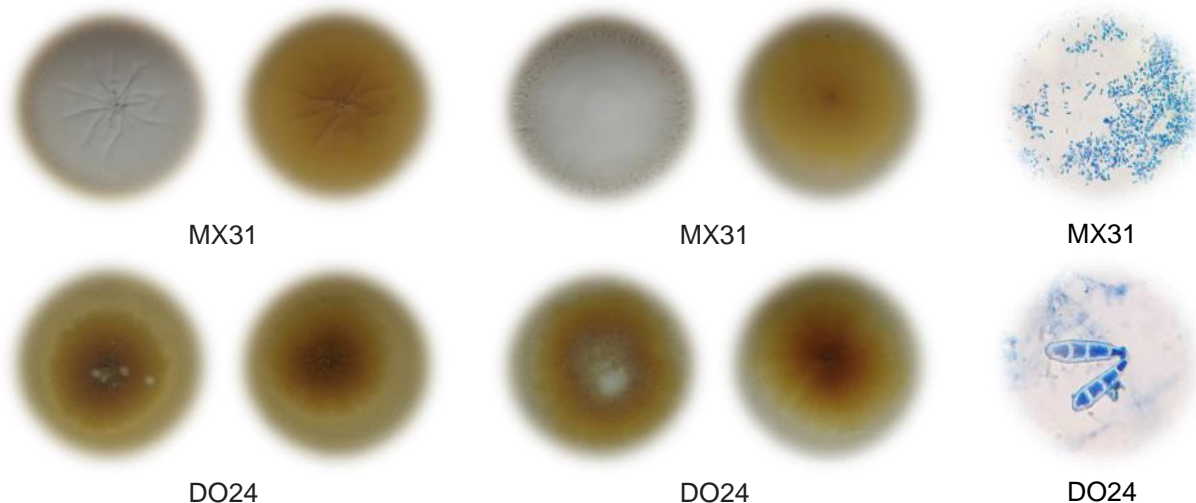
Además, dos aislados fueron identificados como *E. floccosum*, en medio APD presentaron colonias limitadas, aterciopeladas, de color blanco-beige, con aspecto crateriforme, el reverso presentó un pigmento amarillento, difusible al medio. En medio de Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol, se observaron colonias ilimitadas, de color verde olivo, con aspecto de rebanada de piña (Tabla 3).

Finalmente, un solo aislado fue identificado como *T. erinacei*, en medio APD presentó colonias algodonosas, secas e ilimitadas, el reverso presentó un pigmento de color ante. En medio de Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol, se observaron colonias blancas, pulverulentas, limitadas y con un centro de aspecto crateriforme y el reverso de la colonia desarrolló un pigmento de color café (Tabla 3).

Tabla 3. Morfología macro y microscópica de dermatofitos procedentes de México y República Dominicana en los medios Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol y agar papa dextrosa.

Especie	Macroscopía				Microscopía
	Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol		Agar papa dextrosa		Agar papa dextrosa
<i>T. rubrum</i>					
	MX28		MX28		MX28
<i>T. tonsurans</i> (identificado por métodos fenotípicos como <i>T. rubrum</i>)					
	MX32		MX32		MX32
<i>T. interdigitale</i> (identificado por métodos fenotípicos como <i>T. mentagrophytes</i>)					
	DO04		DO04		DO04
<i>M. audouinii</i> (identificado por métodos fenotípicos como <i>T. rubrum</i>)					
	DO14		DO14		DO14
<i>A. otae</i> (identificado por métodos fenotípicos como <i>M. gypseum</i>)					
	DO03		DO03		DO03

A. benhamie
(identificado
por métodos
fenotípicos
como *T.*
erinacei)



E. floccosum

Micromorfología. La micromorfología, permitió identificar a los 36 aislados procedentes de México como sigue: 33 se identificaron como *T. rubrum*, 1 como *M. canis*, 1 como *T. mentagrophytes* y 1 como *T. erinacei*. Mientras que los 23 aislados procedentes de República Dominicana fueron identificados como sigue: 13 se identificaron como *T. rubrum*, 4 como *T. mentagrophytes*, 3 como *M. canis*, 2 como *E. floccosum* y 1 como *M. gypseum*.

La morfología observada en los microcultivos, obtenidos con Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol y APD, fue idéntica. Los hongos identificados como *T. rubrum* (aspecto algodonoso) mostraron la siguiente morfología: abundantes hifas delgadas, tabicadas, de alrededor de 2 μm de diámetro. Mientras que, *T. rubrum* (aspecto pulverulento), presentaron gran cantidad de microconidios, piriformes, de 2 a 4 μm de largo, dispuestos por lo general de forma alterna. En general producen pocos macroconidios o están ausentes; éstos son de forma alargada, con un extremo redondeado, de superficie lisa y miden de 15 a 20 μm de largo por 4 a 6 μm de ancho.

Los hongos identificados como *T. mentagrophytes* (aspecto algodonoso), mostraron la siguiente morfología: micelio delgado, tabicado, abundantes zarcillos y/o hifas en espiral.

Los hongos identificados como *T. mentagrophytes* (aspecto pulverulento), mostraron la siguiente morfología: abundante micelio delgado, tabicado, con gran cantidad de microconidios libres, redondos o piriformes; estos últimos originados de las hifas, en forma alterna o en “cruces de Lorena”. Presentaron escasos macroconidios en forma de puro, de paredes lisas con 2 a 4 tabiques o lóculos, con un tamaño entre 20-40 μm de largo por 6-8 μm de ancho.

Los hongos identificados como *M. canis* mostraron la siguiente morfología: abundante micelio, hifas delgadas, tabicadas y ramificadas, con gran cantidad de macroconidios en forma de huso, con tamaños entre 50 a 100 μm de largo por 10 a 20 μm de ancho; éstos poseen una membrana gruesa. Ocasionalmente, los macroconidios presentaron espículas, con 6 a 9 septos o lóculos bien definidos en forma de recuadros; con un tamaño de 6-12 μm . La mayoría de los aislados mostró pocos microconidios piriformes de 3 a 5 μm de largo, dispuestos en forma alterna.

El hongo identificado como *M. gypseum*, mostró la siguiente morfología: micelio delgado, septado, numerosos macroconidios en forma de huso con 4 a 6 lóculos pequeños, con paredes delgadas y pequeñas espículas. También se observaron escasos microconidios piriformes.

Los hongos identificados como *E. floccosum*, mostraron la siguiente morfología: micelio delgado, septado, con macroconidios en forma de bastos, con una base

delgada y un extremo romo. En aislados viejos se observan numerosos clamidoconidios intercalares y terminales.

Finalmente, el hongo identificado como *T. erinacei*, mostró la siguiente morfología: abundante micelio delgado y tabicado, se observaron abundantes microconidios esféricos y piriformes, no se observaron macroconidios.

Tamaño de conidios. El diámetro de los microconidios, de los aislados procedentes de México y República Dominicana, fueron: para *T. rubrum* fue de 1.41 a 2.27 μm ; para *T. mentagrophytes* de 2.10 a 2.99 μm y para *T. erinacei* de 1.77 μm . El diámetro de los macroconidios, de los aislados procedentes de República Dominicana fueron: para *T. mentagrophytes* de 5.26 a 7.17 μm , cabe resaltar que el aislado de *T. mentagrophytes*, así como los aislados de *T. rubrum* y *T. erinacei*, procedentes de México, no presentaron macroconidios.

Con respecto al tamaño de los macroconidios, de las especies del género *Microsporum*, fue como sigue: Para *M. canis* fue de 14.12 a 17.42 μm y para *M. gypseum* fue de 18.66 μm y los microconidios sólo se observaron en un aislado de *M. canis* procedente de República Dominicana y fue de 1.72 μm .

Finalmente, el tamaño de macroconidios para *E. floccosum* fue de 6.29 a 7.94 μm .

Es importante mencionar que el tamaño de los conidios reportados en el presente trabajo, coinciden con lo reportado en la literatura (Kwon-Chung y Bennett, 1992).

La Tabla 4, muestra el tamaño de conidios de las especies de dermatofitos identificadas por métodos fenotípicos y por país, asimismo, también se muestra el tamaño de conidios de las especies de dermatofitos, identificados por métodos genotípicos, ya que algunas especies fueron reubicadas después de realizar el análisis filogenético.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se llevó a cabo después de realizar el análisis filogenético, ya que éste nos proporcionó la ubicación correcta de las especies, a través de la prueba de U de Mann-Whitney, esta prueba mostró que el tamaño de los conidios de los dos países fueron diferentes ($p= 0.001$).

Tabla 4. Tamaño de conidios de aislados de dermatofitos

Especies identificadas	Caracterización fenotípica				Caracterización genotípica			
	México		República Dominicana		México		República Dominicana	
	Número de aislados	Diámetro de conidios (\bar{X}) μm	Número de aislados	Diámetro de conidios (\bar{X}) μm	Número de aislados	Diámetro de conidios (\bar{X}) μm	Número de aislados	Diámetro de conidios (\bar{X}) μm
<i>T. rubrum</i>	33	1.63 ¹	13	1.96 ¹	32	1.62 ¹	9	1.88 ¹
<i>T. tonsurans</i>	-	-	-	-	1	1.80 ¹	3	2.18 ¹
<i>T. mentagrophytes</i>	1	2.82 ¹	4	2.50 ¹	-	-	-	-
<i>T. interdigitale</i>	-	-	-	-	1	2.82 ¹	4	2.50 ¹
<i>M. canis</i>	1	15.88 ²	3	15.40 ²	-	-	-	-
<i>M. gypseum</i>	-	-	1	18.66 ²	-	-	-	-
<i>A. otae</i>	-	-	-	-	1	15.88 ²	4	16.21 ²
<i>M. audouinii</i>	-	-	-	-	-	-	1	11.75 ²
<i>T. erinacei</i>	1	1.77 ¹	-	-	-	-	-	-
<i>A. benhamie</i>	-	-	-	-	1	1.77 ¹	-	-
<i>E. floccosum</i>	-	-	2	7.12 ²	-	-	2	7.12 ²

\bar{X} =promedio; ¹Microconidios; ²Macroconidios

Caracterización genotípica

Extracción de DNA genómico. Se obtuvieron concentraciones de DNA muy variables. La cuantificación y pureza de los DNAs de los aislados estudiados se determinó por espectrofotometría, donde se obtuvieron valores de 1.6-2.1 con la relación 260/280, lo que mostró que la pureza es aceptable ya que se encuentra dentro de los valores óptimos de 1.8-2.0. Además, los DNAs presentaron concentraciones entre 10.25-1451.60 ng/ μL (Tabla 5). En la figura 1 se muestra un ejemplo de la cuantificación de DNA por electroforesis y comparándolo con

diferentes concentraciones del fago λ . Los DNAs presentaron una concentración de 10-100 ng/ μ L.

Tabla 5 .Cuantificación de DNA por espectrofotometría.

Clave	Clave interna	[DNA] ng/μL	Clave	Clave interna	[DNA] ng/μL
19077/15	DO01	15.08	88-16	MX09	29.93
19102/15	DO02	11.73	163-16	MX10	23.03
19131/15	DO03	13.45	170-16	MX11	18.45
19288/15	DO04	38.15	175-16	MX12	43.35
19321/15	DO05	16.85	187-16	MX14	28.93
19342/15	DO06	47.60	188-16	MX15	219.83
19108/15	DO10	10.25	194-16	MX16	36.88
19148/15	DO11	26.70	195-16	MX17	35.25
19373/15	DO12	14.90	198-16	MX18	27.60
19384/15	DO13	36.80	209-16	MX19	44.45
18733	DO14	22.80	212-16	MX20	23.93
18736	DO15	36.03	218-16	MX21	14.85
19158/15	DO17	70.90	231-16	MX23	396.03
19186/15	DO18	593.58	244-16	MX24	21.25
19385/15	DO19	28.55	250A-16	MX25	43.58
19060	DO20	388.18	251-16	MX26	57.50
19362	DO22	19.30	254B-16	MX27	50.45
19348a	DO23	15.70	271-16	MX28	842.87
19348b	DO24	263.47	280-16	MX29	10.30
19112a	DO25	108.07	325	MX30	803.17
19112b	DO26	124.15	462-16	MX31	115.13
19074	DO28	79.70	840-15	MX32	447.38
19322	DO30	17.50	62C-16	MX33	653.02
JEM	MX01	15.13	122-16	MX34	784.80
877A-15	MX02	41.98	153A-16	MX35	1451.60
A16	MX03	19.75	276B-16	MX37	821.48
191-16	MX04	42.78	281A-16	MX38	243.92
Blanca Sofía	MX05	71.75	510b	MX40	1021.22
Arturo TNK	MX06	36.53	882B-16	MX41	257.88
51-16	MX07	15.95	-	-	-

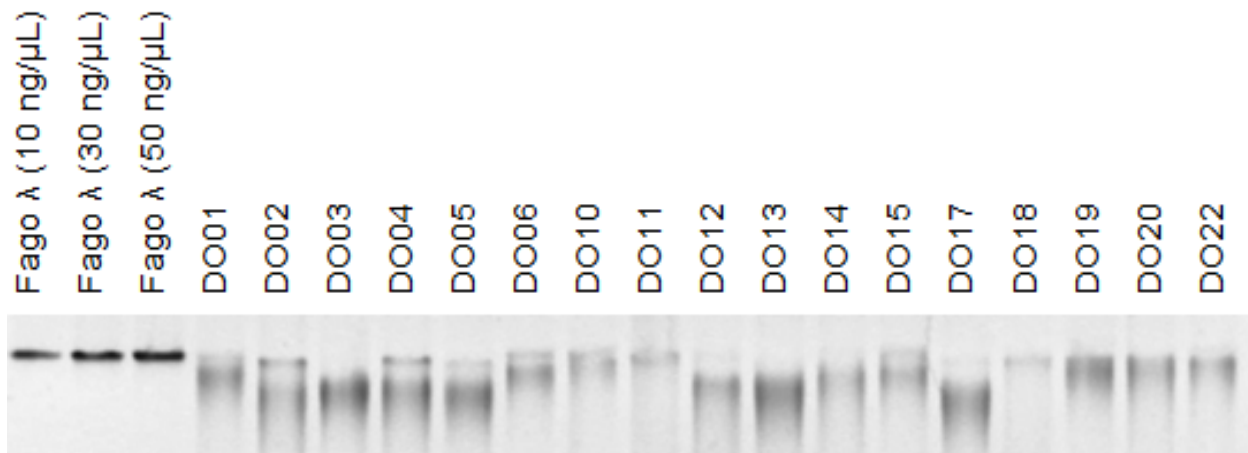


Figura 1. Cuantificación de DNA obtenido de distintos aislados de dermatofitos. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ (10,000X, Biotium, USA) y se comparó con distintas concentraciones de fago λ.

Amplificación de la secuencia parcial del gen *BT2*. Se utilizaron las condiciones reportadas Rezaei-Matehkolaei *et al.* (2014) y las concentraciones de DNA se ajustaron a 15 ng/μL. En la figura 2 se muestra un ejemplo de la amplificación por PCR, con DNAs de los aislados estudiados y el amplicón esperado de 750 pb.

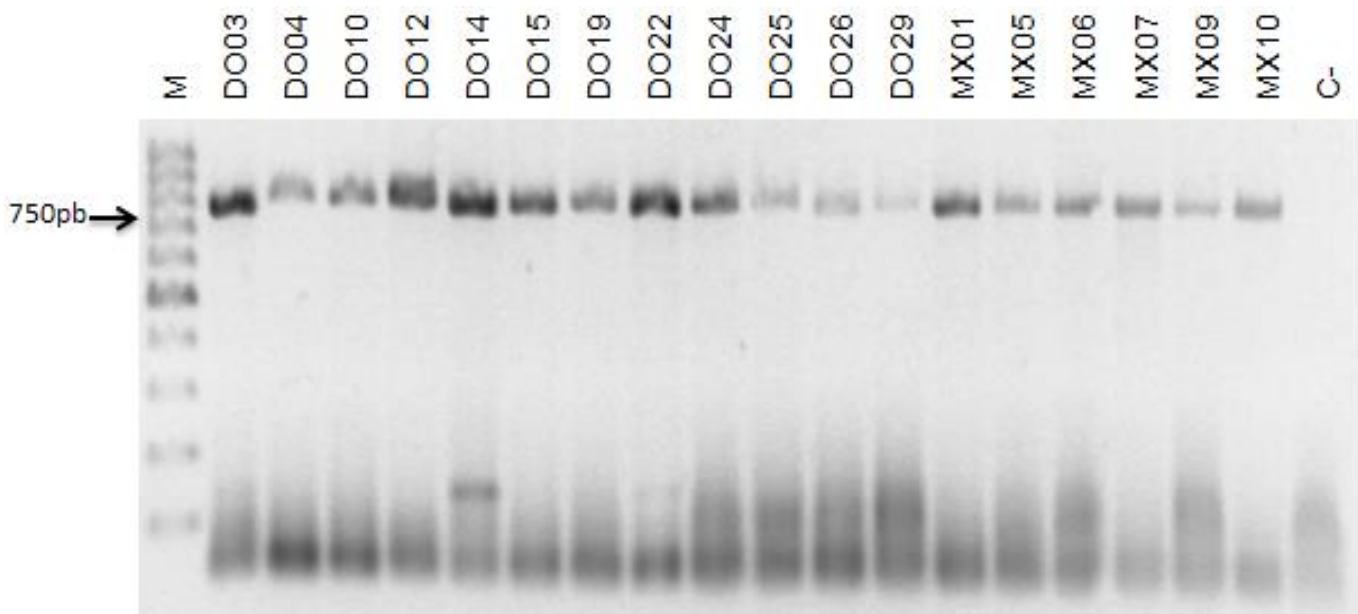


Figura 2. PCR con el gen de *BT2* de DNA de aislados de dermatofitos. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ (10,000X, Biotium, USA). M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder.

Identidad de las secuencias de los dermatofitos procedentes de México y República Dominicana. A partir de las secuencias editadas, y comparadas con las secuencias del GenBank, se obtuvieron los valores de similitud, expectación e identidad que se tomaron en cuenta para corroborar la amplificación correcta del fragmento del gen *BT2*. Las secuencias analizadas presentaron un porcentaje de similitud en el rango de 95-100% y una identidad en el rango de 98-100% (Tabla 6). De los 40 aislados procedentes de México 36 correspondieron a *T. rubrum*, uno a *A. otae*, uno a *T. interdigitale*, uno a *A. benhamie* y uno a *T. tonsurans*. De los 26 aislados procedentes de República Dominicana, 10 correspondieron a *T. rubrum*, 4 a *A. otae*, 4 a *T. interdigitale*, 2 a *T. tonsurans*, 2 a *E. floccosum* y uno a *M. audouinii* (Tabla 6). Con base en las especies identificadas, se eligieron secuencias de referencia reportadas en el GenBank, de las diferentes especies de dermatofitos amplificadas con el gen *BT2*, para llevar a cabo el análisis filogenético.

Tabla 6. Identidad de las secuencias de los dermatofitos procedentes de México y República Dominicana

Clave	Clave interna	Identificación fenotípica	Identificación genotípica	% de similitud	Valor de expectación	% de identidad
19077/15	DO01	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
19102/15	DO02	<i>M. gypseum</i>	<i>A. otae</i>	100	0	100
19131/15	DO03	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	99	0	100
19288/15	DO04	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	99	0	100
19321/15	DO05	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	99	0	99
19342/15	DO06	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0	99
19108/15	DO10	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
19148/15	DO11	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
19373/15	DO12	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
19384/15	DO13	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	99	0	100
18733	DO14	<i>T. rubrum</i>	<i>M. audouinii</i>	99	0	99
18736	DO15	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	99	0	99
19158/15	DO17	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
19186/15	DO18	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	100	0	99
19385/15	DO19	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	100	0	99
19060	DO20	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
19362	DO22	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
19348a	DO23	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
19348b	DO24	<i>E. floccosum</i>	<i>E. floccosum</i>	100	0	99
19112a	DO25	<i>E. floccosum</i>	<i>E. floccosum</i>	99	0	100
19112b	DO26	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	99	0	99
19074	DO28	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	96	0	100
19322	DO30	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	100	0	100
JEM	MX01	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
877A-15	MX02	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	99	0	100
A16	MX03	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
191-16	MX04	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
Blanca Sofia	MX05	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	99	0	99
Arturo TNK	MX06	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
51-16	MX07	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
88-16	MX09	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	99	0	99
163-16	MX10	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
170-16	MX11	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
175-16	MX12	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	100	0	99
187-16	MX14	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	99	0	100

188-16	MX15	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
194-16	MX16	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
195-16	MX17	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	99	0	99
198-16	MX18	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
209-16	MX19	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
212-16	MX20	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	97	0	98
218-16	MX21	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	99	0	100
231-16	MX23	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	99	0	100
244-16	MX24	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
250A-16	MX25	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
251-16	MX26	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
254B-16	MX27	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	96	0	100
271-16	MX28	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	99
280-16	MX29	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
325	MX30	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0	100
462-16	MX31	<i>T. erinacei</i>	<i>A. benhamie</i>	100	0	100
840-15	MX32	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	100	0	99
62C-16	MX33	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
122-16	MX34	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	95	0	99
153A-16	MX35	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
276B-16	MX37	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	96	0	99
281A-16	MX38	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
510b	MX40	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100
882B-16	MX41	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100	0	100

Las especies resaltadas en negritas corresponden a las especies reubicadas por métodos genotípicos.

Análisis de las secuencias del gen *BT2*. Análisis de las secuencias. Con las secuencias obtenidas, una vez editadas y alineadas se eligió el mejor modelo evolutivo. Para el caso de Máxima Verosimilitud se consideró el valor de información de AKAIKE (AIC) y el mejor modelo evolutivo para las secuencias del gen *BT2* fue GTR+G+I.

Máxima Verosimilitud con el gen *BT2*. Con el propósito de determinar la posición filogenética de los aislados de los diferentes géneros de dermatofitos se construyó un árbol con el método de Máxima Verosimilitud (Figura 3). Este árbol

formó siete grupos; el grupo I incluyó a los aislados identificados previamente como *T. rubrum*, y formó dos subgrupos, el subgrupo Ia, que incluyó 37 aislados y el subgrupo Ib con 4 aislados, que se agruparon con la secuencia de referencia de *T. rubrum* con número de acceso JF731056.1, con un bootstrap de 100%. El grupo II fue integrado por 4 aislados, identificados previamente como *T. rubrum* y el análisis filogenético lo asoció con la secuencia de referencia de *T. tonsurans* con número de acceso de JF731068.1, con un bootstrap de 85.4%. El grupo III fue integrado por 5 aislados, identificados previamente como *T. mentagrophytes* y el análisis filogenético lo asoció con la secuencia de referencia de *T. interdigitale* con número de acceso de JF731046.1, con un bootstrap de 70.6%. El grupo IV lo integró el aislado identificado previamente como *T. erinacei* y el análisis filogenético lo asoció con la secuencia de referencia de *A. benhamie* con número de acceso de JF731114.1, con un bootstrap de 99.9%. El grupo V fue integrado por 2 aislados, identificados previamente como *E. floccosum* y el análisis filogenético lo asoció con la secuencia de referencia de *E. floccosum* con número de acceso de JF731122.1, con un bootstrap de 100%. El grupo VI estuvo integrado por 1 aislado, identificado previamente como *T. rubrum* y el análisis filogenético lo asoció con la secuencia de referencia de *M. audouinii* con número de acceso de JF731113.1, con un bootstrap de 96.6%. Finalmente el grupo VII, integrado por 5 aislados, 4 identificados previamente como *M. canis* y 1 como *M. gypseum*, el análisis filogenético asoció este último, con la secuencia de referencia de *A. otae* con número de acceso de JF731099.1, con un bootstrap de 99.5%. El soporte de todos los grupos se dio por la Máxima Verosimilitud y bootstrap (con un intervalo de 70-100%).

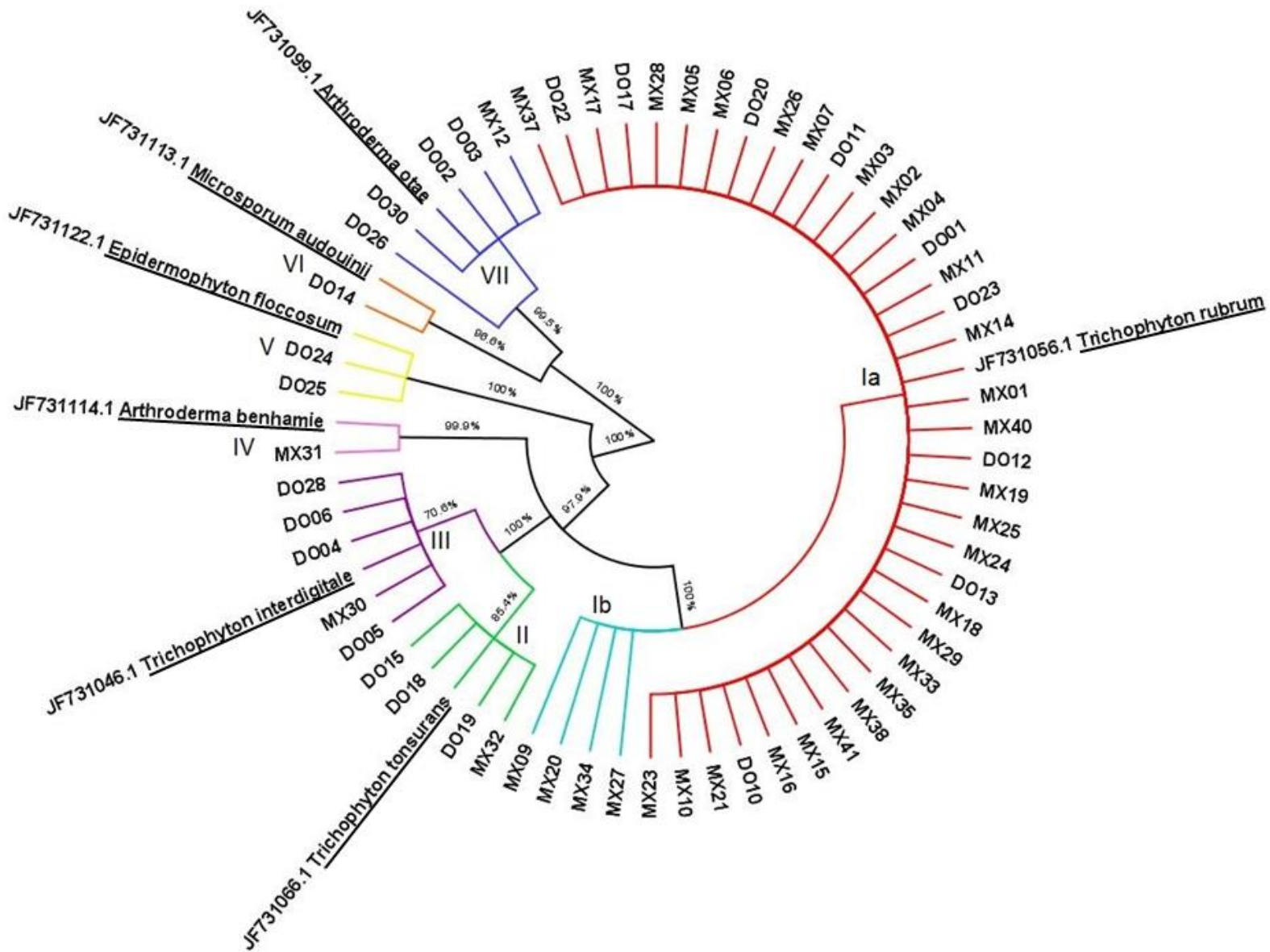


Figura 3. Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud, con las secuencias parciales del gen *BT2* amplificado del DNA de aislados de las diferentes especies de dermatofitos. Se utilizó el programa MEGA7. Rojo: subgrupo Ia (*T. rubrum*); azul claro: subgrupo Ib (*T. rubrum*); verde: grupo II (*T. tonsurans*); morado: grupo III (*T. interdigitale*); rosa: grupo IV (*A. benhamiae*); amarillo: grupo V (*E. floccosum*); anaranjado: grupo VI (*M. audouinii*) y azul: grupo VII (*A. otae*).

DISCUSIÓN

Las micosis superficiales son comunes en todo el mundo, éstas afectan entre el 20 y el 25% de la población mundial, y su incidencia continúa en aumento (Havlickova *et al.*, 2008), estas infecciones son predominantemente causadas por dermatofitos, y las especies causales varían con la región geográfica.

Pocos estudios han investigado la etiología de la infecciones fúngicas en países en desarrollo y en consecuencia, hay menos conocimiento de los cambios en su epidemiología. Es difícil determinar con certeza la incidencia global y la prevalencia de las diversas enfermedades de la piel causadas por micosis superficiales en diferentes partes del mundo, debido a que estudios de una región dentro de un país, pueden no ser representativos del patrón general de enfermedad de ese país. Además, las cifras de incidencia y prevalencia sólo pueden ser representativas de la población muestreada, lo cual puede estar asociada con factores de riesgo para la infección, por lo que este estudio tuvo como objetivo identificar correctamente las especies de dermatofitos procedentes de México y República Dominicana de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* por métodos feno y genotípicos.

La identificación por macromorfología no fue diferente a lo reportado para las especies de interés clínico, sin embargo, sólo se observaron pequeños cambios en la morfología colonial como es la variación en el pigmento y el aspecto de la colonia. Por otro lado también encontramos casos en los que al ser recuperados estos aislados de muestras clínicas presentaron baja o nula esporulación. Estos hechos justifican la dificultad de identificar a los dermatofitos por características fenotípicas, por lo que en este trabajo con la micro y macromorfología se pudieron

identificar los aislados pertenecientes a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, y dentro de éstos se identificaron las siguientes especies: *T. rubrum* (46), *T. mentagrophytes* (5), *M. canis* (4), *M. gypseum* (1), *E. floccosum* (2) y *T. erinacei* (1).

En el diámetro de los conidios de los aislados de México correspondientes a *T. rubrum*, (1.62 μm), *T. tonsurans* (1.80 μm) y *T. interdigitale* (2.82 μm), se observó diferencias entre los tamaños de conidios de las tres especies. Por otro lado, en el diámetro de los conidios de los aislados de República Dominicana correspondientes a *T. rubrum* (1.88 μm), *T. tonsurans* (2.18) y *T. interdigitale* (2.50 μm), también se observaron diferencias entre los tamaños de conidios de las tres especies. Además se observaron diferencias significativas entre los tamaños de conidios de los aislados de *T. rubrum*, procedentes de México y República Dominicana, donde estos últimos presentaron un tamaño mayor ($p=0.001$). Estos hallazgos se pueden deber a que las características fenotípicas pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales que rodean el sitio donde el hongo crece ya que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el medio ambiente y, por tanto, es probable que se modifiquen cuando las condiciones ambientales tales como el clima, la edad del cultivo o de la temperatura de incubación varíen. Además, también puede ser el caso de que la información genética no esté completamente expresada y el fenotipo refleje sólo una pequeña parte de esta información. Las diferencias fenotípicas asociadas con áreas geográficas también se han observado en otros patógenos humanos, tales como *S. schenckii*, ya que un estudio realizado por Mesa-Arango *et al.* (2002), quienes analizaron aislados de este hongo

procedentes de diferentes regiones geográficas (México, Colombia y Guatemala), observaron que los aislamientos de Colombia eran resistentes al calor y tenían conidios más grandes que los de México y que los de Guatemala.

Por otro lado, debido a que es ampliamente aceptado que la identificación morfológica y otros métodos convencionales para la identificación de dermatofitos pueden ser insuficientes y propensos a errores (Robert y Pihet, 2008), especialmente la discriminación entre *T. interdigitale* y *T. rubrum*, debido a la variabilidad fenotípica (diferentes formas de microconidios, baja tasa de incidencia de macroconidios) y el pleomorfismo (la espontánea aparición de mechones blancos esponjosos de micelio aéreo sobre la superficie de colonias, que resulta en la pérdida de la pigmentación característica y conidiación) (Abdel-Rahman, 2008, Graser *et al.*, 2000, Weitzman and Summerbell, 1995). Por lo tanto, con el propósito de realizar una identificación más eficiente, se han utilizado técnicas de biología molecular para llevar a cabo estudios de filogenia de los dermatofitos, inicialmente se utilizó el contenido G+C de DNA cromosómico (Davidson *et al.*, 1980), homología de DNA total (Davidson *et al.*, 1984), posteriormente, el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) análisis de DNA mitocondrial (mtDNA) (de Bièvre *et al.*, 1987; Kawasaki *et al.*, 1992; 1996; Mochizuki *et al.*, 1990; Nishio *et al.*, 1992), amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) (Gräser *et al.*, 1998; Kano *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997; Mochizuki *et al.*, 1997), y la determinación de la secuencia de bases de 18S (Harmsen *et al.*, 1995) o 28S (Leclerc *et al.*, 1994) del rRNA o DNA ribosomal (rDNA). Aun con estas herramientas, las relaciones filogenéticas de las especies de dermatofitos en ocasiones no pueden ser totalmente definidas por estos

métodos. Sin embargo, durante la última década, se han obtenido avances importantes con la sistemática moderna, utilizando otros marcadores moleculares como son: regiones del espaciador interno transcrito 1 (ITS1) e ITS2 del rDNA (Gräser *et al.*, 2008). Estos marcadores han demostrado ser útiles en resolver las relaciones entre organismos taxonómicamente relacionados (Berbee *et al.*, 1995; Carbone *et al.*, 1993; Lobuglio *et al.*, 1993). Otro marcador que es un segmento del gen que codifica para la β -tubulina, ha sido utilizado con éxito para la delimitación de las especies en otros grupos de hongos, tales como, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Scedosporium* y *Phaeoacremonium* (Balajee *et al.*, 2009; Gilgado *et al.*, 2005; Mostert *et al.*, 2005; Serra y Peterson, 2007). Debido a las características de este marcador, en este trabajo se utilizó para identificar a los dermatofitos estudiados a través del algoritmo BLASTn, y por análisis filogenético, éstos análisis permitieron la reubicación de 16 especies, inicialmente identificadas por métodos fenotípicos como especies distintas a las identificadas por métodos genotípicos, como es el caso del aislado MX31, fenotípicamente identificado como *T. erinacei*, y reubicado genotípicamente como *A. benhamie*, asimismo, los aislados que habían sido identificadas fenotípicamente como *T. rubrum* (MX32, RD15, RD18 y RD19) se reubicaron como *T. tonsurans*; los aislados que habían sido identificadas fenotípicamente como *T. mentagrophytes* (MX30, RD04, RD05, RD06 y RD28) se reubicaron como *T. interdigitale*, el aislado que habían sido identificado fenotípicamente como *T. rubrum* (RD14) se reubicó como *M. audouinii*. Finalmente, los aislados que habían sido identificadas fenotípicamente como *M. canis* (MX12, RD02, RD26 y RD30M) y como *M. gypseum* (RD03) se

reubicaron como *A. otae*. Estos resultados resaltan la importancia de un enfoque polifásico para la identificación certera de especies de dermatofitos, ya que una incorrecta identificación puede incidir directamente en el tratamiento para el paciente.

Por otro lado, también se observó que de las 59 muestras clínicas de dermatofitos de pacientes procedentes de México y República Dominicana, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *A. otae* se establecieron como las principales especies de dermatofitos, causando cerca del 76.3%, 8.5% y 6.8% de infecciones fúngicas superficiales (piel, pelo y uñas), respectivamente (Tabla 6). Es importante mencionar que estos datos concuerdan con los reportados para las dermatofitosis en todo el mundo, donde *T. rubrum*, *T. tonsurans* y *M. canis* se consideran principales agentes causales (Ameen, 2010).

En Europa Occidental, *T. rubrum* es el dermatofito que se aísla con mayor frecuencia en casos de *tinea corporis* y *tinea cruris*. Mientras que *T. rubrum* es también la causa más común de *tinea pedis* y *tinea unguium*, el cual puede actuar como un reservorio para causar *tinea corporis* o *cruris* a través de autoinoculación (Ameen, 2010).

Los dermatofitos antropofílicos, en particular *T. tonsurans*, ha surgido como un agente dominante en muchas regiones, tiene distribución mundial y causa principalmente *tinea capitis*, pero también puede causar *tinea corporis* y *tinea unguium* (Ameen, 2010). Por lo que, en un futuro cercano puede convertirse en un importante agente de *tinea corporis*. Asimismo, en Estados Unidos de América, *T. tonsurans* es responsable del 50% de todas las infecciones por dermatofitos y dentro de éstos el 90% de los casos corresponde a *tinea capitis* (Ghannoum *et al.*,

2000). Se cree que en los 1950s *T. tonsurans* migró de América Central y el Caribe hacia el sur de Estados Unidos de América y se estableció en regiones urbanas. En el resto del Continente Americano, los principales agentes de la *tinea capitis* son *M. canis* y *T. tonsurans*. En la región meridional de Brasil, *M. canis* es responsable del 60% de los casos (Fernandes *et al.*, 2001). En el Noreste, sin embargo, *T. tonsurans* representó el 74% de los casos y *M. canis* sólo en un pequeño número casos de *tinea capitis* (Brilhante *et al.*, 2000). En México, *M. canis* es el agente más común, seguido por *T. tonsurans* (Rebollo *et al.*, 2008). En Perú, *M. canis* es el más común (Vidotto *et al.*, 1991). En Europa, *M. canis* permanece como el agente más común para *tinea capitis* en general. Su incidencia está aumentando, y es el agente dominante en el sur de Europa, con países tales como Austria, España, Italia y Grecia, donde se ha reportado el más alto número de casos de *M. canis* (Romano *et al.*, 1999, Hay *et al.*, 2001, Frangoulis *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos con la identificación fenotípica, se confirmó que dicho análisis no es suficiente para una identificación confiable, por esto, es necesaria la implementación de métodos genotípicos.

El estudio filogenético realizado con el marcador molecular *BT2*, contribuyó a identificar a los dermatofitos de acuerdo con la resolución de las relaciones filogenéticas entre las secuencias de referencia y las secuencias de los dermatofitos estudiados amplificadas con el gen *BT2*.

PERSPECTIVAS

Llevar a cabo un estudio filogenético con un mayor número de aislados de dermatofitos procedentes de Centroamérica, utilizando identificación fenotípica y genotípica con tres marcadores moleculares, ya que no existen trabajos a nivel filogenético en esta área geográfica.

REFERENCIAS

1. Abdel-Rahman, SM. Strain differentiation of dermatophytes. *Mycopathologia*. 2008; 166 (5-6): 319–333.
2. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25 (17): 3389-3402.
3. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol*. 2010; 28 (2): 197-201.
4. Arenas R, Torres E, Amaya M, Rivera ER, Espinal A, Polanco M, Fernández R, Isa-Isa R. *Tinea capitis*. Emergencia de *Microsporum audouinii* y *Trichophyton tonsurans* en República Dominicana. *Actas Dermosifilogr*. 2010; 101 (4): 330-335.
5. Arenas R. Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol*. 2002; 19: 63-67.
6. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Peterson S, Brandt ME, Pappas PG, Chiller T. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol*. 2009; 47 (10): 3138-3141.

7. Bassiri-Jahromi S, Khaksari AA. Epidemiological survey of dermatophytosis in Tehran, Iran, from 2000 to 2005. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009; 75 (2): 142-147.
8. Berbee ML, Yoshimura A, Sugiyama J, Taylor JW. Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family Trichocomaceae from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia.* 1995; 87 (2): 210-222.
9. Bonifaz A. Aspectos micológicos de las micosis más frecuentes en México. *Medicine* 1988; 19: 2380-2385.
10. Brilhante RS, Paixão GC, Salvino LK, et al. Epidemiology and ecology of dermatophytoses in the City of Fortaleza: *Trichophyton tonsurans* as important emerging pathogen of tinea capitis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33 (5): 417-25.
11. Cafarchia C, Romito D, Capelli G, Guillot J, Otranto D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. *Vet Dermatol.* 2006; 17 (5): 327-331.
12. Carbone I, Kohn LM. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia.* 1993; 85 (3): 415-427.
13. Davidson FD, Mackenzie DWR. DNA homology studies in the taxonomy of dermatophytes. *Sabouraudia.* 1984; 22 (2): 117–123.
14. Davidson, FD, Mackenzie, DWR, Owen, R.J. Deoxyribonucleic acid base compositions of dermatophytes. *J. Gen. Microbiol.* 1980; 118 (2), 465–470.

15. de Bièvre C, Dauguet C, Nguyen VH, Ibrahim-Granet O. Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1987; 138 (6): 719-27.
16. Espinal A, Herrera MC, Sánchez E, Isa R, Miniño M, Cruz AC, Arenas R. Tiña de la cabeza en República Dominicana. Estudio de 285 casos en encuestas epidemiológicas en diferentes zonas geográficas que incluyeron zona urbana, rural y rural marginal. *Rev Dom Dermatol.* 2010; 37 (1): 11-15.
17. Fernandes NC, Akiti T, Barreiros MG. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2001; 43 (2): 83-5.
18. Frangoulis E, Athanasopoulou B, Katsambas A. Etiology of tinea capitis in Athens, Greece-a 6-year (1996-2001) retrospective study. *Mycoses* 2004; 47 (5-6): 208-12.
19. Frías-De León MG, Zavala-Ramírez M, Córdoba S, Zúñiga G, Duarte-Escalante E, Pérez-Torres A, Zepeda-Rodríguez A, López-Martínez I, Buitrago MJ, Reyes-Montes MR. Phenotypic characteristics of isolates of *Aspergillus* section *Fumigati* from different geographic origins and their relationships with genotypic characteristics. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 116.
20. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 43 (4): 641-8.
21. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (10): 4930–4942.

22. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61 (4): 1323–1330.
23. Gräser Y, el Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol.* 1998; 138 (4): 576–582.
24. Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. *Mycopathologia.* 2008; 166 (5-6): 239–56.
25. Graser, Y, Kuijpers, AF, Presber W, de Hoog G. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (9): 3329–3336.
26. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999; 41: 95-98.
27. Harmsen D, Schwinn A, Weig M, Bröcker E.-B, Heesemann J. Phylogeny and dating of some pathogenic keratinophilic fungi using small subunit ribosomal RNA. *J Med Vet Mycol.* 1995; 33 (5): 299–303.
28. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses.* 2008; 51 (Suppl 4): 2-15.
29. Hay RJ, Robles W, Midgley G, et al. Tinea capitis in Europe: new perspective on an old problem. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2001; 15 (3): 229-33.

30. Hubka V, Cmokova A, Skorepova M, Mikula P, Kolarik M. *Trichophyton onychocola* sp. nov. isolated from human nail. *Med Mycol.* 2014; 52 (3): 285–292.
31. Hubka V, Dobiášová S, Dobiáš R, Kolarík M. *Microsporium aenigmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of *tinea corporis*. *Med Mycol.* 2014; 52 (4): 387–396.
32. Kanbe T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008; 166 (5-6): 307–317.
33. 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 analysis. *Mycoses.* 1998; 41 (3-4): 139–143.
34. Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, Nishimura K, Miyaji M. Phylogeny of *Epidermophyton floccosum* and other dermatophytes. *Mycopathologia.* 1996; 134 (3): 121–128.
35. Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, Nishio K, Mochizuki T, Watanabe S. Phylogenetic relationships of the genera *Arthroderma* and *Nanizzia* referred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* 1992; 118: 95–102.
36. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33(7): 1870-1874.
37. Kwon-Chung J, Bennett JE. "Dermatophytoses", in *Medical Mycology* (Lea & Febiger, Malvern PA, 1992), Chapter 6, pp. 105-161.

38. Leclerc MC, Philippe H, Guého E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol.* 1994; 32 (5): 331–341.
39. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Br J Dermatol.* 1997; 137 (3): 351–355.
40. LoBuglio K, Pitt JI, Taylor JW. Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia.* 1993; 85 (4): 592–604.
41. López Martínez R, Castañón Olivares LR, Rodríguez Hernández R. Algunos aspectos epidemiológicos de las dermatofitosis: I. Frecuencia de infección. *Rev Mex Micol.* 1985;1: 29-35., dic. 1985.
42. López-Martínez R, Macotella-Ruíz E, Mariat F, Motta CN. Dermatofitosis. Algunos de sus aspectos epidemiológicos. *Rev Med IMSS (Mex).* 1972; 11: 242–247.
43. López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Bazán-Mora E, Méndez-Tovar LJ. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. *Med Mycol.* 2010; 48 (3): 476–479.
44. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. Dermatophytoses in Mexico City. *Mycoses.* 1994; 37 (1-2): 49–52.
45. Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, et al. Phenotyping and Genotyping of *Sporothrix schenckii* Isolates According to Geographic

- Origin and Clinical Form of Sporotrichosis. J Clin Microbiol. 2002; 40 (8): 3004–3011.
46. Mirzahoseini H, Omidinia E, Shams-Ghahfarokhi M, Sadeghi G, Razzaghi-Abyaneh M. Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. Iran J Public Health 2009; 38 (1): 18-24.
47. Mochizuki T, Sugie N, Uehara M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. Mycoses. 1997; 40 (11-12): 405–409.
48. Mochizuki T, Takada K, Watanabe S, Kawasaki W, Ishizaki H. Taxonomy of *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*) by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. J Med Vet Mycol 1990; 28 (3): 191–196.
49. Morales-Mendoza Y, Arenas-Guzmán R. Onicomycosis en pacientes pediátricos: un giro epidemiológico y un reto terapéutico. Dermatol Rev Mex. 2012; 56 (2): 115-118.
50. Mostert L, Groenewald JZ, Summerbell RC, Robert V, Sutton DA, Padhye AA, Crous PW. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. J Clin Microbiol. 2005; 43 (4): 1752–1767.
51. Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. Mycopathologia. 1992; 117 (3): 127–132.

52. O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol.* 1997; 7 (1): 103–116.
53. Panasiti V, Devirgiliis V, Borroni RG, Mancini M, Curzio M, Rossi M, Bottoni U, Calvieri S. Epidemiology of dermatophytic infections in Rome, Italy: a retrospective study from 2002 to 2004. *Med Mycol* 2007; 45 (1): 57-60.
54. Rebollo N, López-Barcenas AP, Arenas R. Tinea capitis. *Actas Dermosifiliogr.* 2008; 99 (2):91-100.
55. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, de Hoog S, Shidfar MR, Zaini F, Eshraghian M, Naghan PA, Mirhendi H. Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. *Med Mycol.* 2013; 51 (2): 203-207.
56. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Shidfar MR, Zaini F, Eshraghian MR, Jalalizand N, Nouripour-Sisakht S, Hosseinpour L, Mirhendi H. Use of single-enzyme PCR-restriction digestion barcode targeting the internal transcribed spacers (ITS rDNA) to identify dermatophyte species. *Iran J Public Health.* 2012; 41 (3): 82-94.
57. Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Satoh K, Najafzadeh MJ, Shidfar MR. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Med Mycol.* 2014; 52 (7): 674-688.
58. Ridell R. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycology.* 1950; 42 (2): 265-270.
59. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia.* 2008; 166 (5-6), 295–306.

60. Romano C. Tinea capitis in Siena, Italy. An 18-year survey. *Mycoses* 1999; 42 (9-10): 559-62.
61. Serra R, Peterson SW. *Penicillium astrolabium* and *Penicillium neocrassum*, two new species isolated from grapes and their phylogenetic placement in the *P. olsonii* and *P. brevicompactum* clade. *Mycologia*. 2007; 99 (1): 78–87.
62. Squeo RF, Beer R, Silvers D, Weitzman I, Grossman M. Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. *J Am Acad Dermatol*. 1998; 39 (2 Pt 2): 379-380.
63. Takashio, M. The *Trichophyton mentagrophytes* complex. In Recent advances in medical and veterinary mycology. Ed. K. Iwata, University of Tokyo Press, Tokyo, Japan 1977; 271-276.
64. Vena GA, Chieco P, Posa F, Garofalo A, Bosco A, Cassano N. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *New Microbiol*. 2012; 35 (2): 207–213.
65. Vidotto V, Garcia R, Ponce LM, Valverde M, Bruatto M. Dermatophytoses in Cusco (Peru). *Mycoses* 1991; 34 (3-4): 183-6.
66. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8 (2): 240–259.
67. Welsh O, Welsh E, Ocampo-Candiani J, Gomez M, Vera-Cabrera L. Dermatophytoses in Monterrey, Mexico. *Mycoses* 2006; 49 (2): 119-123.

68. Williams RH, Ward E and McCartney HA. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for the detection of airborne fungal spores. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 2453-2459.