



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE DERMATOFITOS
PROCEDENTES DE MÉXICO Y COSTA RICA”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Hugo Díaz Huerta



CDMX

2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Gutiérrez Ramos Abel
VOCAL: Profesor: Plasencia De La Parra Francisco Javier
SECRETARIO: Profesor: Martínez Herrera Erick Obed
1er. SUPLENTE: Profesor: Maldonado Jiménez Perla Deyanira
2° SUPLENTE: Profesor: Garrocho Villegas Verónica

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE MICOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Erick Obed Martínez Herrera

SUPERVISOR TÉCNICO:

María Guadalupe Frías De León

SUSTENTANTE (S):

Hugo Díaz Huerta

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	5
HISTORIA DE LOS DERMATOFITOS	5
TIPOS DE TIÑAS	8
EPIDEMIOLOGÍA DE MÉXICO	10
EPIDEMIOLOGÍA EN COSTA RICA	11
DIAGNÓSTICO DE DERMATOFITOS	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	16
PRIMO AISLAMIENTO DE LOS DERMATOFITOS	16
OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS	17
MACROMORFOLOGÍA	17
MICROMORFOLOGÍA	18
TAMAÑO DE LOS CONIDIOS	18
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	19
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	19
AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE LA REGIÓN ITS	20
EDICIÓN E IDENTIDAD DE LAS SECUENCIAS DE LOS AISLADOS DE DERMATOFITOS	21
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	22
RESULTADOS	22
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	22
IDENTIFICACIÓN DE PRIMO AISLAMIENTOS	22
OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS	24
MACRO Y MICROMORFOLOGÍA DE AISLADOS DE MÉXICO	24
MACROMORFOLOGÍA Y MICROMORFOLOGÍA DE AISLADOS DE COSTA RICA	31
MICROMORFOLOGÍA	34
TAMAÑO DE CONIDIOS	36
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	37
AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE LA REGIÓN ITS CON LOS MARCADORES ITS1 E ITS4	38

IDENTIDAD FENOTÍPICA DE LAS SECUENCIAS DE DERMATOFITOS PROCEDENTES DE MÉXICO Y COSTA RICA	39
ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS ITS	40
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIÓN	46
BIBLIOGRAFÍA	47

Índice de tablas y figuras

Tabla 1 Especies patógenas de dermatofitos y su fase teleomorfica.....	2
Tabla 2 Características de la macro y micromorfología de los principales géneros de dermatofitos.....	3
Tabla 3 Clasificación de los dermatofitos Hoog et al 2017.....	7
Tabla 4 Oligonucleotidos utilizados para la región ITS.....	20
Tabla 5 Aislados de México identificados por la técnica de Rush- Munro.....	22
Tabla 6 Identificación de los aislados de Costa Rica por la técnica de Rush- Munro.....	23
Tabla 7 Morfología de los dermatofitos aislados.....	24
Tabla 8 Tamaño de conidios de dermatofitos identificados fenotípica y genotípicamente.....	36
Tabla 9 Cuantificación de ADN por espectrofotómetro.....	37
Tabla 10 Comparación fenotípica y genotípica de los aislados de dermatofitos procedentes de México y Costa Rica.....	39
Figura 1 Esquema del ADN ribosómico y la región amplificada.....	14
Figura 2 Separacion por electroforesis de ADN	38
Figura 3 PCR con el fragmento de la región ITS de aislados de dermatofitos...	38
Figura 4 Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud..	42

RESUMEN

Los dermatofitos son un grupo de hongos estrechamente relacionados que tienen la habilidad de invadir el tejido queratinizado de humanos (piel, cabello y uñas) y otros animales para producir una infección. Generalmente se clasifican en tres grandes géneros por sus características de la macro y micromorfología, estos géneros son: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*.

Hasta hace poco la identificación de estos patógenos se basó principalmente en la macro y micromorfología de los aislamientos además de sus características fisiológicas (forma de perforación, prueba de la ureasa, etc.). Estos métodos tienen como desventaja que consumen mucho tiempo, además estos microorganismos presentan pleomorfismo, lo que hace que la morfología de la colonia cambia y los resultados pueden ser poco fiables. Debido a lo anteriormente referido, actualmente se recomienda que la identificación de estos hongos se base en la combinación de métodos fenotípicos y genotípicos. El objetivo de este trabajo fue analizar 37 aislados procedentes de México y Costa Rica por métodos feno y genotípicos. Se analizaron 24 aislados de dermatofitos procedentes de México y 13 aislados procedentes de Costa Rica, fueron identificados por sus características macro y micromorfológicas. Se obtuvo su ADN y se amplificó la región ITS con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del GenBank, a través del algoritmo BLASTn. Posteriormente se construyó un árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud.

Del análisis fenotípico 15 de los aislados de México fueron clasificados como *Trichophyton rubrum*, cuatro como *T. mentagrophytes* y los últimos no pudieron ser clasificados ya que presentaban micelio estéril. Con respecto a los aislados de Costa Rica, cinco de los 13 fueron identificados como *T. rubrum*, dos como *Microsporum gypseum*, uno como *T. mentagrophytes* y cinco no pudieron ser clasificados. De acuerdo con el análisis molecular, se corroboró la identificación de 19 aislados de *T. rubrum* procedentes de México y 10 de Costa Rica, mientras que en el resto de los aislados, algunos de ellos se presentaron en su fase sexual o teleomorfa: *Nanizzia incurvata*, *Arthroderma incurvatum*, y otros se presentaron

como una especie diferente: *T. erinacei*, *T. interdigitale* a la identificada fenotípicamente.

Con los datos anteriores se puede inferir que los métodos fenotípicos no son suficientes para llevar a cabo una correcta identificación de los dermatofitos, por lo cual se recomienda el uso de un análisis polifásico que incluya principalmente análisis fenotípico y genotípico, en este caso se utilizaron pruebas micro y macromorfológicas y análisis moleculares de la región ITS.

INTRODUCCIÓN

Los dermatofitos son un grupo de hongos estrechamente relacionados que tienen la habilidad de invadir el tejido queratinizado de humanos (piel, cabello y uñas) y otros animales para producir una infección (Weitzman y Summerbell, 1995).

Los dermatofitos se clasifican en tres géneros anamórficos: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, constituyendo un total aproximado de 40 especies de las cuales aproximadamente 12 son patógenos para el humano. Muchos dermatofitos pueden presentarse en la naturaleza en estado anamorfo o imperfecto y teleomorfo o perfecto. Los estados anamorfos (géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*) pertenecen a la clase *Hyphomycetes* del filum *Deuteromycota* (hongos imperfectos) y los estados teleomorfos (mayoría de especies zoofílicas y geofílicas de *Microsporum* y *Trichophyton*) están clasificados en el género teleomórfico *Arthroderma*, orden *Onygenales* y filum *Ascomycota*. En el caso de *Nannizzia* se ha descartado ya como la fase teleomorfa de *Microsporum* (Molina 2011).

En la tabla 1 se muestran las principales especies patógenas para el humano así como su fase teleomorfa (si la presentan).

Tabla 1. Especies patógenas de dermatofitos y su fase teleomorfa


Fase anamorfa	Fase teleomorfa	Fase anamorfa	Fase teleomorfa
<i>Trichophyton</i>	<i>Arthroderma</i>	<i>Microsporum</i>	<i>Arthroderma</i>
<i>T. rubrum</i>		<i>M. canis complex</i>	<i>A. otae</i>



<i>T. violaceum</i>		<i>M. gypseum</i>	<i>A. gypseum</i> <i>A. incurvatum</i>
<i>T. verrucosum</i>		<i>M. audouinii</i>	
<i>T. tonsurans complex</i>		<i>M. cookei</i>	<i>A. cajetani</i>
<i>T. mentagrophytes complex</i>	<i>A. benhamiae</i> <i>A. vanbreuseghemii</i>	<i>Epidermophyton</i>	No reportado
<i>T. krajdinii</i>		<i>E. floccosum</i>	
<i>T. interdigitale</i>			
<i>T. eboreum</i>			

Cabe mencionar que la fase teleomorfa de estos hongos a menudo es difícil de inducir de manera *in vitro* por las condiciones ambientales donde se produce esta fase (hábitat geofílico), pero se han encontrado medios que funcionan en algunos dermatofitos como es el complejo *M. gypseum* que muestran su fase teleomorfa en agar con una gran cantidad de queratina, otro medio que también funciona para la fase teleomorfa de estos hongos es el agar con base en avena y por último el agar suelo con pelo de caballo (Metin y Heitman 2017).

En la tabla 2 se muestran las características principales de los 3 grandes géneros de dermatofitos.

Tabla 2. Características de la macro y micromorfología de los principales géneros de dermatofitos

Genero	Forma del conidio	Tamaño	Clamidoconidios	Micromorfología
<i>Trichophyton</i>	Presenta microconidios de diferentes formas: piriforme, esféricos, claviformes, pueden presentar pocos	El tamaño de los microconidios es aproximadamente de 2 a 4 μm .	Presentan algunas especies como <i>T. tonsurans</i> .	

	macroconidios en forma de puro que llegan a medir de 40 a 50 μm de largo por 5 a 10 μm de ancho.			
<i>Microsporium</i>	Presentan macroconidios en diversas formas: fusiformes, claviformes, ovaes. En ocasiones pueden generar microconidios de aspecto piriforme.	Miden entre 40 a 60 μm de largo y de ancho de 5 a 15 μm .	De modalidad de micelio presentan algunas especies zarcillos o raquetas, pero no clamidoconidios.	
<i>Epidermophyton</i>	Presenta solo macroconidios en forma de bastos o clavos.	Miden entre 15 a 30 μm de largo por 5 a 10 μm de ancho.	Presenta clamidoconidios.	

Las infecciones por dermatofitos tienen prevalencia mundial y son conocidas clínicamente como “tiñas” (Hainer, 2003). Las especies de dermatofitos se pueden clasificar según su nicho ecológico en: geofílicos, aquellos dermatofitos que se encuentran comúnmente en el suelo y raramente ocasionan infecciones a humanos; zoofílicos, que colonizan a animales y pueden transmitirse ocasionalmente a humanos y, por último, las especies antropofílicas que son transmitidas de humano a humano (White *et al.*, 2008).

Aunque los dermatofitos tienen generalmente una localización superficial, la relación entre el hongo y su hospedero es compleja, por lo que continúa siendo poco entendida (Uribe, 2013). Hasta ahora, los estudios, *in vivo* e *in vitro*, nos dicen que la patogenicidad de estos hongos se debe a la capacidad de adherencia que poseen (Pérez, 2005).

Hasta hace poco la identificación de estos patógenos se basó principalmente en la macro y micromorfología, además de las características fisiológicas (forma de perforación, prueba de la ureasa, etc.) de los aislados. Estos métodos tienen como desventaja que consumen mucho tiempo (aproximadamente 4 semanas), además estos microorganismos presentan pleomorfismo, por lo que la morfología de la colonia cambia y los resultados pueden ser poco confiables (Grazyna *et al.*, 2015).

Debido a los problemas con la identificación, a principio de la década de 1980 se inició el uso de métodos moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), secuenciación de fragmentos de genes, etc., para su identificación (Grazyna *et al.*, 2015).

MARCO TEÓRICO

Historia de los dermatofitos

Las dermatomicosis son infecciones que involucran tejidos queratinizados, como son el estrato corneo, el pelo, las uñas y las plumas, y son causadas por hongos llamados dermatofitos. Este término fue utilizado por primera vez alrededor del año de 1882, lo que evidencia que las infecciones de este tipo son muy antiguas (Echeverría, 2016).

De acuerdo con los inicios de la historia de estos hongos, el primer investigador en documentar acerca de ellos fue Aulus Cornelius Celsus, quien en el siglo I a. C registró la tiña inflamatoria (Querión) y el Favus (Howard, 1983). Posteriormente Cassius en el siglo V, indicó que los romanos acuñaron el término “*tinea*”, que significa “apolillado” (carcomido), mismo término que utilizó para referirse al cuadro clínico de la “*tinea capitis*”, la cual adjudicaba como causa a insectos o gusanos (Bonifaz, 2012). Entre los siglos XVII y XVIII, varios pintores plasmaron en sus obras a personas que presentaban infecciones tiñosas, algunos de ellos llegaron a confundir probables infecciones fúngicas en la piel cabelluda con lepra. Bartolomé Esteban Murillo representó en una pintura las clases sociales de ambos siglos, donde plasmó a enfermos tiñosos siendo curados por una monja, con terapias de

sales de talio y depilación mecánica que se utilizaban en la época como tratamiento (Echeverría, 2016). Luego, Fray Bernardino de Sahagún, también en el siglo XVIII, hizo comunicaciones escritas de estos hongos causando infecciones en la piel de personas (Bonifaz, 2012). El primer investigador en observar estructuras fúngicas en lesiones causadas por dermatofitos fue el alemán Robert Remark en 1834, quien señaló que los escudetes fávicos estaban formados por cuerpos esféricos y fibras ramificadas, que en la actualidad son llamadas esporas e hifas respectivamente (Echeverria 2016).

Raymond Sabouraud, uno de los más conocidos e influyentes micólogos médicos, comenzó su investigación en dermatofitos alrededor de 1890, que culminó en la publicación de su volumen clásico, *Les Teignes*, en 1910 (Sabouraud, 1910). Las contribuciones de Sabouraud incluyeron sus estudios sobre la taxonomía, morfología, así como métodos de cultivo de los dermatofitos y la terapia de las tiñas. Él clasificó a los dermatofitos en cuatro géneros, *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, principalmente con base en aspectos clínicos de la enfermedad, combinados con observaciones microscópicas (Weitzman y Summerbell, 1995).

En 1927 Libero Ajello y Nannizzi descubrieron el estado perfecto de *M. gypseum*, este trabajo fue cuestionado en su inicio, posteriormente fue reconocida la validez del trabajo debido a que 30 años después se volvió a encontrar el estado perfecto de este hongo al cual se le denominó *Nannizzia* (Weitzman *et al.*, 1986).

En 1934, Chester W. Emmons propuso una nueva clasificación de los dermatofitos, con base en sus macro y microconidios, en la que solo se contemplan tres de los cuatro géneros que estableció Sabouraud, quedando de la siguiente manera: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* (Vilata, 2006). En 1969, Dawson y Gentles descubrieron la fase perfecta (telomórfica) del género *Trychophyton*. En 1978, el científico C. M. Philpot indicó que las infecciones por dermatofitos estaban relacionadas con aspectos como: áreas geográficas, formas clínicas, factores socioeconómicos, climáticos y demográficos (Philpot 1978). En 1980, los investigadores Davidson, Mackenzie y Owen utilizaron procedimientos de

apareamiento de bases de ADN las cuales dan validez a la clasificación por Emmons (Davidson *et al.*, 1980). Gräser *et al.* (1998) comprobaron con técnicas moleculares (PCR) que los métodos convencionales no son suficientes para la identificación de los dermatofitos debido a que morfológicamente se parecen mucho entre sí (Gräser *et al.*, 1998).

En la actualidad se han hecho varios estudios polifásicos sobre estos hongos y uno de los más importantes y nuevos han sido desarrollados por Hoog *et al.* (2017), quien individualmente en su trabajo ha propuesto una nueva clasificación (Tabla 3).

Aunque en los libros se sigue utilizando la clasificación de Chester Emmons, como en el libro de Micología Médica Básica de Alexandro Bonifaz (2012) y Micología médica ilustrada de Roberto Arenas (2014), existen trabajos que clasifican a los dermatofitos con base en la secuencia de fragmentos de genes.

Tabla 3. Clasificación de los dermatofitos Hoog *et al.* 2017

Género	Especies
Trichophyton	<i>T. benhamiae</i> , <i>T. bullosum</i> , <i>T. concentricum</i> , <i>T. equinum</i> , <i>T. eriotrephon</i> , <i>T. erinacei</i> , <i>T. interdigitale</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. quinckeanum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. schoenleinii</i> , <i>T. simii</i> , <i>T. soudanense</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>T. verrucosum</i> , <i>T. violaceum</i>
Epidermophyton	<i>E. floccosum</i>
Nannizzia	<i>N. aenygmaticum</i> , <i>N. corniculata</i> , <i>N. duboisii</i> , <i>N. fulva</i> , <i>N. gypsea</i> , <i>N. incurvata</i> , <i>N. nana</i> , <i>N. persicolor</i> , <i>N. praecox</i> , <i>N.</i>
Paraphyton	<i>P. cookei</i> , <i>P. cookiellum</i> , <i>P. mirabile</i>
Lophophyton	<i>L. gallinae</i> ,
Microsporum	<i>M. audouinii</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. ferruginium</i> , <i>M.</i>

Arthroderma	<i>A. amazonicum</i> , <i>A. ciferrii</i> , <i>A. cuniculi</i> , <i>A. curreyi</i> , <i>A. eboreum</i> , <i>A. flavescens</i> , <i>A. gertleri</i> , <i>A. gloriae</i> , <i>A. insingulare</i> , <i>A. lenticulare</i> , <i>A. melis</i> , <i>A. multifidum</i> , <i>A. onychocola</i> , <i>A. phaseoliforme</i> , <i>A. quadrifidum</i> , <i>A. redellii</i> , <i>A. silverae</i> , <i>A. thuringiensis</i> , <i>A. tuberculatum</i> , <i>A. uncinatum</i> .
--------------------	---

Tipos de tiñas

Generalmente las infecciones por dermatofitos se denominan de acuerdo con la zona del cuerpo donde se encuentran, se nombra primero la palabra tiña y después la zona anatómica involucrada (en *latín*), ejemplo: tiña de la cabeza *tinea capitis* (Noble y Pharp, 1998). Los síntomas de las dermatofitomicosis casi siempre vienen acompañados de escozor, dependiendo de la zona en que se encuentre la sintomatología puede ser mayor o menor (Hussein, 2014).

Las formas clínicas son las siguientes: (i) *tinea barbae* (tiña de la barba y el bigote); (ii) *tinea capitis* (piel cabelluda, cejas y pestañas); (iii) *tinea corporis* (piel glabra); (iv) *tinea cruris* (ingle); (v) *tinea imbricata* (tiña causada por *T. concentricum*); (vi) *tinea manuum* (mano); (vii) *tinea pedis* (pies), (viii) *tinea unguium* (uñas) y (ix) granuloma de majocchi (Noble, 1998). Varias partes del cuerpo pueden estar infectadas por el mismo dermatofito y los diferentes géneros pueden ocasionar lesiones clínicamente idénticas (Weitzman y Summerbell, 1995).

A continuación, se presentan las zonas afectadas, el cuadro clínico y agente causal más frecuente en estas tiñas:

- (i) *Tinea capitis* o tiña de la cabeza: Es una infección fúngica crónica de la piel cabelluda comúnmente en niños en edad escolar (Patel y Schwartz, 2011). A menudo aparecen una o varias placas escamosas con alopecia, este tipo de tiña puede ser inflamatoria (Querión de Celso) o no inflamatoria, dependiendo del estado inmune del huésped (Noble y Parhp 1998). Los agentes más comunes en México son *M. canis* y *T. tonsurans* (Bonifaz, 2012).

- (ii) *Tinea barbae* o tiña de la barba: Afecta por lo general la zona del cuello y cara, de la misma manera se presentan placas eritematoescamosas pruriginosas y con pequeñas vesículas. No es muy frecuente en México, pero el agente que más se ha aislado en esta tiña es *T. mentagrophytes* (Bonifaz, 2012).
- (iii) *Tinea corporis* o tiña del cuerpo: Propia de la piel lampiña, afecta en su mayor parte al tronco, seguido de las extremidades y puede llegar a afectar la cara. Se caracteriza por placas eritematoescamosas circulares, con bordes activo vesiculosos. Los agentes causales más aislados en este tipo de tiña es *M. canis* en niños y *T. tonsurans* en adultos (Arenas, 2014).
- (iv) *Tinea cruris* o tiña de la ingle: Afecta una o ambas regiones inguinales, puede extenderse al periné, la región púbica, el abdomen y las nalgas; pocas veces afecta el escroto y el pene. Se caracteriza por placas eritematoescamosas con bordes vesiculosos; casi nunca hay pústulas (Arenas, 2014). Los dermatofitos más aislados son *T. rubrum*, seguido de *T. mentagrophytes* y en menor ocasiones por *E. floccosum* (Bonifaz, 2012).
- (v) *Tinea imbricata* o Tokelau: Afecta de manera crónica a la piel lampiña, es causada exclusivamente por *T. concentricum*, que provoca lesiones eritematoescamosas, dispuestas de manera concéntrica e imbricada, uno de los factores más importantes y específicos para padecer este tipo de tiña es que la persona afectada sea de raza malayopolinésica (Bonifaz, 2012).
- (vi) *Tinea manuum* o tiña de las manos: Se localiza en las manos y puede afectar una o ambas palmas, se manifiesta por anhidrosis, hiperqueratosis difusa y descamación pulverulenta o placas eritematoescamosas, el agente causal más aislado es *T. rubrum* (Arenas, 2014).
- (vii) *Tinea pedis* o tiña de los pies: Es una infección dermatofítica de los pies, puede involucrar los pliegues interdigitales, las plantas, algunas veces el

dorso y puede ser una condición crónica o recurrente. Los agentes etiológicos más frecuentes son antropófilos, incluido *T. rubrum* que es el más común, seguido por *T. mentagrophytes* y *E. floccosum* (Ilkit y Durdu, 2015).

- (viii) *Tinea unguium* o tiña de las uñas (onicomicosis): Afecta a las uñas de los pies y/o manos, es una dermatofitosis crónica que comienza en el borde libre o distal, avanzando hacia la base de la uña. La uña se vuelve opaca, amarillenta, quebradiza, pulverulenta y se pierde la consistencia del borde. Los hongos más aislados son *T. rubrum* *T. mentagrophytes* y en menor frecuencia *T. tonsurans*, *M. gypseum* y *M. canis* (Bonifaz, 2012).
- (ix) Granulomas dermatofíticos (granuloma de Majocchi): Dermatofitosis profunda que afecta principalmente a la piel lampiña, por lo general en miembros superiores (60%) y en menor proporción en miembros superiores, tronco, cara y en ocasiones muy raras puede afectar la piel cabelluda. Los agentes etiológicos más aislados son *T. rubrum* (85%) y *T. mentagrophytes* (15%) (Bonifaz, 2012).

Epidemiología de México

La distribución de infecciones por dermatofitos y sus agentes varía dependiendo de la zona geográfica, además existen varios factores que influyen en la epidemiología como son: clima, estilo de vida, migración, cultura y condiciones socioeconómicas (Ameen, 2010; Havlickova *et al.*, 2008).

Existen análisis que se han realizado por tiempos prologados y aunque en un principio cada país tenía un agente etiológico más relacionado a cada tipo de tiña, todos los estudios coinciden en que han aumentado las infecciones por *T. rubrum* (Seebacher *et al.*, 2008).

En México, se considera que el 10% de la población está afectada por algún tipo de micosis superficial, las dermatofitomicosis constituyen del 70 al 80% de las micosis y poseen una frecuencia del 5% en las consultas dermatológicas (Arenas, 2002).

Los datos epidemiológicos en México son los siguientes: la tiña de la cabeza se presenta principalmente en infantes y el agente que predomina es *M. canis* con un 75-78%, *T. tonsurans* 17%, *T. mentagrophytes* 3%, *T. rubrum* 2% y *M. gypseum* 0,8% (Arenas, 2002).

En la onicomycosis o tiña de uñas, los agentes causales más frecuentes son: *T. rubrum* 87%, *T. mentagrophytes* 9% y otros dermatofitos 4%. En asociación con *Candida* 3% y con otros mohos 2% (Bonifaz *et al.*, 1999).

La tiña del cuerpo, que afecta la piel lampiña tiene como agentes más frecuentes *T. rubrum* 70% y *M. canis* 20%, el resto son causadas por *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. gypseum* y *E. floccosum* (Bonifaz *et al.*, 1999).

Con respecto a la tiña de la ingle, los datos epidemiológicos muestran que la mayoría de las infecciones son por *T. rubrum* con un 85%, seguido por *T. mentagrophytes* 10% y *E. floccosum* 5% (Arenas, 2002).

La tiña de la mano es ocasionada en su mayoría por *T. rubrum* 80% seguido de *T. mentagrophytes* con un 15% (Arenas, 2002).

Las onicomycosis en México son muy frecuentes, por el clima y los hábitos que se tienen, pero debido a que no son patologías tan severas, muchas veces se omite el comunicado al médico (Arenas, 2002).

Epidemiología en Costa Rica

En Costa Rica no hay muchos datos con respecto a la epidemiología de dermatofitos en los últimos años, uno de los pocos documentos que existen es el de "Dermatofitos en Costa Rica" por Grace Mata y Leonardo Mata (1959). El estudio mostró los siguientes agentes para las tiñas: los hongos más incidentes, en general, fueron *T. rubrum* (34.4 %), *M. canis* (32.8 %), *M. gypseum* (12.5%), *T. tonsurans* (7.8%), *T. mentagrophytes* (4.7%), *T. verrucosum* (4.7%) y *E. floccosum* (3.1%) (De Mata y Mata, 1959).

Diagnóstico de dermatofitos

En la actualidad, aunque existen ya otros métodos para la identificación de los dermatofitos, se siguen practicando métodos convencionales que incluyen:

- Examen directo con KOH (10-40%)
- Cultivo

El examen directo, aunque no es suficiente para dar un diagnóstico preciso, es necesario para tener una historia clínica completa y dar una idea del padecimiento (Sandoval *et al.*, 2012).

Es importante que la muestra se tome de manera correcta y dependiendo de la zona anatómica se tomarán medidas diferentes. En el caso de las tiñas de la piel se tomará del borde activo con ayuda de un bisturí o similar (estéril). Con respecto al cabello se tomarán las escamas con un bisturí, y se tratará con unas pinzas de quitar cabellos afectados. Es importante destacar que para tomar las muestras a los pacientes no debe haber sido administrado ningún antimicótico (oral), en caso de estar en tratamiento se deberá suspender de 7 a 10 días para tomar las muestras correspondientes. En el caso de tratamiento tópico (crema ungüentos, talcos, polvos) se deberá suspender por dos semanas el tratamiento y en el caso de las uñas no se deberán cortar (Sandoval *et al.*, 2012).

Una vez obtenida la muestra se deberá colocar en un portaobjetos y colocar sobre ella una a dos gotas de KOH al 10-20% que tiene como función disolver la queratina, dejando intacta la pared celular del hongo, a la preparación se le puede agregar DMSO (dimetilsulfóxido) para aumentar el poder disgregante de la potasa y glicerina la que retarda la formación de los cristales, además de que preserva por más tiempo las estructuras (Westerberg y Voyack, 2013).

En el caso del pelo, se puede presentar en manera *endothrix* por *T. tonsurans* con esporas abundantes dentro del pelo. En el pelo *ectoendothrix* generado por una infección microspórica por *M. canis* se presentan esporas que envuelven el pelo (Bonifaz, 2012).

El examen directo, es un método rápido y relativamente sencillo (realizado por personal capacitado) por lo que es un procedimiento que se debe llevar a cabo en todos los laboratorios por la información que aporta (Cuenca *et al.*, 2009).

El cultivo aporta mucha mayor información que un examen directo y hasta ahora en las clínicas es la herramienta que se utiliza para el diagnóstico. El cultivo se basa principalmente en la identificación de las características de la colonia así como la presencia de micro o macroconidios al microscopio. Se realiza con medio glucosado de Sabouraud (M.G.S.) + cloranfenicol + cicloheximida, en tubo o en caja de Petri para dermatofitos y algunas levaduras y otros tubos y cajas sin cicloheximida para el resto de las levaduras y los mohos. La cicloheximida inhibe el crecimiento de la mayoría de los mohos no dermatofitos. Se incuba a 25-28°C, manteniendo un mínimo de tres semanas para dermatofitos, ya que los mohos y levaduras crecen rápidamente (Carballo, 2002; Rubio, 2001). Aunque es el método de elección para la identificación, posee varias desventajas, ya que un cultivo negativo se reporta después de 4 semanas, y cuando hay crecimiento lento, dependiendo de la demanda del laboratorio, no se puede prolongar mucho el tiempo (Pérez, 2005).

El margen de error del KOH es del 5 al 20%, los cultivos también presentan falsos negativos con valores que van del 23 al 56%. Esto se ha asociado con varios factores como: muestras inadecuadamente tomadas, contaminación de los cultivos y estructuras del hongo no viables (Pérez, 2005).

Debido a los problemas que tienen los métodos convencionales para la identificación, estos se han apoyado en métodos moleculares para aumentar la precisión y eficacia del diagnóstico, en el cual destacan dos en el área (desorción/ionización láser asistida por matriz espectrometría de masas) MALDI-TOF MS que es de las metodologías más novedosas para la identificación, esta se basa en el análisis de proteínas que se encuentran en la pared celular del hongo, actualmente ya existe una base de datos para la identificación de dermatofitos (aunque es un poco limitada). Esta metodología ha demostrado ser efectiva para la identificación de dermatofitos con un alto porcentaje, ya que en un estudio de 133 aislados pudo identificar correctamente género y especie de 130, es decir tiene un

97.8% de eficacia, además que las identificaciones se realizaron en tres días (Ollivier, 2013). Aunque la eficacia y rapidez de este método es buena, presenta desventajas como: el costo del equipo, el acondicionamiento del laboratorio, la capacitación del personal, además de las actualizaciones de la base de datos (Ollivier, 2013). Por lo que no representa una alternativa viable para la identificación en el primer nivel.

El ADN ribosómico (ADNr) es una secuencia de ADN contenida en los cromosomas del nucléolo que codifica ARN ribosómico, esta secuencia contiene la región del espaciador transcrito interno (ITS) que es una región variable para cada especie con funciones desconocidas, el analizar este fragmento ha demostrado ser un método útil para la identificación de dermatofitos, siendo muy sensible y confiable para distinguir entre las diferentes especies (Li *et al.*, 2008); este análisis se lleva a cabo con la técnica PCR que ha demostrado tener una buena capacidad en la identificación de dermatofitos, el costo del equipo es viable, podría estar en cualquier laboratorio debido a que no necesita remodelaciones y es un método relativamente sencillo (Verrier y Monod, 2017).

En la siguiente figura se muestra un esquema más detallado de esta región así como los oligonucleótidos que se usaron en este trabajo y la región que se amplificó.

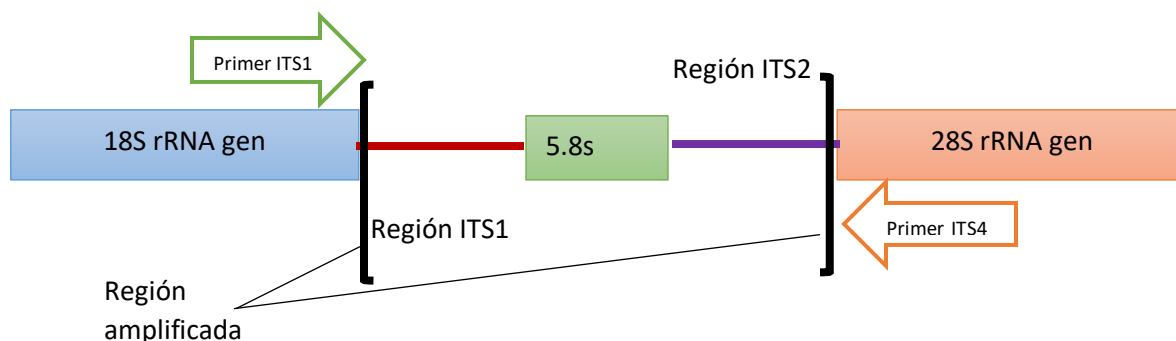


Figura 1. Esquema del ADN ribosómico y la región amplificada (diseñado por Hugo Díaz)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los dermatofitos son hongos queratinolíticos productores de micosis superficiales y cutáneas llamadas tiñas, tanto en el hombre como en los animales. Las dermatofitosis se encuentran entre las infecciones de mayor prevalencia en todo el mundo (Gräser *et al.*, 2008).

Los métodos convencionales de identificación de los dermatofitos se basan fundamentalmente en observaciones de las características macro y micromorfológicas de sus colonias, a lo que se agrega la realización de pruebas fisiológicas para los aislados atípicos. Debido al pleomorfismo, la variabilidad en los cultivos y la superposición de características morfológicas de los dermatofitos, el estudio fenotípico muchas veces no es suficiente para una correcta clasificación taxonómica, por ello se recurre a las técnicas moleculares (Tartabini *et al.*, 2013).

En México y en Costa Rica se siguen utilizando los métodos convencionales para la identificación de dermatofitos, estos métodos no son suficientes para dar un diagnóstico preciso por lo que es necesario utilizar otro tipo de herramientas para mejorar la identificación de estos hongos.

JUSTIFICACIÓN

En México y en Costa Rica la identificación de los dermatofitos sigue realizándose con métodos convencionales, por lo que la identificación no es del todo precisa. En este trabajo se comparó la metodología convencional contra la metodología molecular con la finalidad de sustentar que es necesaria una identificación polifásica.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar aislados de dermatofitos procedentes de México y Costa Rica por métodos feno y genotípicos.

Objetivos particulares

- Identificar aislados clínicos procedentes de México y Costa Rica, de acuerdo con sus características fenotípicas (macro y micromorfología).
- Extraer el ADN de los aislados de dermatofitos procedentes de México y Costa Rica.
- Amplificar y secuenciar el fragmento de la región ITS con los oligonucleotidos ITS1 e ITS4 de los aislados procedentes de México y Costa Rica.
- Editar las secuencias de los aislados clínicos y compararlas con todas las secuencias de nucleótidos pertenecientes a hongos depositados en la base de datos GenBank, a través del algoritmo BLASTn, para confirmar la identidad de la secuencia.
- Realizar la identificación de los aislados por inferencia filogenética, a través de un dendrograma construido por el método de Máxima Verosimilitud utilizando cepas de referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los aislados de dermatofitos

Se utilizaron 24 aislados clínicos de dermatofitos procedentes de pacientes atendidos en los diferentes servicios del hospital General “Dr. Manuel Gea González” de la Ciudad de México, México, y 13 del hospital de Golfito Manuel Mora Valverde de la ciudad de San José de Costa Rica.

Caracterización fenotípica

Primoaislamiento de los dermatofitos

Los dermatofitos (*Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*), identificados previamente en cada centro asistencial, fueron cultivados en agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon, Becton Dickinson, México, MX) e incubados a 28 °C por dos semanas o hasta que se observó crecimiento suficiente de hongos filamentosos para poder realizar la prueba de la cinta adhesiva (Rush-Munro), que consiste en tomar una pequeña muestra del hongo con una cinta adhesiva y luego colocar la misma sobre un portaobjetos al cual previamente se le colocó una gota

de azul de algodón. Posteriormente la preparación fue observada al microscopio óptico utilizando los objetivos 10X y 40X, esto con el propósito de confirmar que todas las muestras proporcionadas por las instituciones de salud fueran dermatofitos. Posteriormente, se resembraron en agar Sabouraud con antibióticos e incubaron a 28 °C durante 5 a 10 días para realizar el cultivo monospórico.

Obtención de cultivos monospóricos

La obtención de cultivos monospóricos se obtuvo con base en la metodología reportada por Frías De León *et al.* (2011). A partir del primoaislamiento, se realizaron resiembras en agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y se incubaron durante 8-10 días a 28 °C, posteriormente se preparó una suspensión de conidios agregando 1 mL de Tween 80 al 0.5% a cada tubo correspondiente al cultivo y se ajustó la cantidad de conidios a una concentración de 50 a 100 conidios/mL haciendo uso de una cámara de Neubauer (BRAND, Wertheim, DE). El número de conidios /mL se calculó con la siguiente ecuación: $(A \times 10,000) / B = N$, donde A es el número de células, B el número de los cuadros de la cámara contados y N número de conidios por mL. Ya preparada la suspensión de conidios, con ayuda de una pipeta se inocularon 25 µL en una caja Petri con agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), los 25 µL de la suspensión de conidios fueron extendidos en la placa con ayuda de un triángulo metálico, se sellaron con masking tape y se incubaron a 28 °C haciendo observaciones a las 24 y 48 horas con la finalidad de obtener, colonias visiblemente separadas, jóvenes, sin esporular. De las colonias que desarrollaron crecimiento se seleccionó una y se sembró en dos cajas, una con agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y otra con medio APD (Agar Papa Dextrosa) (Bioxon, Becton Dickinson, México, MX), se incubaron a 28 °C hasta observar un buen crecimiento de la colonia.

Macromorfología

La descripción fue con base en lo reportado por Frías De León *et al.* (2011). Las colonias aisladas se sembraron en cajas Petri con agar Sabouraud con

cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y en agar APD (Bioxon) y se incubaron a 28 °C durante 5 a 10 días, posteriormente se observó el crecimiento, color y aspecto de la colonia (morfología). El registro de los aislados se llevó a cabo tomando fotografías con una cámara digital (SONY Cyber-shot 8.1 mega pixeles, México, MX).

Micromorfología

Las características típicas de los dermatofitos, se obtuvieron mediante la técnica de microcultivo de Ridell (1950), que trata en cortar asépticamente cuadros de agar Sabouraud de 1 cm², cada cuadro se colocó en un portaobjeto estéril y se inoculó con el aislado correspondiente, en las cuatro aristas superiores del medio de cultivo, sobre el cuadro se coloca cuidadosamente un cubreobjetos estéril, toda esta preparación se colocó dentro de una caja Petri estéril, con varilla de vidrio como soporte de la preparación. Para evitar la deshidratación del agar se agregó un poco de agua con Tween 80% al fondo de la caja y se incubó a 28 °C durante un periodo de 4 a 8 días.

Cuando se observó buen crecimiento del hongo se retiró cuidadosamente el cubreobjetos del agar y se depositó en un portaobjetos que previamente se le había colocado una gota de azul de algodón en su superficie. La preparación se observó al microscopio (Olympus América Inc., Melville, NY, USA), con la finalidad de observar las características típicas de los conidios (tamaño y forma). El registro de la micromorfología se realizó tomando fotografías con ayuda de una cámara digital (SONY).

Tamaño de los conidios

Con base en los microcultivos obtenidos de los aislados sembrados en agar Sabouraud con antibióticos e incubados a 28 °C durante 4 a 8 días, se realizaron mediciones del diámetro de 30 microconidios o 10 macroconidios dependiendo de la especie involucrada, siguiendo la metodología descrita por Frías De León *et al.* (2011)

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de las mediciones del diámetro de conidios se llevó a cabo un análisis con la prueba estadística U de Mann-Whitney para comparar el tamaño de los conidios de *T. rubrum* procedentes de México y Costa Rica. El análisis se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS ver. 24 (Statistical Package for the Social Sciences).

Caracterización genotípica

Extracción de ADN genómico

A partir de los cultivos monospóricos, se sembraron conidios en 50 mL medio YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%) y este se incubó a 37 °C en agitación durante 3 días o hasta observar crecimiento micelial. La biomasa micelial de cada aislado se filtró con ayuda de filtros swinex, utilizando papel Whatman No.1 (Merck, New York, USA) estéril. Posteriormente, el micelio se lavó con agua Milli Q estéril y se secó con papel filtro estéril; la extracción de ADN se llevó a cabo con el Kit Promega 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 esterilizadas (400 a 455 µm de diámetro lavadas previamente con ácido clorhídrico), se adicionaron 600µl de solución de lisis de núcleo y se colocó en el sistema FastPrep®-24 (MP Biomedicals, CA, USA) para el rompimiento del micelio con las siguientes condiciones: tres periodos de 50 s a 6.5 m/s con un descanso de 5 min entre cada ciclo, una vez teniendo pulverizado el micelio se continuó con una Incubación a 65 °C por 15 min. Se agregó 3 µL de solución de RNasa con una concentración de 100 mg/mL al lisado celular, y se mezcló la muestra invirtiendo el tubo 2 a 5 veces. Se incubó el tubo de la mezcla a 37 °C durante 15 min. La muestra se llevó a temperatura ambiente durante 5 min antes de continuar. Se agregaron 200 µL de solución precipitadora de proteínas, y se agitó con ayuda del vortex a alta velocidad durante 20 s. Se centrifugó durante 3 minutos a 15,000 rpm. Las proteínas precipitadas formaron un sedimento compacto. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante que contiene el ADN (dejando el sedimento de proteína) y se transfirió a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 mL que contiene 600 µL de isopropanol

a temperatura ambiente, se mezcló suavemente la solución por inversión hasta que las hebras de ADN formaran una masa visible, posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante y se agregaron 600µl de etanol al 70% a temperatura ambiente, se mezcló suavemente el tubo por inversión para lavar el ADN. En seguida se centrifugó a 15,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente, se utilizó una pipeta Pasteur para recolectar el etanol y de esta manera dejar solo el pellet (ADN), posteriormente se colocó el tubo invertido en papel absorbente por 15 min para evaporar el alcohol aun presente en el pellet. Se agregaron 100 µL de solución de rehidratación de ADN, incubando a 65 °C durante 60 min. Periódicamente se mezcló la solución tocando suavemente el tubo. La concentración de ADN se determinó con base en la electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, comparando el ADN de las muestras con diferentes concentraciones del fago Lambda (GIBCO, Brooklyn, USA) de 10, 30 y 50 ng. Las muestras fueran teñidas con GelRed™ (10,000 X, Biotium Inc., Hayward, USA) dejándolo correr por un tiempo aproximado de 60 min a 100 V, se observó el gel en un fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). La concentración del ADN de las muestras también fue calculada por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm, a su vez se evaluó la pureza con la relación de absorbancias a 260/280 utilizando el espectrofotómetro (DeNovix, Wilmington, DE, USA). El ADN fue ajustado a una concentración de 20 ng/mL para ser utilizado en la amplificación por PCR.

Amplificación de un fragmento de la región ITS

Se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 reportados por White *et al.* (1990) (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleotidos utilizados para la región ITS

Fragmento	Primer	Secuencia	Tamaño del amplicón
Región ITS	ITS 1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	290 a 500 pb

	ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
--	-------	----------------------------	--

El volumen final de la reacción fue de 25 µL, se colocaron 20 ng de ADN 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 1 X. 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. Al término de la reacción los productos de amplificación obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ (10,000X), en amortiguador TBE 0.5X. El marcador de tamaño molecular que se empleó fue 100 pb ADN Ladder. Se utilizó como testigo negativo (mezcla de reacción de PCR sin ADN). Las imágenes de los geles se capturaron en un MultiDoc-It™ Imaging System (Upland, CA, USA).

Una vez que las muestras se analizaron por electroforesis y se obtuvo el tamaño del amplicón esperado se enviaron a secuenciar en ambos sentidos (Macrogen Inc. MD, USA).

Edición e identidad de las secuencias de los aislados de dermatofitos

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit ver. 7.2.5. (Hall, 1999). Primeramente, se realizó un análisis comparativo entre la secuencia y el electroferograma para ver si existían bases degeneradas y de esta manera corregir la secuencia. Se analizó la secuencia completa que abarca la región ITS1, 5.8s y la ITS2. Es importante tomar en cuenta que la región 5.8s es altamente conservada, y ayuda a identificar género y familia, así también que las regiones ITS son variables entre especies, por lo que son funcionales para diferenciar estas dentro de cada género. 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 o cero).

Análisis filogenético

Para el análisis filogenético se utilizó el método estadístico de Maxima Verosimilitud, incluyendo una prueba de filogenia que incluye el método de boorstrap con 1,000 réplicas y modelo evolutivo GTR+G; se aplicó el método heurístico NNI (Nearest-Neighbor-Interchange) y el análisis se llevó a cabo con el programa Mega 7 (www.megasoftware.net/) (Kumar *et al.*, 2016).

RESULTADOS

Caracterización fenotípica

Identificación de primoaislamientos

El aislamiento de las muestras de dermatofitos procedentes de México y Costa Rica, fueron previamente sembrados en agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), luego incubados a 28 °C, desarrollando y presentando distintas características microscópicas observadas por la técnica de Rush-Munro, y su vez clasificadas dentro de los tres géneros conocidos (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Aislados de México identificados por la técnica de Rush- Munro

Clave interna	Identificación por Rush- Munro
M1	<i>T. rubrum</i>
M2	<i>T. rubrum</i>
M3	<i>T. rubrum</i>

M4	<i>T. rubrum</i>
M5	<i>T. rubrum</i>
M6	<i>T. rubrum</i>
M8	<i>T. rubrum</i>
M9	<i>T. rubrum</i>
M10	<i>T. rubrum</i>
M11	<i>T. rubrum</i>
M12	No identificado
M13	<i>T. rubrum</i>
M14	<i>T. rubrum</i>
M15	No identificado
M16	No identificado
M17	<i>T. mentagrophytes</i>
M18	<i>T. rubrum</i>
M19	No Identificado
M20	<i>T. rubrum</i>
M21	<i>T. mentagrophytes</i>
M22	<i>T. rubrum</i>
M23	<i>T. mentagrophytes</i>
M24	<i>M. canis</i>
M25	<i>T. mentagrophytes</i>

Tabla 6. Identificación de los aislados de Costa Rica por la técnica de Rush- Munro

Clave interna	Identificación Rush- Munro
CR1	<i>M. gypseum</i>
CR2	<i>T. rubrum</i>
CR3	<i>T. rubrum</i>
CR4	No identificado
CR5	<i>T. rubrum</i>
CR6	<i>T. rubrum</i>
CR7	<i>M. gypseum</i>
CR8	<i>T. mentagrophytes</i>
CR9	<i>T. rubrum</i>
CR10	No identificado
CR11	No identificado
CR12	No identificado
CR13	No identificado



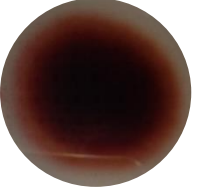
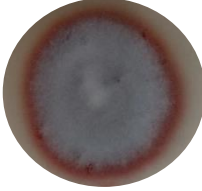
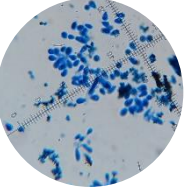




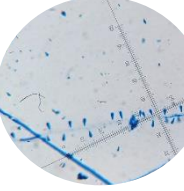


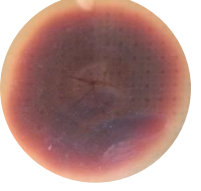

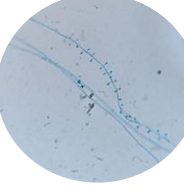
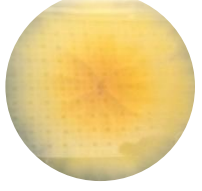

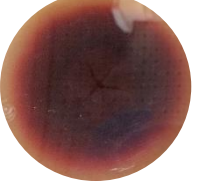

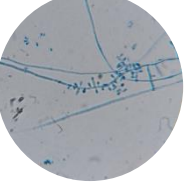
Obtención de cultivos monospóricos



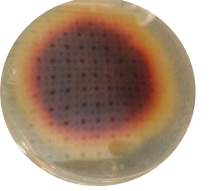




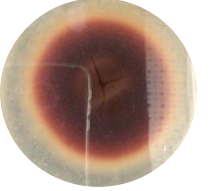

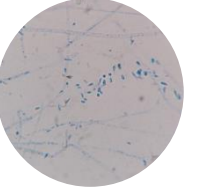




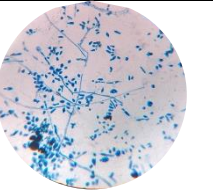


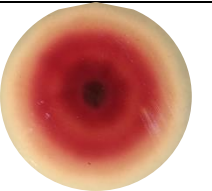

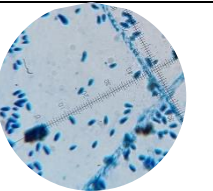
Siguiendo con la metodología se obtuvieron los cultivos monospóricos y se conservaron como se menciona en la sección de materiales y métodos.

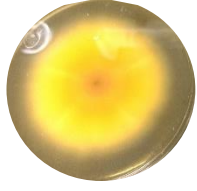

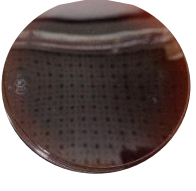

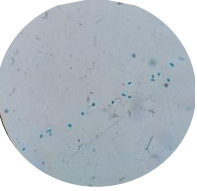


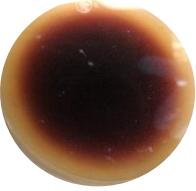

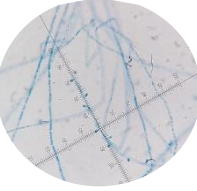
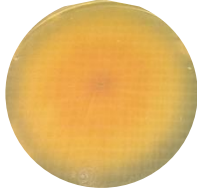

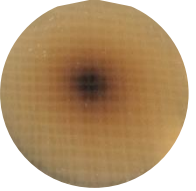

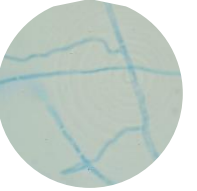
Macro y micromorfología de aislados de México

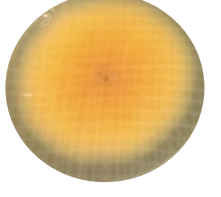

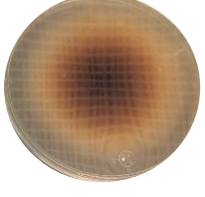

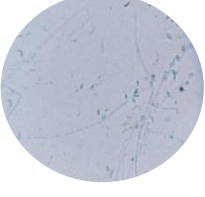
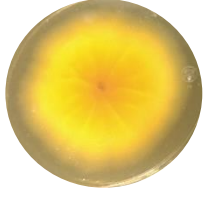



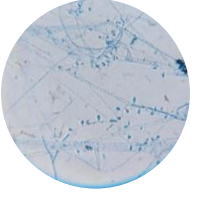
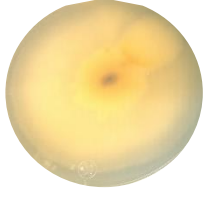

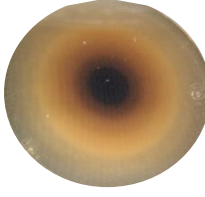

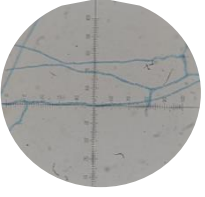
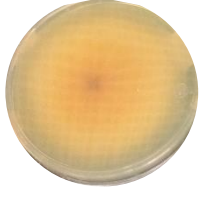

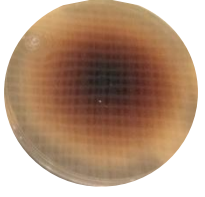

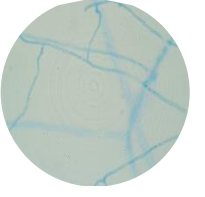
En la tabla 7 se muestran las características de cada aislado en agar Sabouraud + antibióticos (Mycosel) y el agar APD, así como su micromorfología.

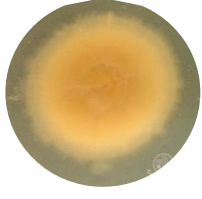



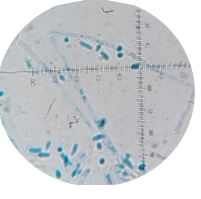
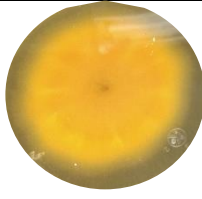

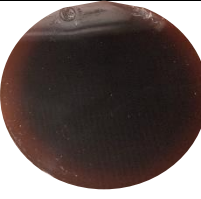

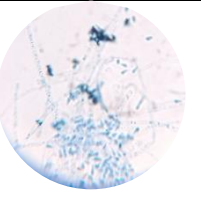
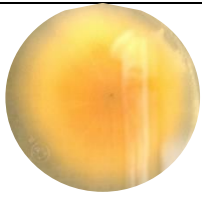

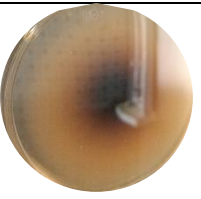

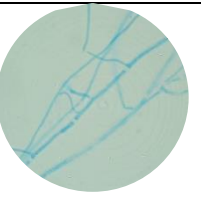
Tabla 7. Morfología de los dermatofitos aislados

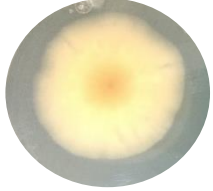
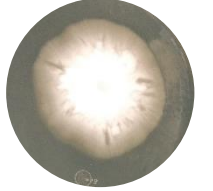
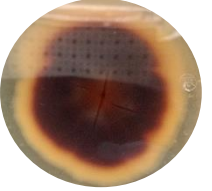

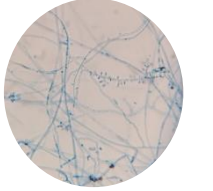
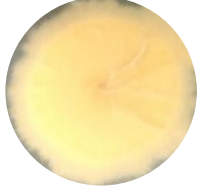

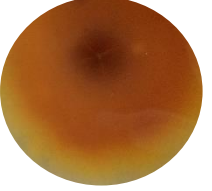

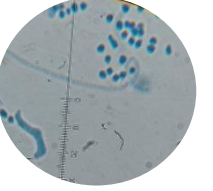




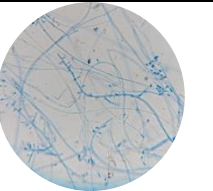
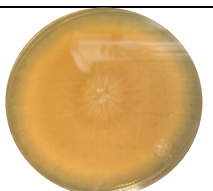

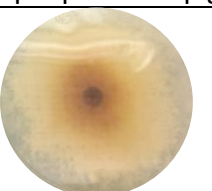

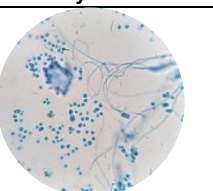
Clave / Identificación fenotípica	Agar Sabouraud + antibióticos		Agar papa dextrosa		Micromorfología
	Reverso	Anverso	Reverso	Anverso	Aumento de 100x
M1 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia blanca, seca, ilimitada, aspecto poco veloso. Reverso: amarillo sin producción de pigmento difusible. APD: anverso colonia blanca, seca, vellosa ilimitada. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
M2 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia blanca, seca, ilimitada, aspecto veloso. Reverso: colonia amarilla sin producción de pigmento difusible. APD: anverso colonia blanca, seca, vellosa ilimitada. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
M3 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia blanca, seca, ilimitada poco vellosa. Reverso: colonia amarilla sin producción de pigmento difusible. APD: anverso: colonia blanca, seca, vellosa ilimitada. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
M4 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia blanca, seca, ilimitada poco vellosa. Reverso: colonia amarilla sin producción de pigmento difusible. APD: anverso colonia blanca, seca, vellosa ilimitada. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino</p>				

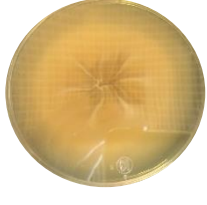



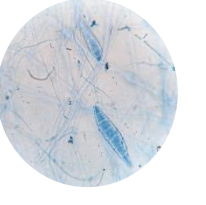
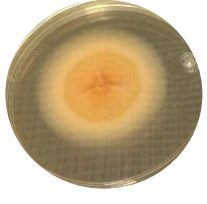

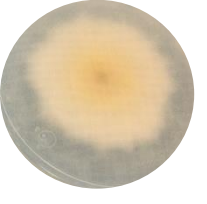

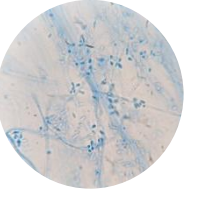
M5 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo, la parte del centro presento micelio de color blanco y en la periferia presenta un color amarillo, colonia ilimitada, de aspecto seco.</p> <p>Reverso: colonia amarilla sin producción de pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia vellosa de color blanco, ilimitada.</p> <p>Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
M6 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia amarilla con micelio de color blanco, ilimitada.</p> <p>Reverso: colonia amarilla sin producción de pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia de aspecto algodonosa de color blanco e ilimitado.</p> <p>Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
M8 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia de aspecto vellosa, amarilla con micelio de color blanco, ilimitada.</p> <p>Reverso: Colonia de color amarillo sin producción de pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia algodonosa de color blanco, ilimitada.</p> <p>Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
M9 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo, micelio de color blanco de aspecto vellosa y seco, de crecimiento ilimitado.</p>				

		<p>Reverso: colonia de color amarillo sin la producción de pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia de color blanco de aspecto algodonoso.</p> <p>Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo diferente a otros aislados.</p>			
M10 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco, limitada, de aspecto aterciopelado, de crecimiento limitado.</p> <p>Reverso: colonia de color amarillo sin la producción de pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia de aspecto blanco con tonos de gris de crecimiento radial, crecimiento ilimitado.</p> <p>Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
M11 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia amarilla con micelio de color blanco, de aspecto veloso plano y crecimiento radial, limitada.</p> <p>Reverso: Colonia de color amarillo sin la producción de pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia algodonosa de color blanco, limitada.</p> <p>Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino</p>				
M12 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco de aspecto veloso plano, crecimiento radial, ilimitado.</p> <p>Reverso: colonia de color amarillo sin la presencia de pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia de aspecto algodonoso de color blanco, de crecimiento ilimitado.</p> <p>Reverso: colonia de color beige con un pigmento de color rojo en el centro.</p>				




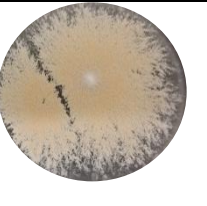
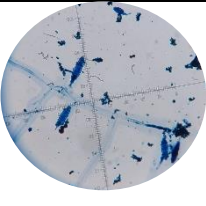
<p>M13 <i>T. rubrum</i></p>					
<p>Macromorfología</p>		<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco de aspecto veloso plano de crecimiento radial limitado. Reverso: colonia de color amarillo sin la presencia de pigmento difusible. APD: anverso colonia de aspecto algodonoso de color blanco de crecimiento ilimitado. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>			
<p>M14 <i>T. rubrum</i></p>					
<p>Macromorfología</p>		<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco de aspecto veloso plano de crecimiento radial, ilimitado. Reverso: colonia de color amarillo sin la presencia de pigmento difusible. APD: anverso colonia algodonosa de color blanco, de crecimiento radial e ilimitado. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>			
<p>M15 Micelio estéril</p>					
<p>Macromorfología</p>		<p>Mycosel: anverso colonia de color blanca, de aspecto veloso, crecimiento ilimitado. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible. APD: anverso colonia de color blanco de aspecto veloso, crecimiento radial. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino en el centro.</p>			
<p>M16 Micelio estéril</p>					





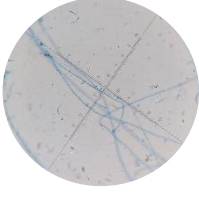
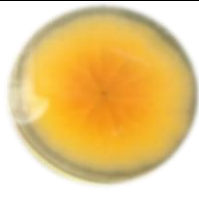

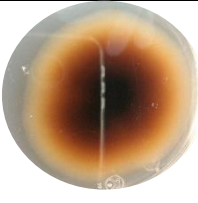

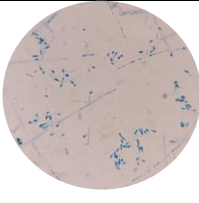
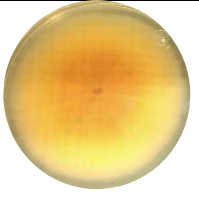

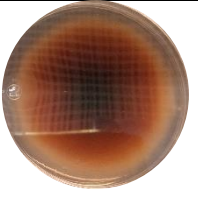

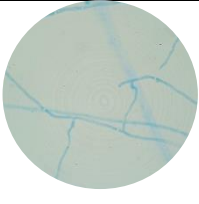
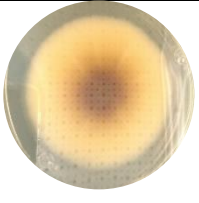

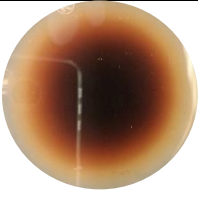

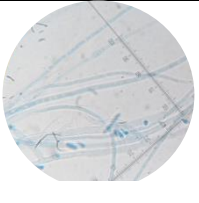
Macromorfología		<p>Mycosel: anverso colonia de color blanca, de aspecto veloso.</p> <p>Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia de color blanco de aspecto veloso, crecimiento radial.</p> <p>Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>			
M17 <i>T. mentagrophytes</i>					
Macromorfología		<p>Mycosel: anverso colonia amarilla de crecimiento limitado, de aspecto aterciopelado, color banco beige.</p> <p>Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia de aspecto veloso de color blanco de crecimiento limitado.</p> <p>Reverso: colonia de color beige sin pigmento.</p>			
M18 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología		<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco de aspecto veloso plano de crecimiento radial e ilimitado.</p> <p>Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia algodonosa de color blanco de crecimiento radial.</p> <p>Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>			
M19 Micelio estéril					
Macromorfología		<p>Mycosel: anverso colonia de color blanca, de aspecto veloso de crecimiento ilimitado.</p> <p>Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible.</p> <p>APD: anverso colonia de color blanco de aspecto veloso, crecimiento radial e ilimitado.</p> <p>Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>			



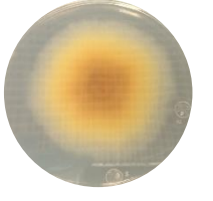
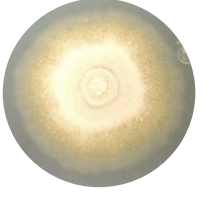
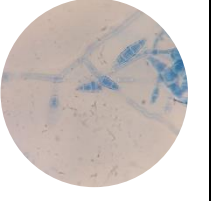
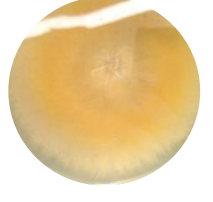

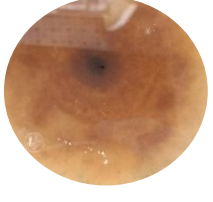

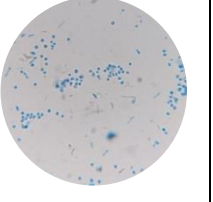





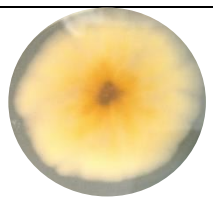
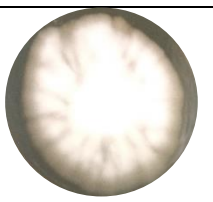
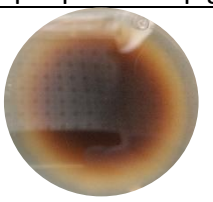

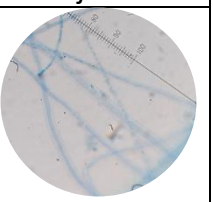
M20 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia limitada, aterciopelada, color blanco-beige. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible. APD: anverso colonia ilimitada, color blanco. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
M21 <i>T. mentagrophytes</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia algodonosa, seca, ilimitada. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusibles. APD: anverso colonia color blanca beige, pulverulenta y de crecimiento ilimitado. Reverso: colonia de color amarillo- naranja sin pigmento.</p>				
M22 <i>T. rubrum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco de aspecto veloso plano de crecimiento radial e ilimitado. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible. APD: anverso colonia algodonosa de color blanco, ilimitada. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
M23 <i>T. mentagrophytes</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia blanca de crecimiento radial e ilimitado, de aspecto pulverulento. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible. APD: anverso colonia de color blanco de aspecto arenoso de crecimiento ilimitado. Reverso: colonia de color beige sin pigmento difusible.</p>				

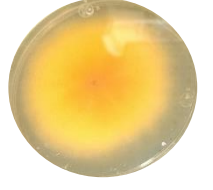

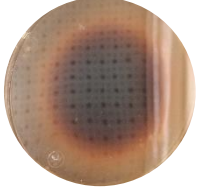

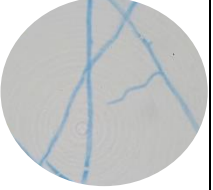
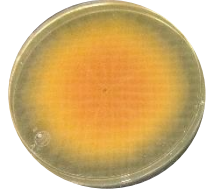

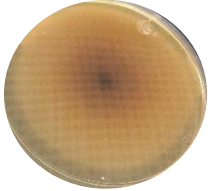

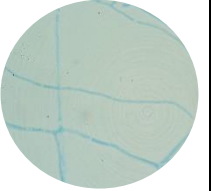
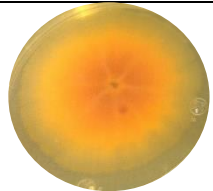

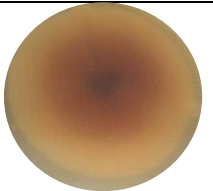

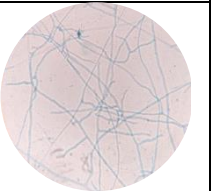
M24 <i>M. canis</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia blanca de crecimiento radial e ilimitado, de aspecto pulverulento. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible. APD: anverso colonia de aspecto veloso de micelio café-blanco, con crecimiento radial ilimitado. Reverso: colonia que presentaba un pigmento amarillo.</p>				
M25 <i>T. mentagrophytes</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia blanca – beige limitada, con surcos de crecimiento limitado. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible. APD anverso: colonia blanca algodonosa de crecimiento ilimitado. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento.</p>				

Macromorfología y micromorfología de aislados de Costa Rica

Clave / Identificación fenotípica	Agar Sabouraud + antibióticos		Agar papa dextrosa		Micromorfología
CR1 <i>M. gypseum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia ilimitada color blanco en la periferia y en el centro color beige, de crecimiento radial, de aspecto seco. Reverso: colonia de color amarillo, sin pigmento difusible. APD: anverso colonia arenosa beige de crecimiento ilimitado. Reverso: colonia blanca sin pigmento.</p>				

<p>CR2 <i>T. rubrum</i></p>					
<p>Macromorfología</p>		<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco de aspecto veloso plano de crecimiento radial. Reverso: colonia de color amarilla sin pigmento difusible. APD: anverso colonia algodonosa de color blanco, ilimitada. Reverso: Presenta un pigmento de color rojo vino difuso.</p>			
<p>CR3 <i>T. rubrum</i></p>					
<p>Macromorfología</p>		<p>Mycosel: anverso colonia amarilla con micelio de color blanco de aspecto, veloso plano, de crecimiento radial. Reverso: colonia de color amarillo- naranja sin pigmento difusible. APD: anverso colonia blanca-café, aterciopelada. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>			
<p>CR4 Micelio estéril</p>					
<p>Macromorfología</p>		<p>Mycosel: anverso colonia amarilla con micelio de color blanco de aspecto, veloso plano, de crecimiento radial. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento. APD: anverso colonia blanca-café, aterciopelada de crecimiento radial e ilimitado. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>			
<p>CR5 <i>T. rubrum</i></p>					
<p>Macromorfología</p>		<p>Mycosel: anverso colonia de color amarilla con micelio blanco de crecimiento radial. Reverso: colonia de color amarillo con pigmento de color rojo. APD: anverso colonia blanca-café, aterciopelada. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino</p>			

CR7 <i>M. gypseum</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso ilimitado color blanco acuminado. Reverso: colonia de color beige sin pigmento. APD: anverso colonia arenosa de color blanco-amarillo. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento.</p>				
CR8 <i>T. mentagrophytes</i>					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia seca ilimitada color amarillo con micelio blanco. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible. APD: anverso colonia pulverulenta, blanca beige. Reverso: colonia de color café- beige sin pigmento.</p>				
CR9 Micelio estéril					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco de aspecto veloso plano de crecimiento radial. Reverso: colonia de color amarillo, sin pigmento. APD: anverso colonia algodonosa de color blanco-beige. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino</p>				
CR10 <i>T. rubrum</i> Micelio estéril					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco de aspecto veloso plano de crecimiento radial e ilimitado. Reverso: colonia de color amarillo sin pigmento difusible. APD: anverso colonia algodonosa de color blanco-beige de crecimiento radial e ilimitado. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				

CR11 <i>T. rubrum</i> Micelio estéril					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia de color amarillo con micelio blanco de aspecto veloso plano de crecimiento radial e ilimitado. Reverso: Colonia de color amarillo sin pigmento. APD: anverso colonia algodonosa de color blanca y crecimiento radial e ilimitado. Reverso: Colonia que presenta pigmento difusible color rojo vino.</p>				
CR12 Micelio estéril					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia limitada de color amarillo con micelio blanco-amarillo, de aspecto aterciopelado. Reverso: colonia amarilla que no presenta pigmento. APD: anverso colonia de color blanco- beige, de crecimiento radial e ilimitado Reverso: colonia de color beige sin pigmento.</p>				
CR13 Micelio estéril					
Macromorfología	<p>Mycosel: anverso colonia limitada de color amarillo con micelio blanco-amarillo, de aspecto aterciopelado. Reverso: colonia de color naranja sin pigmento. APD: anverso colonia de color café aterciopelada de crecimiento radial e ilimitado. Reverso: colonia de color beige sin pigmento.</p>				

Micromorfología

Del análisis fenotípico, 15 de los aislados de México fueron clasificados como *T. rubrum*, cuatro como *T. mentagrophytes*, uno como *M. canis* y los últimos no pudieron ser clasificados ya que presentaban micelio estéril. Con respecto a los aislados de Costa Rica 5 de los 13 aislados fueron identificados como *T. rubrum*,

dos *M. gypseum* y un *T. mentagrophytes*, 5 de los aislados no pudieron ser clasificados debido a que también presentaban micelio estéril.

Con respecto a la morfología presentada en los microcultivos, obtenidos de agar Sabouraud con cloranfenicol + cicloheximida y en agar APD no presentaron diferencias entre sí. Los dermatofitos que fueron clasificados como *T. rubrum* presentaban abundantes hifas delgadas, de aproximados 2 μm de diámetro, presentaban muchos microconidios con aspecto piriforme, que miden aproximadamente de 2 a 4 μm y por lo regular se disponen de manera alterna a lo largo de la hifa, en el caso de estos aislados no se encontró en ninguno macroconidios.

Por otro lado, los dermatofitos identificados como *T. mentagrophytes* presentaron abundante micelio delgado y tabicado, aunque no se logró apreciar zarcillos e hifas en espiral propias de esta especie. Se observaron múltiples microconidios en forma piriformes que median de 1 a 2 μm de ancho, de largo de 2 a 4 μm que crecieron de manera alterna a lo largo de la hifa o en “cruces de Lorena”. De la misma manera que los aislados de *T. rubrum* no se observaron macroconidios.

Los aislados que fueron identificados como *M. gypseum* presentaban poco micelio delgado y tabicado con gran cantidad de macroconidios de aproximadamente de 50 a 120 μm de largo por 10 a 20 μm de ancho, en forma de uso o de hojas de árboles. Los macroconidios presentaron lóculos que iban de 4 a 6 unidades, y pocos microconidios.

El aislado identificado como *M. canis* presentó abundante micelio, con hifas delgadas tabicadas y ramificadas, que le daban el aspecto de un árbol, presentó gran cantidad de macroconidios que parecían hojas con aproximadamente de 50 a 100 μm de largo por 10 a 20 μm de ancho. Los macroconidios presentaron más de 6 septos, y no hubo presencia de microconidios.

Cabe destacar que algunos de los aislados no presentaron micro ni macroconidios, estos hongos dejaron de esporular y solo se pudo observar micelio estéril, así que no se pudieron clasificar con base en su micromorfología.

Tamaño de conidios

Las medidas promedio de los microconidios, de los aislados de México fueron: para *T. rubrum* de 1.52 a 2.71 μm , para *T. mentagrophytes* 1.83 a 3.18 μm y en el caso de *M. canis* que presentó solo macroconidios de 12.06 a 55.88 μm , los dermatofitos clasificados como *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* no presentaron macroconidios.

Con respecto a los aislados procedentes de Costa Rica las medidas promedio de los conidios fueron las siguientes: para *T. rubrum* de 1.63 a 2.74 μm , para *T. mentagrophytes* de 1.51 a 1.92 μm y para *M. gypseum* que sólo presentó macroconidios de 15.25 a 32.40 μm . Es importante mencionar que el tamaño de los conidios de los dermatofitos presentados en este trabajo coincide con lo reportado en la literatura (Bonifaz, 2012).

En la tabla 6 se muestra el tamaño de los conidios después de su identificación completa.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para el tamaño de los conidios se llevó a cabo con la prueba de U de Mann-Whitney, herramienta que mostró que los conidios de los dos países eran diferentes ($p=0.010$).

Tabla 8. Tamaño de conidios de dermatofitos identificados fenotípica y genotípicamente

Especies Identificadas	México		Costa Rica	
	Número de aislados	Diámetro de conidios (cm) \bar{x}	Número de aislados	Diámetro de conidios (cm) \bar{x}
<i>T. rubrum</i>	20	2.10	10	2.17
<i>T. mentagrophytes</i>	1			
<i>M. canis</i>	1	12.06		

<i>M. gypseum</i>				
<i>T. interdigitale</i>	2	2.33	1	1.71
<i>N. gypsea</i>			1	13.9
<i>N. incurvata</i>			1	18.9
<i>A. benhamie</i>	1	1.08		

Caracterización molecular

Con respecto a las concentraciones obtenidas por cada muestra fueron variables entre sí. La concentración y la pureza de ADN fueron cuantificadas cualitativamente por medio de electroforesis y cuantitativamente por medio de espectrofotometría. De acuerdo a los valores que se obtuvieron, podemos decir que la pureza del ADN era aceptable ya que los valores se encontraban entre el intervalo (1.8-2.0). En la tabla 9 podemos ver la concentración de cada muestra analizada por espectrofotometría y en la figura 2 se muestra la separación del ADN por electroforesis, para verificar la calidad del ADN.

Tabla 9. Cuantificación de ADN por espectrofotómetro

Clave	ADN (ng/μL)	Clave	ADN (ng/μL)
M1	47.10	M20	75.10
M2	62.60	M21	53.30
M3	1675.75	M22	62.10
M4	63.50	M23	100.85
M5	98.35	M24	80.80
M6	4.80	M25	45.05
M8	129.05	CR2	18.0
M9	72.40	CR3	7.03
M10	1787.75	CR4	23.95
M11	75.05	CR5	9.60
M12	455.40	CR6	65.53
M 13	543.95	CR7	68.83

M14	145.50	CR8	74.60
M15	185.40	CR9	105.10
M16	148.85	CR10	3.50
M17	149.20	CR11	209.06
M18	140.45	CR12	1965.85
M19	150.05	CR13	75.95

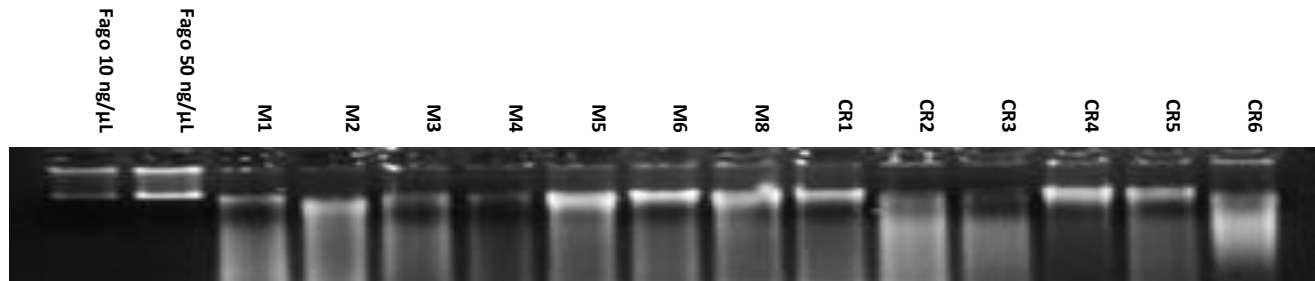
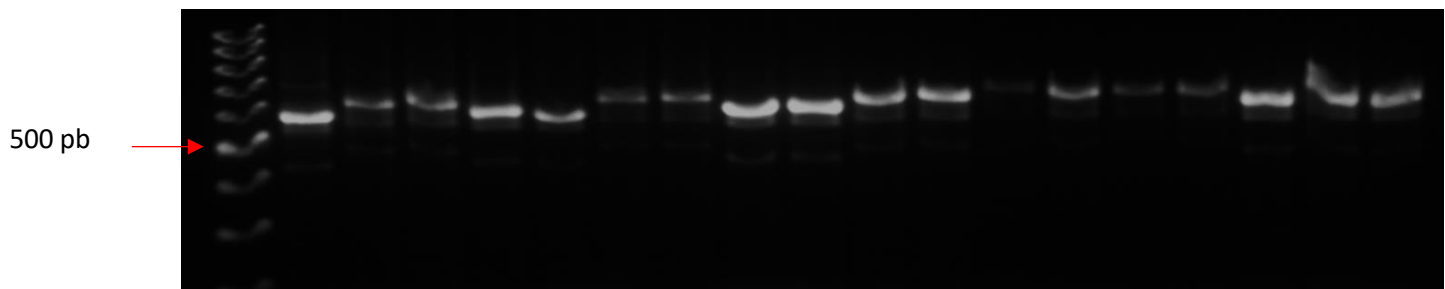


Figura 2. Separación por electroforesis de ADN de 13 cepas de dermatofitos en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ (10,000X, Biotium, USA). La cantidad de ADN se comparó con diferentes concentraciones de fago.

Amplificación de la secuencia de la región ITS con los marcadores ITS1 e ITS4

Esta parte se llevó a cabo con las condiciones reportadas por Rezaei-Matehkolaei *et al.* (2014) y las concentraciones de ADN se ajustaron a 50 ng/µL, en la figura 3 se muestra un ejemplo de los productos de PCR en la electroforesis.



Marcador pb
M1 M2 M3 M4 M5 M6 M8 M9 M10 M11 CR1 CR2 CR3 CR4 CR5 CR7 CR8 CR9

Identidad fenotípica de las secuencias de dermatofitos procedentes de México y Costa Rica

Tomando en cuenta las secuencias editadas de los dermatofitos estudiados, se procedió a compararlas con las secuencias depositadas en el GenBank, se obtuvo el valor de similitud, así como los de expectación e identidad, que fueron necesarios para corroborar la amplificación indicada del fragmento de ITS. En este caso las secuencias analizadas presentaron un porcentaje de similitud en un rango de 90 al 100% y una identidad del 94 al 100%, todo esto mostrado en la Tabla 8. De los 24 aislados procedentes de México 19 fueron compatibles con *T. rubrum*, dos con *T. interdigitale*, uno con *T. mentagrophytes*, uno con *M. canis* y otro con *A. benhamie*. De los 13 aislados procedentes de Costa Rica, 10 fueron compatibles como *T. rubrum*, uno con *T. interdigitale*, uno con *Nannizzia gypsea* y otro con *N. incurvata*. El análisis filogenético se llevó a cabo con base en las secuencias de referencia depositadas en el GenBank, de las diferentes especies de dermatofitos amplificadas con el marcador molecular ITS.

A manera de resumen, en la tabla 10 se compara los dos tipos de identificaciones y los valores del BLASTn.

Tabla 10. Comparación fenotípica y genotípica de los aislados de dermatofitos procedentes de México y Costa Rica

Clave	Identificación fenotípica	Identificación genotípica	% de Similitud	Valor de expectación	%de identidad
M1	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M2	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M3	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	100%
M4	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	91%	0.0	99%
M5	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M6	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M8	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	96%	0.0	94%

M9	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M10	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	100%
M11	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M12	Micelio estéril	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M 13	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	100%
M14	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	97%	0.0	99%
M15	Micelio estéril	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M16	Micelio estéril	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M17	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	100%	0.0	100%
M18	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	100%
M19	Micelio estéril	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M20	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	98%
M21	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	99%	0.0	100%
M22	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
M23	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100%	0.0	100%
M24	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	100%	0.0	99%
M25	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. erinacei</i>	99%	0.0	99%
CR1	<i>M. gypseum</i>	<i>N. gypsea</i>	100%	0.0	99%
CR2	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	90%	0.0	100%
CR3	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	4,00E-138	100%
CR4	Micelio estéril	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
CR5	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	100%
CR6	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	100%
CR7	<i>M. gypseum</i>	<i>N. incurvata</i>	99%	0.0	100%
CR8	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100%	0.0	100%
CR9	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	94%	0.0	99%
CR10	Micelio estéril	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
CR11	Micelio estéril	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	99%
CR12	Micelio estéril	<i>T. rubrum</i>	100%	0.0	98%
CR13	Micelio estéril	<i>T. rubrum</i>	99%	0.0	99%

Análisis de las secuencias ITS

El mejor modelo evolutivo fue seleccionado una vez que las secuencias fueron editadas y alineadas en el programa de bioinformática MEGA 7. Para seleccionar el modelo evolutivo a utilizar en el análisis filogenético (método de Máxima Verosimilitud), se ingresaron las secuencias editadas al programa Jmodeltest 2, al finalizar el análisis se consideró el valor de información de AKAIke (AIC), y se obtuvo

el modelo evolutivo más cercano al desarrollo y evolución de las secuencias ITS de los dermatofitos en estudio (GTR+G).

Máxima Verosimilitud para el fragmento ITS amplificado

Con el fin de posicionar de manera filogenética a los aislados de dermatofitos procedentes de México y Costa Rica se construyó un árbol con el método de Máxima Verosimilitud (Figura 3). El árbol formó cuatro grupos; el grupo 1 incluyó a los aislados identificados como *T. rubrum* y formó dos subgrupos, un subgrupo que incluye a 27 aislados, el otro subgrupo incluyó dos aislados, estos se reagruparon con la cepa de referencia de *T. rubrum* con número de acceso NR_131330.1 con un bootstrap de 57.2%. El grupo dos fue integrado por dos subgrupos, en uno se agruparon 4 aislados, previamente identificados como *T. mentagrophytes*, el análisis filogenético asoció a las secuencias con dos cepas de referencia *T. mentagrophytes* y *T. interdigitale*, las cuales tienen como número de acceso KT155871.1 y NR_144900.1 respectivamente, estando más asociadas a la cepa de referencia de *T. interdigitale*, con un bootstrap de 89.2%, el otro subgrupo fue integrado por un aislado identificado fenotípicamente como *T. mentagrophytes*, el cual se separó del resto con una cepa de referencia de *T. erinace* con número de acceso KT155922.1, con un Bootstrap de 95.9%. El tercer grupo fue integrado por dos subgrupos, incluyó los aislados CR1 y CR7 que fueron identificados primeramente como *M. gypseum*, pero en el análisis filogenético CR1 se agrupó con *N. gypsea* y CR7 se agrupó con *N. incurvata*, con números de acceso KT155845.1 y KT155816.1, con un bootstrap de 86.3 y 98.2% respectivamente. El cuarto grupo fue integrado por el aislado M24, el cual fue identificado fenotípicamente como *M. canis*, el que coincide con la identificación filogenética, agrupándose con la cepa de referencia de *M. canis* con el número de acceso NR_131265.1 y un bootstrap del 100%.

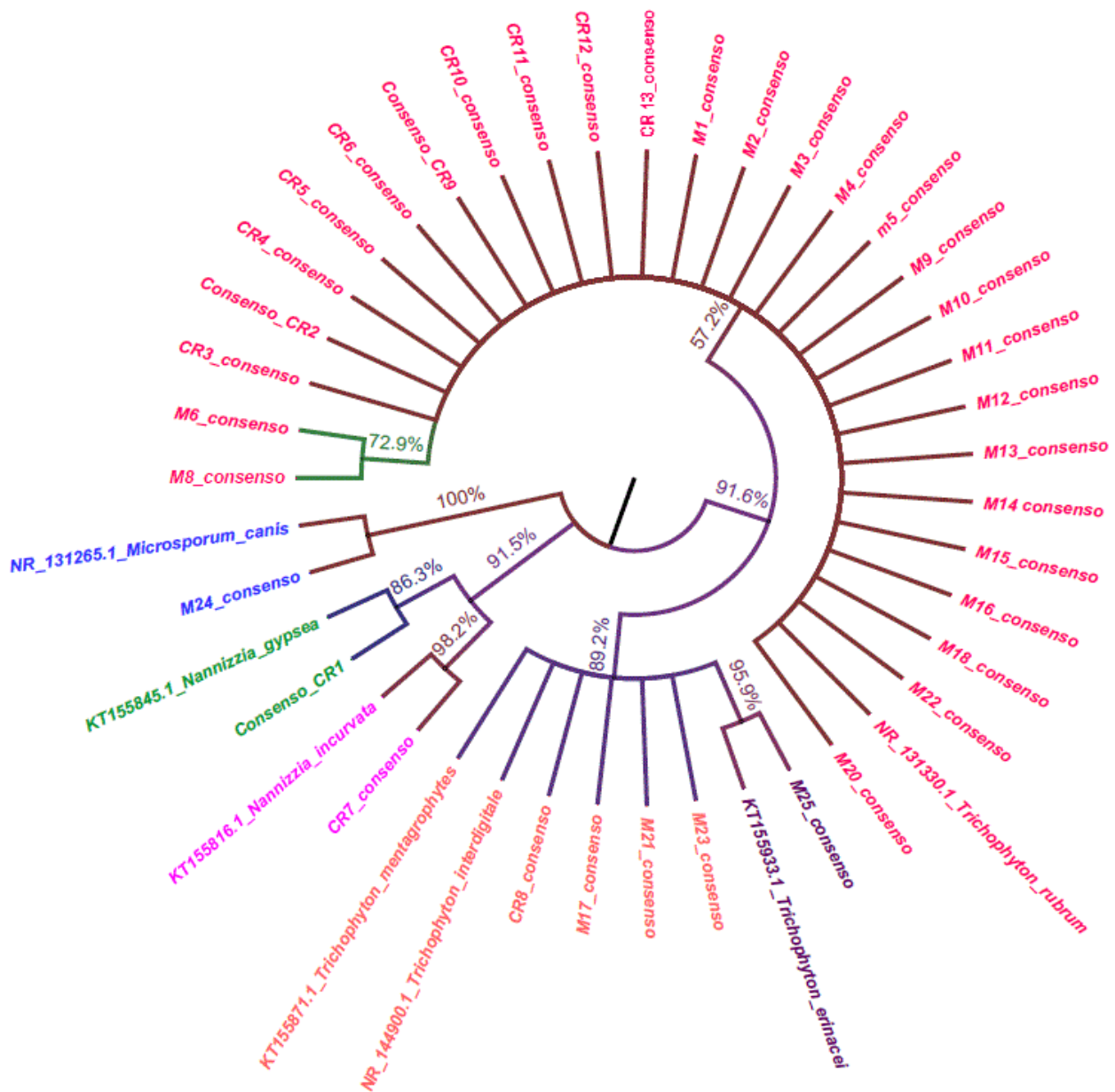


Figura 4. Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud, con las secuencias ITS de aislados de las diferentes especies de dermatofitos. Se utilizó el programa MEGA7.

DISCUSIÓN

Las dermatofitosis, es una infección micótica común en todo el mundo, se produce en todas las edades y en ambos sexos, más del 70% de la población experimentará esta infección durante su vida (Brooks y Bender, 1996). Más de \$ 500 000 000 por año se gasta en todo el mundo en medicamentos que se dirigen a la dermatofitosis (Ilkit y Durdu 2015).

El diagnóstico de las micosis en dermatología se basa actualmente en el examen microscópico de la piel, uñas o muestras de cabello, el examen micológico directo es un paso esencial para confirmar la identificación del hongo, pero no permite la identificación del agente causal. Por lo que se recurre al cultivo de los hongos, el cultivo presenta inconvenientes como, el tiempo, la dificultad para identificar con certeza, los resultados falsos-negativos, el aislamiento de hongos filamentosos no dermatofitos (Verrier y Monod, 2017).

La identificación de la macromorfología se observó como lo indica Bonifaz en Micología Medica Básica, 2012; para el caso de *T. rubrum* se observó una colonia de aspecto veloso, algodonosa, blanca, al reverso presentó pigmento de color vino, para *T. mentagrophytes* se observó colonia de aspecto pulverulento, plana seca e ilimitada sin pigmento en el reverso, en *M. gypseum* se observó colonia ilimitada de aspecto pulverulento o arenoso al principio de color blanco y posteriormente de color beige, sin presentar pigmento al reverso y con respecto a *M. canis* la colonia fue ilimitada de aspecto veloso plano y radial de color amarillo con micelio blanco, y en el reverso presentaba un pigmento amarillo – naranja. Aunque las características morfológicas coincidían existían pequeñas variaciones en la pigmentación, en la forma de la colonia, el tiempo de crecimiento, aunque se tratará de la misma especie. Uno de los puntos más importantes fue que nueve de los aislados presentaban la macromorfología típica de *T. rubrum* pero al momento de observar al microscopio la micromorfología no presentaba conidios, solo micelio estéril, esto complica mucho la identificación del microorganismo a nivel fenotípico.

Con respecto al tamaño de los conidios de los aislados mostraron un tamaño que corresponde con lo indicado por Bonifaz 2012, en el caso de *T. rubrum* se observaron conidios en forma piriforme o de gotas, que medían entre 2 a 4 μm , para de *T. mentagrophytes* se observaron microconidios libres de 2 a 4 μm , con respecto a *M. gypseum* se observó macroconidios de 50 a 120 μm de largo por 10 a 20 μm de ancho en forma de hojas de árbol, y en cuanto a *M. canis* presenta macroconidios de 50 a 100 μm de largo por 10 a 20 μm de ancho en forma de uso o hojas. En el caso de los *T. rubrum* procedentes de México y Costa Rica se compararon entre sí con la prueba de U de Mann-Whitney y se determinó que existían diferencias significativas estadísticamente entre estos dos países con respecto al tamaño de sus conidios ($p= 0.010$), lo que muestra que los aislados que corresponde a Costa Rica eran de mayor tamaño con respecto a los aislados de México. Este caso demuestra que, aunque se trata de la misma especie de dermatofitos pueden variar en algunas características fenotípicas dependiendo de donde sea el área geográfica en la que se desarrollen.

En ocasiones la morfología de los dermatofitos no es suficiente para una correcta identificación, por lo que se han utilizado técnicas de biología molecular, como es el caso del análisis mitocondrial de ADN con la técnica molecular RFLP que en principio no demostró gran importancia para la diferenciación de especies de dermatofitos, sin embargo, el análisis de la secuencia completa del ADN mitocondrial de *T. rubrum*, *T. ajelloi*, *T. mentagrophytes*, *M. nanum*, *M. canis* y *E. floccosum* sugirieron que las regiones no codificantes del ADN mitocondrial podrían ser útiles para la identificación de especies (Wu *et al.*, 2009).

Otro de los trabajos moleculares que han servido para la identificación de los dermatofitos fue el de la secuenciación de los nucleótidos del gen quitina sintasa 1 que ayudaron a diferenciar entre los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, así como especies del género *Trichophyton* (Cafarchia *et al.*, 2009).

También se ha utilizado la secuenciación de la región ITS para los análisis filogenéticos e identificación de las especies de dermatofitos. En particular, la

información obtenida a partir del análisis de la región ITS es muy sensible y fiable (Cafarchia *et al.*, 2013).

Con base en las características de las regiones ITS, en este trabajo se emplearon marcadores para esta región del ADN y de esta manera se pudo identificar a nivel genotípico, con ayuda del algoritmo BLASTn y por análisis filogenético. Esta caracterización dio lugar a reubicar e identificar las especies que con la caracterización fenotípica no se logró, tal es el caso de los 9 aislados que no presentaron conidios (M12, M15, M16, M19, CR4, CR10, CR11, CR12, CR13) los cuales pudieron ser identificados como *T. rubrum*, además permitió la reubicación de 5 aislados (M21, M23, CR1, CR7, CR8), en el caso de los aislados M21, M23 y CR8 fueron identificados fenotípicamente como *T. mentagrophytes* pero una vez haciendo la caracterización genotípica fueron reubicados como *T. interdigitale*, en el caso del aislado CR1 se identificó primeramente como *M. gypseum* y se reubicó como *Nannizzia gypseum*, el aislado CR7 también identificado como *M. gypseum* se reubicó como *N. incurvata*, el aislado M25 también fue identificado como *T. mentagrophytes* pero se reubicó como *T. erinacei*. Estos resultados hacen énfasis en porque se debe de implementar métodos moleculares para mejorar la identificación de los dermatofitos y no solo seguir usando los métodos convencionales.

Los dermatofitos han venido evolucionando, con la geografía y las condiciones socioeconómicas, como es el caso de *E. floccosum*, *M. audouinii* y *T. schoenleinii* que actuaron como los principales patógenos de enfermedades fúngicas superficiales hace 100 años, pero su frecuencia ha disminuido drásticamente desde mediados del siglo XX y se limita a los países menos desarrollados, hoy en día los dermatofitos que han venido en aumento son *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans* y *M. canis*, estas especies se han convertido en las principales a nivel mundial (Zhan y Liu, 2017).

Otros dermatofitos como *T. violaceum*, *T. verrucosum* y *M. ferrugineum* son principalmente endémicos de algunas regiones de África, Asia y Europa. En la actualidad *T. rubrum* es el patógeno principal para infecciones de la piel y de las

uñas, mientras que *M. canis*, *T. tonsurans* y *T. violaceum* son los dermatofitos predominantes en tiña de la cabeza (Zhan y Liu, 2017).

CONCLUSIÓN

Como se pudo observar con los resultados obtenidos por métodos fenotípicos, estos no son suficientes para llevar a cabo una correcta identificación de los dermatofitos, por lo cual se recomienda el uso de un análisis polifásico que incluya principalmente análisis moleculares, como el de genes o marcadores moleculares, como sucedió en este trabajo, donde se utilizaron regiones ITS.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol.* 2010; 28(2): 197-201.
3. Arenas R. Dermatofitos. *En: Arenas R. editor. Micología médica ilustrada (5ta Ed): México; McGraw-Hill. 2014; p. 67-95.*
4. Arenas R. Dermatofitosis en Mexico, *Rev Iberoam Micol.* 2002;(19): 63-67.
5. Bonifaz A, López R, Padilla C. 1er Consenso micosis superficiales. *Dermatología Rev.* 1999; 43(2): 80-88.
6. Bonifaz JA. Dermatofitos. *En: Micología Médica Básica. Cuarta edición. México. McGraw-Hill Interamericana Editores; 2012. p. 93-124.*
7. Brooks KE, Bender JF. Tinea pedis: diagnosis and treatment. *Clin Podiatr Med Surg.* 1996;13(1):31–46.
8. Cafarchia C, Iatta R, Latrofa MS, Gräser Y, Otranto D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol.* 2013;20:336–51.
9. Cafarchia C, Otranto D, Weigl S, Campbell BE, Parisi A, Cantacessi C, et al. Molecular characterization of selected dermatophytes and their identification by electrophoretic mutation scanning. *Electrophoresis.* 2009;30(20):3555–64.
10. Carballo G. Rojo Neutro: Nuestra experiencia en diagnóstico en micosis superficiales en cinco pacientes. *Rev Chil Infect.* 2002; 19(4):267-270.
11. Cuenca M, Gadea I, Martín E, Pemán J, Pontón J, Rodríguez L. Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Madrid: 2009.
12. Davidson FD, Mackenzie DWR, Owen R J. Deoxyribonucleic acid base composition of dermatophytes. *J Gen Microbiol.* 1980;118(2):465-470.
13. De Hoog G.S., Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, Kupsch, J., Benjamin S. Christiane, Freeke J, Goker M, Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Graser Y. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia.* 2017; 182(1–2):5-31.
14. De Mata Grace G., Mata Leonardo. Dermatofitosis en Costa Rica, *Rev Biol Trop.* 1959;7(2):151-189.
15. Echeverría L. Reseña histórica del descubrimiento de los hongos dermatofitos desde el siglo 1 a.C. hasta los trabajos actuales. *Sci Int J.* 2016;13(3):21-33.
16. 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.
17. Gräser Y, El Fari, Presber, Sterry, Tietz. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. Br J Dermatol. 1998; 138: 576–582.
 18. Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. Mycopatologia. 2008; 156:239-56.
 19. Hainer L. Dermatophyte Infections. Ann Fam Med. 2003; 67(1):101-107.
 20. 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.
 21. Havlickova B, Czaika VA, Fredrich M. Epidemiological trends in skin mycosis worldwide. Mycosis. 2008;51(4):2–15
 22. Howard D. Ascomycetes: the dermatophytes. In: Howard D, editor. Fungi pathogenic for humans and animals. Pat A. biology. New York:Marcel Dekker. 1983; p. 113-47.
 23. Ilkit M, Durdu M. Tinea pedis: the etiology and global epidemiology of a common fungal infection. Crit Rev Microbiol 2015; 41(3): 374–388.
 24. 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.
 25. L'Ollivier C, Cassagne C, Normand AC, Bouchara JP, Contet-Audonneau N, Hendrickx M, et al. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. Med Mycol. 2013;51(7):713–20.
 26. Li HC, Bouchara J-P, Hsu MM-L, Barton R, Su S, Chang TC. Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. J Med Microbiol. 2008;57(5):592–600.
 27. Metin B, Heitman J. Sexual reproduction in dermatophytes. Mycopathologia. 2017 182(1-2): 45–55.
 28. Molina De Diego A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(3):33–9.
 29. Noble SL, Pharp D, Forbes R. Diagnosis and management of common *tinea* infections, Am Fam Physician. 1998 1;58(1):163-174.
 30. Patel GA, Schwartz RA. *Tinea capitis*: Still an unsolved problem? Mycoses. 2011;54(3):183–8.
 31. Pérez Cardenas JE. Aspectos Actuales Sobre Las Dermatofitosis Y Sus Agentes Etiológicos. Biosalud. 2005;14:105–21.
 32. Philpot CM. Geographical distribution of the dermatophytes: A review. J Hyg (Lond). 1978;80(2):301–13.
 33. Ridell R. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycology. 1950;42(2): 265-270.

34. Sabouraud, R. 1910. Les teignes. Masson, Paris.
35. Sandoval NJ, Arenas R, Giusiano G, García D, Chávez L, Zúniga P. Diagnóstico y tratamiento de dermatofitosis. Rev Med Hondur. 2012;80(2):66–74.
36. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. Mycopathologia. 2008;166: 335–52.
37. Tartabini ML, Bonino GS, Racca L, Luque AG. Estudio taxonómico de aislamientos clínicos de Trichophyton en Rosario, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2013;45(4):248–53.
38. Uribe MP, Cardona-Castro N. Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. Rev CES Med. 2013;27(271):67–75.
39. Verrier J, Monod M. Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology. Mycopathologia. 2017;182(1–2):193–202.
40. Vilata J. Micosis Cutáneas. Argentina. Ed. Médica Panamericana, 2006;p. 20-25.
41. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clinical Microbiology Reviews. 1995;8:240–59.
42. Weitzman, I, McGinnis M, Padhye, A.A., Ajello, L. The genus *Arthroderma* and its synonym *Nannizzia*. Mycotaxon. 1986;25(2):505–518.
43. Westerberg DP, Voyack MJ. Onychomycosis: Current trends in diagnosis and treatment. Am Fam Physician. 2013;88(11):762–70.
44. White TC, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. Eukaryotic Cell. 2008;7:1238–45.
45. Wu Y, Yang J, Yang F, Liu T, Leng W, Chu Y, et al. Recent dermatophyte divergence revealed by comparative and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes. BMC Genomics. 2009;10:1–14.
46. Zhan P, Liu W. The Changing face of dermatophytic infections worldwide. Mycopathologia.; 2017;182(1–2):77–86.