



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MICOLOGÍA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA
DETECCIÓN DE HONGOS DERMATOFITOS EN EQUINOS**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA
SOFÍA MÉNDEZ RIVERA**

TUTOR PRINCIPAL

Ph.D. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ UAM-X

Dra. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ FM-UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA CD.MX. JUNIO 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.

HONORABLE JURADO

Presidente: Dra. Patricia Manzano Gayosso

Secretario: Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares

Vocal: Dr. Germán Lombardero Goldaracena

Suplente: Dra. Francisca Hernández Hernández

Suplente: Dr. Daniel Martínez Gómez

CONTENIDO

1.	Introducción	1
1.1	Historia de los dermatofitos	1
1.2	Dermatofitos	2
1.2.1	Género <i>Trichophyton</i>	3
1.2.2	Género <i>Microsporum</i>	6
1.2.3	Género <i>Nannizzia</i>	8
1.2.4	Géneros <i>Paraphyton</i> y <i>Lophophyton</i>	9
1.3	Dermatofitosis equina	10
1.4	Diagnóstico de laboratorio	13
1.5	Tratamiento	14
1.6	Prevención	15
1.7	Antecedentes del diagnóstico molecular de las dermatofitosis	16
2.	Justificación	23
3.	Hipótesis	24
4.	Objetivo	25
4.1	Objetivo general	25
4.2	Objetivos específicos	25
5	Materiales y métodos	26
5.1	Muestras y aislados clínicos	26
5.2	Cultivos monospóricos para la extracción de ADN	26
5.3	Extracción de ADN	27
5.3.1	A partir del cultivo	27
5.3.2	A partir de pelo y escamas	28
5.4	Cuantificación	29
5.5	Diseño de oligonucleótidos específicos para las diferentes especies de <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> y <i>Nannizzia</i> que afectan a los équidos	29
5.6	Estandarización de la PCR punto final	31
5.7	Prueba de especificidad de los oligonucleótidos	32
5.8	Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos	32

5.9	Estandarización de la PCR Multiplex con ADN de aislamientos y la cepa de referencia	33
5.10	Confrontación de la prueba de PCR multiplex con ADN extraído de pelo y escamas	35
5.11	Análisis estadístico	35
6	Resultados	36
6.1	Muestras y aislados clínicos	36
6.2	Cultivo monospórico para la extracción de ADN	37
6.3	Extracción de ADN	37
6.3.1	A partir de cultivo	37
6.3.2	A partir de pelo y escamas	39
6.4	Diseño de oligonucleótidos específicos para las diferentes especies de <i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> y <i>Nannizzia</i> que afectan a los équidos	39
6.5	Estandarización de la PCR punto final	40
6.6	Prueba de especificidad de los oligonucleótidos	42
6.7	Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos	44
6.8	Estandarización de PCR multiplex con ADN de aislamientos y la cepa de referencia	45
6.9	Confrontación de la PCR multiplex con ADN extraído de pelo y escamas	51
6.10	Análisis estadístico	58
7	Discusión	61
8	Conclusiones	72
9	Referencias	73
Anexo I	Reactivos y soluciones	79
Anexo II	Fórmulas estadísticas	82

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1. Reactivos empleados para la amplificación de la región ITS y el gen TEF-1 α	41
Cuadro 2. Muestras seleccionadas para el desafío de la prueba	52
Tabla 1. Análisis estadístico de la prueba convencional (aislamiento y KOH) y la prueba molecular (PCR)	59
Tabla 2. Análisis estadístico de cada especie trabajada en este estudio	60
Cuadro 3. Cantidad de Kcal/mol necesarias para destruir los enlaces entre cada primer para la prueba Multiplex I	70
Cuadro 4. Cantidad de Kcal/mol necesarias para destruir los enlaces entre cada primer para la prueba Multiplex II	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microconidias de <i>Trichophyton equinum</i> , teñido con LAA (40x)	5
Figura 2. Cultivos de <i>Trichophyton equinum</i> mostrando ambas variedades, <i>Trichophyton equinum</i> var. <i>autotrophicum</i> y <i>T. equinum</i> var. <i>equinum</i>	5
Figura 3. Microconidios y macronidio de <i>T. mentagrophytes</i> teñido con LAA. (40x)	6
Figura 4. Cultivo de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> en SDA.	6
Figura 5. Macroconidios de <i>Microsporum canis</i> , teñido con LAA. (40x)	7
Figura 6. Cultivo de <i>Microsporum canis</i> disgónico sembrado en SDA.	7
Figura 7. Macroconidios de <i>Nannizzia gypsea</i> teñido con LAA (40x).	9
Figura 8. Cultivo de <i>Nannizzia gypsea</i> sembrado en SDA.	9
Figura 9. Patogenia de los dermatofitos.	11
Figura 10 Lesiones en un equino (A59) causadas por <i>Trichophyton equinum</i> y <i>Nannizzia gypsea</i> .	12
Figura 11. Equino (A59) después de recibir tratamiento	12
Figura 12. Descripción de una reacción de PCR	18
Figura 13. Diagrama de las pruebas de especificidad de los oligonucleótidos prueba Multiplex I	34
Figura 14. Diagrama de las pruebas de especificidad de los oligonucleótidos prueba Multiplex II	34
Figura 15. Cultivo y microcultivo de <i>T. equinum</i> cepa CBS 292.81	36
Figura 16. Cultivo de los aislamientos N2, K8 y H2 en caldo dextrosa Sabouraud	37
Figura 17. ADN de aislamientos clínicos extracción hecha con el protocolo FMVZ	38
Figura 18. Extracción de ADN Protocolo Fac. de Medicina	38
Figura 19. ADN obtenido de muestras de pelo y escamas	39
Figura 20. Amplificados individuales de cada especie de dermatofito.	42
Figura 21. Prueba de especificidad para los iniciadores TmenITS-331F y TmenITS-331R	43

Figura 22. Prueba de especificidad de los iniciadores TequITS-442F y TequITS-442R	43
Figura 23. Productos de PCR de las diferentes concentraciones de ADN.	44
Figura. 24. Productos de PCR de las diferentes concentraciones de ADN.	45
Figura 25. Desafíos entre los oligonucleótidos y el ADN para la prueba M-II	46
Figura 26. Desafíos entre los oligonucleótidos y el ADN para la prueba M-I	47
Figura 27. M-I con las diferentes concentraciones de oligonucleótidos	48
Figura 28. Prueba M-I completa	49
Figura 29. Prueba M-I con diferentes concentraciones de oligonucleótidos.	49
Figura 30. Nuevos oligonucleótidos de <i>T. equinum</i> y <i>T. mentagrophytes</i>	51
Figura 31. Desafío de la prueba para <i>M. canis</i> con ADN extraído de pelo y escamas	53
Figura 32. Desafío de la prueba para <i>M. canis</i> con ADN extraído de pelo y escamas	53
Figura 33. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio	54
Figura 34. Desafío de la prueba para <i>T. verrucosum</i> con ADN extraído de pelo y escamas	54
Figura 35. PCR para <i>T. verrucosum</i> ADN extraído a partir de pelo y escamas (pruebas)	55
Figura 36. Desafío de la prueba para <i>T. mentagrophytes</i> con ADN extraído de pelo y escamas	55
Figura 37. Desafío de la prueba para M-I con ADN extraído de pelo y escamas	56
Figura 38. Desafío de la prueba para M-I con ADN extraído de pelo y escamas	57
Figura 39. Desafío de la prueba para M-I con ADN extraído de pelo y escamas	57

Resumen

Las dermatofitosis es una infección del tejido queratinizado causada por un grupo de hongos queratinofílicos llamados dermatofitos. Inicialmente este grupo contaba solo con 3 especies *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, en la actualidad se ha propuesto una nueva clasificación taxonómica quedando conformado por 7 géneros: *Arthraderma*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia*, *Lophophyton*, *Paraphyton* y *Epidermophyton*. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (PCRm) para realizar el diagnóstico de las principales especies de dermatofitos que afectan a los équidos en un menor tiempo al requerido por la prueba convencional, el cual es lento y requiere aproximadamente de 15 a 20 días. Para la estandarización de la prueba se emplearon 4 cepas aisladas de casos clínicos (*Nannizzia gypsea*, *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum* y *Trichophyton mentagrophytes*) y una cepa de referencia de *Trichophyton equinum* obtenida de la colección fungal del CBS- Knaw Fungal Biodiversity Center and Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences con número de identificación CBS 292.81. Los oligonucleótidos utilizados en este experimento fueron diseñados específicamente para cada especie a partir de la región ITS 1 e ITS 2 y del gen TEF-1 α . De un estudio previo se utilizaron un total de 120 muestras de pelo y escamas, de las cuales 26 eran positivas por aislamiento (21.6%) a seis especies diferentes: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton verrucosum*, *Microsporum canis*, *Nannizzia gypsea* y *Nannizzia nana* (antes *Microsporum nanum*). Para el desafío y el análisis estadístico se tomaron los 22 ejemplares positivos en el aislamiento y 28 fueron elegidos al azar.

La primera parte consta del análisis general de los datos donde se compara mediante cuadros de contingencia la sensibilidad y la especificidad del aislamiento, KOH y PCR. Los resultados muestran que la prueba molecular tuvo una especificidad de un 82.1% y una sensibilidad del 68.2% en comparación con la prueba de oro. Se comparó la eficiencia de la prueba molecular cada una de especie y se observó que la PCR para los géneros de *N. gypsea* y *M. canis* presentaron una sensibilidad del 81.8 % y 99.99% y una especificidad del 97.4% y 81.3% respectivamente. Mientras que para las especies pertenecientes al género *Trichophyton* los tres tuvieron una especificidad del 99.99%, aunque para *T. verrucosum*

todavía se requiere realizar un mayor número de desafíos pues solo se contaba con un aislamiento positivo, por lo que no se considera un resultado confiable, en cuanto a *T. equinum* la sensibilidad que presentó fue de un 50% y *T. mentagrophytes* una sensibilidad del 42.9%, por lo que se concluye que el principal problema estuvo en el método de extracción de ADN a partir de muestras de tejido queratinizado.

Palabras clave: Dermatofitos, *Nannizzia gypsea*, *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, PCR múltiplex.

Abstract

Dermatophytosis is a skin disease caused by keratinophilic fungi known as dermatophytes; this group have 3 species: *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*, recently there has been a proposal from a group of mycologist to dividing the dermatophytes in 7 genus: *Arthraderma*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia*, *Lophophyton*, *Paraphyton* and *Epidermophyton*, by means of DNA and RNA studies.

Dermatophytic skin infection remains one of the most common diseases in world. The diagnosis of these diseases is based on the demonstration of fungal structures in direct microscopy, the clinical culturing of specimens, and the identification of the causative species. This combination is referred to as the diagnostic gold standard. However, these standard methods have a number of disadvantages. Direct microscopy lacks specificity as it generally does not allow distinction of different fungal species. Culturing and subsequent species identification are slow, usually require around 15 to 21 days. The sensitivity of both methods in routine clinical laboratory practice is low, especially for hair and scale infections. The aim of this study was to develop and standardize a multiplex polymerase chain reaction to diagnose most common dermatophytes involved in equine dermatophytosis (*Nannizzia gypsea*, *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton equinum*).

The primers were designed specifically for each species using the sequence of region ITS 1 and ITS 2 y the gene TEF-1 α , reported in the GenBank NCBI.

In a previous work we collected 120 samples of hair and scales and 26 samples had a positive culture that depicted the 21.6% of all samples. The species isolated were: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton verrucosum*, *Microsporum canis*, *Nannizzia gypsea* and *Nannizzia nana* (before known as *Microsporum nanum*). This study required a reference strain of *T. equinum* obtained from CBS- Knaw Fungal Biodiversity Center, and Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences with an identification number CBS 292.81.

A total of 50 samples were used for the challenge test, 22 have been positive by conventional diagnostic and the remaining samples were selected randomly. So did the information of the statistics part was divided in two parts, the first one consist of the assessment between the

PCR, KOH and isolated test, all of them were compared by crosstabs to evaluate the sensibility and specificity between the culture, KOH and PCR. The results demonstrated in general that the PCR test had a specificity 82.2% and a sensibility 62%, compared to the isolated test. Then we compared the PCR test for each species; *Nannizzia gypsea* and *Microsporum canis* have a sensibility of 81.8 % y 99.99% and a specificity of 97.4% and 81.3% respectively, while in the genus *Trichophyton*, *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* and *T. equinum* have a specificity of 99.99% although *T. verrucosum* needs more positive samples to confirm the trustworthiness of the result. *T. mentagrophytes* and *T. equinum* had a sensibility of 42.9% and 50% respectively, so we conclude that the problem was in the DNA tissue extraction method, because in the development process we had good amplification.

Keywords: Dermatophytes, *Nannizzia gypsea*, *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, multiplex PCR

1. Introducción

1.1 Historia de los dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo de hongos especializados, que a través de largos procesos evolutivos se han adaptado para invadir y colonizar el tejido queratinizado de los animales. Aunque estos hongos ya existían desde tiempos prehistóricos, se cree que tienen su aparición en la era Paleozoica y que han afectado a los animales y al hombre por millones de años.^{1,2} El primer registro de una infección causada por estos microorganismos fue realizado por Aulo Cornelio Celso, quien la detalló como una infección supurativa en el cuero cabelludo que llegó a ser conocida como querión de Celso. Esto fue documentado en la época de Hipócrates en los años 460-377 a.c.¹

En los siglos XVII y XVIII algunos ilustres pintores como Bartolomé Esteban Murillo y Santa Isabel de Hungría plasmaron obras en donde se representaban personas con probables infecciones micóticas, también existen reseñas de estas micosis en algunos escritos de Fray Bernardino de Sahagún.²

En el siglo XIX el médico polaco Roberto Remark observó por primera vez la presencia de estructuras micóticas en las escaras de un paciente; sin embargo, sus trabajos fueron divulgados hasta 1839.^{1,2} En 1841 los hallazgos de Remark fueron confirmados por el médico húngaro David Gruby, quien además cultivó, observó y nombró al género *Microsporum* en 1843, este médico también caracterizó diversos dermatofitos.^{1,2}

En 1845 Hendrik Malmsten, un investigador sueco, describió por primera vez al género *Trichophyton*. Finalmente, el género *Epidermophyton* fue descrito por un médico francés llamado Raymond Sabouraud en 1910.^{1,2}

Sabouraud fue un eminente micólogo y fue el primero en realizar un estudio sistemático de las dermatofitosis y propuso que había más de una especie involucrada en estas infecciones Sabouraud publicó diversos trabajos en los cuales clasificó a los dermatofitos en cuatro géneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Achorion* y *Microsporum*¹. En 1927 Ajello y Nannizzi descubrieron el estado teleomorfo de *Microsporum gypseum*.^{1,2}

Langeron y Milochevitch en 1930 reordenaron nuevamente el grupo de los dermatofitos y junto con otros científicos eliminaron al género *Achorion* de este grupo. En sus trabajos reconocieron que la adición de vitaminas y el uso de medios hechos a base de alimentos, era importante para favorecer el crecimiento y la capacidad de esporulación de los dermatofitos.² En 1934, un micólogo norteamericano llamado Chester W. Emmons estableció las normas de la nomenclatura taxonómica de estos hongos queratinofílicos y agrupó a estos tres géneros dentro del grupo de los dermatofitos, denominación con la cual se continúa nombrando a estos microorganismos.^{2,3}

De acuerdo a Pascoe el primer reporte de dermatofitosis en caballos fue realizado por Seedon en 1943 durante la segunda guerra mundial.⁴

1.2 Dermatofitos

Las dermatofitosis son ocasionadas por un grupo de hongos filamentosos queratinofílicos llamados dermatofitos, integrado anteriormente por los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, y *Epidermophyton*.^{3,5} En estudios moleculares recientes, realizados por Sybren de Hoog y colaboradores, se ha propuesto una nueva clasificación para este grupo, que incluyen a siete géneros que son *Arthroderma*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia*, *Lophophyton*, *Paraphyton* y *Epidermophyton*. Con esta nueva propuesta de clasificación taxonómica, tanto el género *Arthroderma* y *Nannizzia* dejaron de ser nombres utilizados para denominar a las fases perfectas de *Trichophyton*, *Microsporum* y *Chrysosporium*.⁶ Actualmente tanto la fase anamorfa como la teleomorfa reciben el mismo nombre, siguiendo la norma propuesta por la *Internacional Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants* (ICN), durante su reunión en 2011 en Melbourne, Australia, en la cual se plantea: "un solo hongo, un solo nombre".^{7,8}

Los géneros *Microsporum*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Lophophyton* y *Trichophyton* son patógenas para los animales y el hombre, mientras que el género *Epidermophyton* afecta principalmente a los humanos.⁶

En 1960, Georg L. K. clasificó a los dermatofitos con base al sustrato, nicho ecológico y su especificidad de hospedador de la siguiente forma:

- ❖ Antropofílicos. Afectan al humano y es rara su transmisión a los animales.
- ❖ Zoofílicos. Afectan a animales, pero pueden ser transmitidos al hombre.
- ❖ Geofílicos. Se encuentran en el suelo y se asocian a la descomposición de material orgánico que contenga queratina y pueden llegar a afectar a los animales y al hombre.⁹

La clasificación taxonómica de los dermatofitos es:

Dominio: Eukarya

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Euascomycetes

Orden: Onygenales

Familia: Arthrodermataceae

Género: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*.¹⁰

Los dermatofitos tienen hifas septadas, a las que en conjunto se les llama micelio. Su reproducción es a través de los conidios que se localizan en el micelio aéreo, existen dos tipos: los macroconidios y los microconidios; estas estructuras son empleadas para su identificación.^{11,12}

1.2.1 Género *Trichophyton*

Los hongos de este género se encuentran como saprobios, en humanos y animales. Anteriormente estaban reconocidas 22 especies clasificadas de acuerdo a su morfología.⁹ Actualmente y utilizando los estudios moleculares, se propone una reclasificación de las especies quedando únicamente 16 especies de las cuales 4 son aisladas frecuentemente en animales estas son *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton verrucosum* y *Trichophyton erinacei*.⁶

El crecimiento de las colonias de *Trichophyton* va de 7 a 14 días. La descripción macroscópica se hace en Sabouraud dextrosa agar, la textura de la colonia es algodonosa, la

superficie es de color blanco, beige o amarillento al reverso el color va de color crema, marrón, rojo o violeta al reverso, esta coloración va a depender de la especie.^{6,14,15}

Con la técnica de microcultivo, su morfología microscópica muestra hifas delgadas hialinas, con microconidios y macroconidios tálidas presentes al final de la hifa o a los lados. Los macroconidios son escasos o ausentes, presentan una pared delgada con múltiples septos y tienen una forma cilíndrica o de cigarro, mientras que los microconidios son abundantes y tienen una forma similar a una pera o redondas.^{6,12,15}

Algunas especies de este género requieren que el medio de cultivo esté adicionado con vitaminas como vitamina B3, tiamina e inositol para su desarrollo.

Trichophyton equinum: es el principal causante de dermatofitosis en los equinos, aunque ocasionalmente infecta a los humanos y mustélidos.^{16,17} Existen dos variedades: *Trichophyton equinum* var. *equinum* y *Trichophyton equinum* var. *autotrophicum*. La primera es de distribución mundial, mientras que la otra sólo ha sido reportada en Australia, Nueva Zelanda y existe un reporte en Egipto.^{18,19} Crece a temperaturas de 30 a 37 °C y requiere que el medio de cultivo sea adicionado con ácido nicotínico (vitamina B3).^{13,17} Bajo estas condiciones su crecimiento es moderadamente rápido. Macroscópicamente la colonia presenta una textura esponjosa y un color que va de blanco a crema con forme envejece la colonia, cuando la colonia es joven tiene una superficie plana y conforme pasa el tiempo, se observa de manera irregular y plegada en la superficie. Al reverso de la colonia muestra un color amarillo que dependiendo de la edad va cambiando gradualmente a un color rojo a marrón.^{14,15} Microscópicamente se observan microconidios de forma piriforme a lo largo de la hifa, rara vez se encuentran en forma de racimos. Es infrecuente encontrar macroconidios, las cuales tienen una forma fusiforme o de “maza”, similares a los de *T. mentagrophytes*.^{17,19} (Figura 1 y 2)

Morfológicamente ambas variedades son similares, la única diferencia que existe entre ellas es el requerimiento de ácido nicotínico en el medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud (ADS). En la prueba de perforación de pelo *in vitro* ambas tienen un resultado negativo.¹⁹

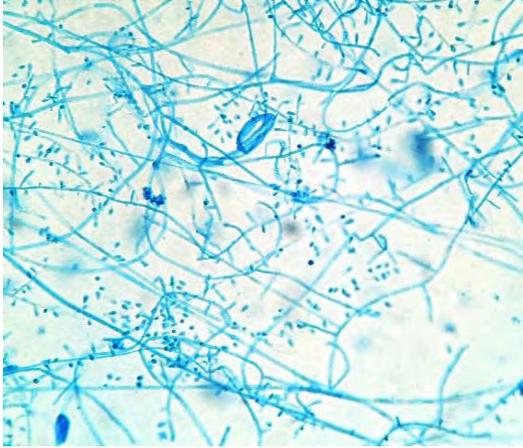


Figura 1. Microconidios de *Trichophyton equinum* de un microcultivo de 15 días, teñido con lactofenol azul de algodón.

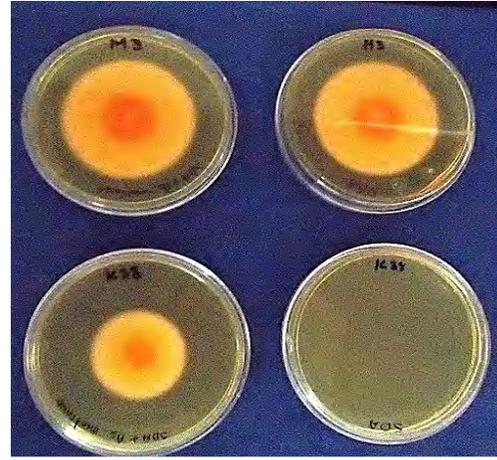


Figura 2. Cultivos de *Trichophyton equinum* mostrando ambas variedades, arriba está el *Trichophyton equinum* var. *autotrophicum* se observa su crecimiento con y sin la presencia del ácido nicotínico en el medio y abajo *T. equinum* var. *equinum* se observa que solo hay crecimiento en el medio que tiene ácido nicotínico.

Trichophyton mentagrophytes: es un dermatofito aislado comúnmente en roedores y conejos, también causa infecciones en perros, gatos, caballos y humanos. Su distribución es cosmopolita.^{13,15,17}

Su crecimiento es rápido, en el medio ADS las colonias son generalmente planas de color blanco a crema, con una superficie granular y con un aspecto terso. Al reverso de la colonia se observa una pigmentación color marrón a un marrón rojizo.¹⁷

En su morfología microscópica se observan hifas en espiral, los microconidios son abundantes y presentan una forma piriforme, se encuentran en forma de racimos a lo largo de la hifa.^{13,17} Los macroconidios son multiseptados, en forma de mazo, con una pared delgada y lisa.¹⁷ (Figura 3 y 4)

No requiere de ningún nutriente adicional en el medio y la prueba de perforación de pelo *in vitro* da un resultado positivo.^{13,17}

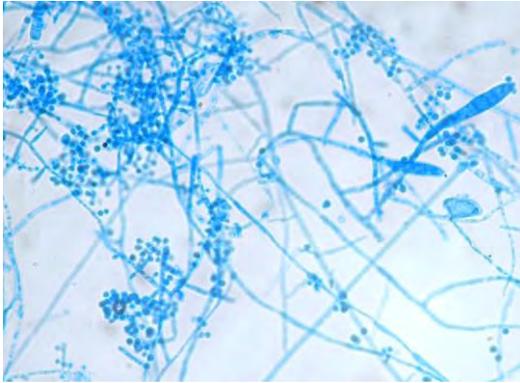


Figura 3. Microconidios y macronidio de *Trichophyton mentagrophytes* de un microcultivo de 15 días, teñido con LAA.

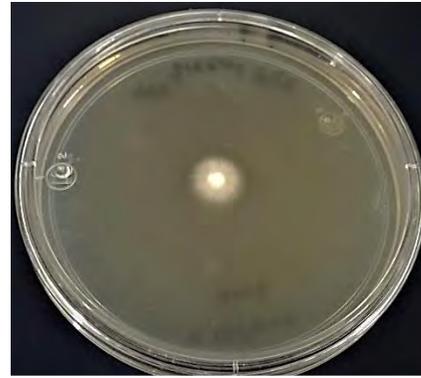


Figura 4. Cultivo de *Trichophyton mentagrophytes* en SDA. Cultivo de 5 días

Trichophyton verrucosum: la colonia es de crecimiento lento y requiere la adición de tiamina (Vitamina B1) e inositol en el medio para poder desarrollarse, este es ligeramente más rápido a una temperatura de 37°C que a 29°C, su textura es irregular y rugosa, algunas veces ligeramente aterciopelada, presenta un color blanco también amarillo o amarillo verdoso en la superficie, al reverso de la caja no presenta ninguna coloración.^{13,17}

Los microconidios pueden estar ausentes, las macroconidias en forma de “cola de rata” se presentan muy rara vez, las clamidoconidias en forma de cadena son la estructura más abundante.¹³

1.2.2 Género *Microsporum*

Este género contaba con 17 especies de las cuales 7 eran aisladas de animales. Actualmente se plantea una reclasificación en nuevos géneros para varias especies que forman parte de este género, por lo que *Microsporum* tiene tres especies y solo *Microsporum canis* afecta a los animales.^{6,20}

Las colonias crecidas en ADS presentan una textura algodonosa, una coloración blanquecina a amarillenta y al reverso suelen tener un color pardo o amarillento.⁶

La morfología microscópica muestra hifas delgadas y hialinas, los macroconidios están presentes como forma conidial predominante, son de pared gruesa y rugosa, multicelulares y

fusiformes, formándose al final o a los lados las hifas, mientras que los microconidios son escasos y de forma cilíndrica.²⁰

Las especies de *Microsporum* infectan habitualmente la piel y el pelo, rara vez otro tipo de tejido queratinizado.²¹

Microsporum canis es un dermatofito de distribución cosmopolita, se aísla frecuentemente de gatos y perros, aunque también es causante de tiña en los humanos debido a la cercanía que tienen con los animales de compañía, aunque en los gatos no existan signos clínicos de la infección.²¹

Su crecimiento es rápido, la colonia es plana y su textura es esponjosa o lanosa; tiene un pigmento de color blanco a amarillo, al reverso de la colonia se aprecia una coloración que va de un amarillo limón a un amarillo anaranjado, algunas veces esta pigmentación es pálida.^{21,22}

Los macroconidios son en forma de huso, tienen una pared gruesa, con frecuencia presentan un botón terminal, contienen de 5 a 15 septos que miden 35-110 x 12-25 μm .¹³ No requiere de nutrientes especiales para su crecimiento y en la prueba de perforación de pelo *in vitro* es positiva.¹⁴ (Figura 5 y 6)



Figura 5. Macroconidias de *Microsporum canis* de un microcultivo de 10 días, teñido con LAA. (40x)



Figura 6. Cultivo de *Microsporum canis* sembrado en SDA. Cultivo de 14 días

Microsporium canis var. equinum: es uno de los hongos causantes de las dermatofitosis en equinos, aunque también llega a afectar al hombre.²⁰

Presenta un crecimiento promedio de 5 días, la colonia es aplanada y plegada, presenta una textura similar a la “gamuza”, la coloración va de un tono beige pálido a un tono salmón pálido.^{13,20}

En su morfología microscópica los macroconidios son pequeños en comparación a los que produce *M. canis*, tienen forma de huso y son de pared gruesa y áspera con pocos septos miden de 18-60 x 5-15 μm .¹³ En la prueba de perforación de pelo *in vitro* es negativo.²⁰

1.2.3 Género *Nannizzia*

Con la nueva clasificación propuesta en 2016, en este género se incluyen algunas especies que antes pertenecían al género *Microsporium*, cuenta con 9 especies de las cuales 2 son aisladas de animales: *Nannizzia nana* (antes *Microsporium nanum*) y *Nannizzia gypsea* (antes *Microsporium gypseum*).^{6,13,23}

Nannizzia gypsea es un dermatofito geofílico de distribución cosmopolita, que afecta una amplia variedad de animales y ocasionalmente al hombre.^{6,23} Tiene un crecimiento rápido, la colonia es plana, con una textura similar al “ante”; presenta un pigmento color beige y al reverso de la caja se puede apreciar una coloración que va de beige a marrón.^{13,23}

En la observación microscópica se aprecian macroconidios como forma conidial predominante, estos son de pared rugosa, multicelular y fusiforme, presentan de 3 a 6 septos y se forman en la parte lateral de las hifas. Los microconidios son de pared delgada y lisa, su forma es ovoide.¹⁸ No requiere de nutrientes especiales para su crecimiento y en la prueba de cuerpo perforante es positivo.²³



Figura 7. Macroconidios de *Nannizzia gypsea* de un microcultivo de 10 días, teñido con LAA (40x).

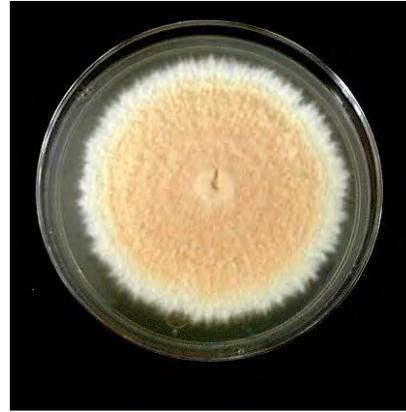


Figura 8. Cultivo de *Nannizzia gypsea* sembrado en SDA. Cultivo de 10 días.

Nannizzia nana forma colonias planas, de color crema, con una textura similar a la “gamuza” o polvo. Las colonias jóvenes tienen un pigmento anaranjado pardo que se vuelve más oscuro con los días. Producen numerosos y pequeños macroconidios ovoides a piriformes con uno a tres (principalmente dos) septos, la pared es relativamente delgada, finamente equinulada (rugosa) y bases truncadas y anchas. Los macroconidios nacen en los conidióforos que no se tiñen fácilmente. Los microconidios son en forma de lágrima y están presentes de forma escasa.²³

1.2.4 Género *Paraphyton* y *Lophophyton*.

Paraphyton cookei (*Microsporum cookei*) la colonia es granular, presenta un color marrón intenso o claro, las hifas son hialinas, de pared lisa, ocasionalmente pueden llegar a observarse formas en espiral. Los macroconidios y los microconidios son tálicas. Los macroconidios son multiseptados, son de pared rugosa y delgada con forma de bastón o semejantes a un cigarro; los microconidios son pequeños de pared lisa.^{6,24}

En la prueba de perforación de pelo *in vitro* da un resultado positivo, para realizar la identificación molecular se recomienda el uso de la región ITS.

Se ha reportado que causa infecciones en roedores, perros y raramente humanos.

Lophophyton gallinae (*Microsporum gallinae*) la colonia tiene una textura granular o aterciopelada presenta un color marrón a rojizo, los macroconidios están sueltos o agrupados,

largos, la pared es delgada y rugosa, multiseptado, los microconidios están presentes y tienen una forma ovoidal o piriforme.^{6,25}

En la prueba de perforación de pelo *in vitro* es positiva y tiene presente una invasión ectotrix, para realizar su identificación molecular se recomienda el uso de la región ITS.

Afecta principalmente a aves de corral y otras gallináceas silvestres, raramente causa infección en el humano u otros mamíferos.

Ninguna especie de *Paraphyton* y *Lophophyton* ha sido reportada como agente causante de la dermatofitosis equina.

1.3 Dermatofitosis equina

Los trastornos dermatológicos representan una fuente de sufrimiento para el individuo debido a que ocasionan molestias y aumentan la susceptibilidad para otras enfermedades; además, comprometen el bienestar y el porte físico del animal, por lo que este tipo de problemas pueden interferir con su capacidad funcional.^{26,27,28,29}

En la práctica médica veterinaria después de los caninos y felinos, los équidos son los animales domésticos que reciben usualmente atención a causa de algún padecimiento en el tegumento. En general, la naturaleza y la frecuencia de las dermatosis equinas es similar en el mundo.^{27,30}

Las dermatofitosis son frecuentes en los equinos junto con otros desordenes como la foliculitis bacteriana, hipersensibilidad a las mordeduras de insectos, dermatofilia, reacciones alérgicas, granulomas eosinofílicos, atopia, vasculitis, sarna coriódica y sarcoide equino.^{26,27}

La dermatitis micótica o dermatomicosis es una de los principales problemas en la piel de los animales domésticos causada por hongos levaduriformes y filamentosos.³¹

La infección se produce por el contacto de un individuo portador hacia uno susceptible, del suelo a estos o a partir de fomites contaminados. Por lo tanto, la transmisión puede ser por contacto directo e indirecto.^{3,4}

La infección comienza con el depósito de arthroconidias en el tejido queratinizado al cual se adhieren gracias a las glicoproteínas de mananos, una vez implantadas, germinan y secretan diversos metabolitos tales como las queratinasas, caseinasas y elastasas, además de algunos moduladores del sistema inmune que favorecen el desarrollo y la penetración de las hifas dentro del estrato córneo, las cuales crecen y se ramifican radialmente en múltiples direcciones. Las hifas invaden los folículos pilosos durante este evento, el hongo produce enzimas hidrolíticas que le permiten la penetración en la cutícula del pelo.^{3,30,31} (Figura 9)

Estos eventos dan como resultado una respuesta fisiológica que se manifiesta con una hipertrofia del estrato córneo, con una acelerada queratinización y exfoliación; como consecuencia se generan áreas pseudoalopécicas, eritematosas y con descamación.^{27,31}

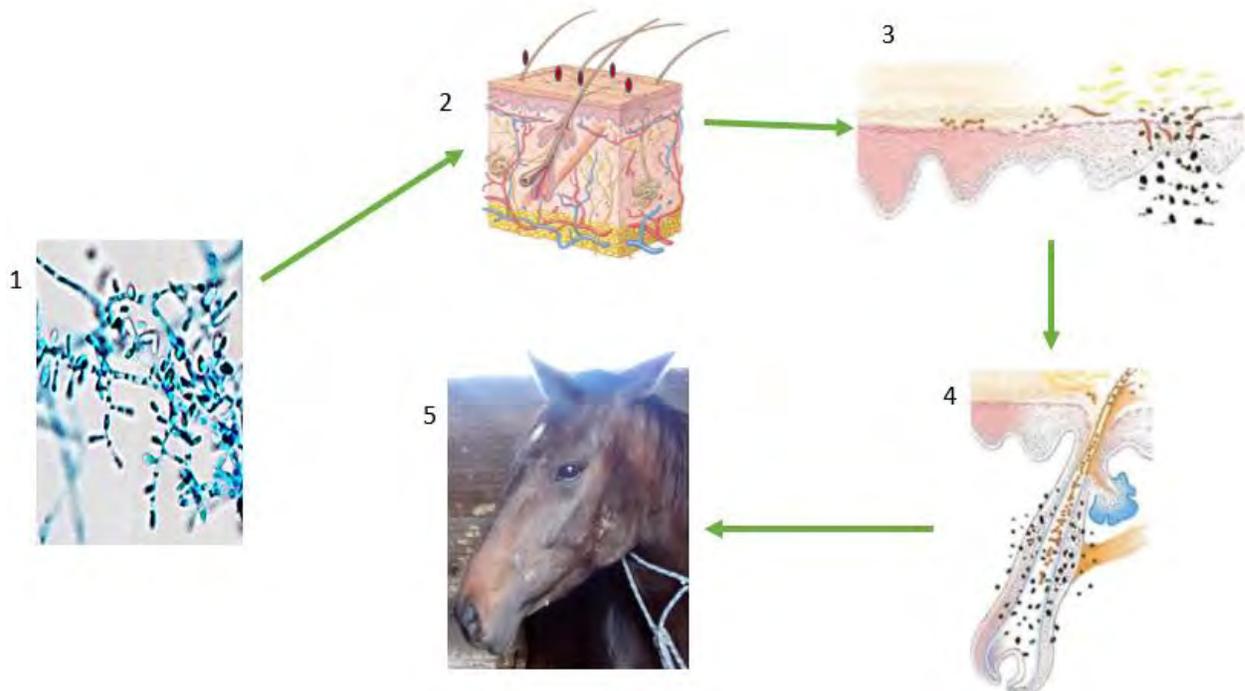


Figura 9. Patogenia de los dermatofitos. 1) Microconidios e hifas de dermatofito 2) Depósito de arthroconidias en el estrato córneo 3) invasión del tejido queratinizado 4) migración hacia el pelo y daño 5) Apariencia de las lesiones en el individuo.

La dermatofitosis afecta a équidos sin distinción de edad, raza o género.²⁷ Esta infección no pone en riesgo la vida del individuo; sin embargo, además de afectar el aspecto físico del animal, se trata de una enfermedad zoonótica lo que resulta ser un problema de la salud

pública.³² Igual que los perros y gatos, los équido son considerados como animales de compañía, además de poseer otros fines zootécnicos como deportivos, tracción y transporte, producción de carne, reproducción y entretenimiento.³³ Por lo tanto, las alteraciones en su apariencia física deriva en diversos problemas.

Las lesiones causadas por los dermatofitos son superficiales, en los équidos suelen aparecer primero en la zona axilar y pueden extenderse hacia el tronco, cuello, cabeza y extremidades. La infección se manifiesta con pseudoalopecia seguida del desarrollo de costras gruesas, descamación, las lesiones presentan una forma anular, éstas pueden llegar a unirse provocando que la apariencia de una lesión de forma irregular. Las enzimas secretadas por el hongo causan irritación y prurito.³⁰



Figura 10 Lesiones en un equino (A59) de forma anular, con descamación y pseudoalopecia causadas por *Trichophyton equinum* y *Nannizzia gypsea*.



Figura 11. Equino (A59) después de recibir tratamiento, ya no se observan lesiones y creció nuevamente el pelo.

Las especies de dermatofitos comúnmente aisladas en los équidos son: *Trichophyton equinum* var. *autotrophicum*, *Trichophyton equinum* var. *equinum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Microsporum canis*, *Nannizzia gypsea* (antes *Microsporum gypseum*) *Microsporum canis* var. *equinum*.^{28,33,34}

1.4 Diagnóstico

Las dermatofitosis tienden a presentar cuadros clínicos variables, por lo que se llegan a confundir con otras enfermedades; sin embargo, la historia clínica es una herramienta importante ya que ayuda a orientar el diagnóstico.¹⁴

Los diagnósticos diferenciales en los équidos son dermatofitosis, foliculitis bacteriana, ectoparásitos, reacción alérgica a la mordedura de insectos y sarcoidosis.^{3,33,14}

Uno de los métodos que ayudan a orientar el diagnóstico, es el empleo de la lámpara de Wood, la cual emite una luz ultravioleta. Al exponer el tejido invadido por conidios, a esta luz se produce una fluorescencia de color amarillo verdosa. Sin embargo, debe de considerarse que este fenómeno solo se presenta con *Microsporum canis* y sus variedades; y que las principales especies aisladas en equinos son *Trichophyton equinum* y *T. verrucosum*. No obstante, también se ha llegado a aislar a *M. canis* var. *equinum* de algunos casos. El uso de la lámpara de Wood rara vez es de utilidad en la clínica equina, ya que para su uso es necesario estar en un lugar totalmente oscuro, lo cual es un inconveniente debido a la talla de esta especie y su comportamiento.^{13,15,33}

Para tener un diagnóstico preciso se debe realizar el aislamiento del miceto que se encuentra afectando al animal; esto se logra mediante el cultivo y la caracterización microscópica. Sin embargo, el principal inconveniente de este procedimiento es el tiempo que tardan en crecer los dermatofitos. Además, se debe de tomar en cuenta la presencia de hongos ambientales en la muestra, que también se van a desarrollar en el medio de cultivo a una mayor velocidad que los dermatofitos, por lo que resulta un verdadero reto obtener colonias puras de dermatofitos y realizar la identificación.¹⁴

Para realizar el cultivo micológico es necesario obtener una muestra del tejido queratinizado infectado, por lo que esta se debe tomar de la lesión y su periferia, mediante un raspado o un

depilado de la zona para tomar los conidios del dermatofito. Es necesario realizar una breve limpieza del área afectada para poder disminuir la carga de los contaminantes ambientales.^{11,35}

1.5 Tratamiento

En la actualidad existe una amplia variedad de antifúngicos para el tratamiento de las dermatofitosis. La terapia puede ser tópica, sistémica o una combinación de ambas, dependiendo de la localización, extensión y severidad de las lesiones.^{11,36}

Algunos de los tratamientos implementados para las lesiones localizadas son la aplicación de yodo povidona al 5%, hipoclorito de sodio 5%, tolnaftato, naftenato de cobre, Captan 50%, azufre, pomadas preparadas con lanolina y ácido salicílico al 10%, entre otros. Estos intervienen en la oxidación o desnaturalización de las proteínas por lo que se ven alteradas las funciones del hongo; sin embargo, algunos de estos tratamientos no suelen ser efectivos y resultan ser bastante agresivos para la piel del animal.^{11,35}

Otro tipo de tratamientos que existe para las dermatofitosis de los équidos incluyen los siguientes medicamentos.

Los azoles inhiben la actividad de la enzima 14- α -desmetilasa bloqueando la desmetilación de lanosterol a ergosterol, componente principal de la membrana celular de los hongos. Como consecuencia de ello, se altera la permeabilidad celular y se acumulan compuestos no desmetilados que inhiben el crecimiento fúngico.³⁷

Dentro de este grupo los más utilizados en los equinos son: miconazol, ketoconazol, itraconazol, fluconazol y el enilconazol. Este último es más utilizado en la industria agrícola, también en tratamientos tópicos y para la desinfección de objetos inanimados.³⁵ La mayoría de estos medicamentos tienen diversas presentaciones y comúnmente son cremas o lociones por lo que su aplicación debe ser cada doce horas por 6 semanas.³⁷

En las alilamidas su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la actividad de la enzima escualeno-epoxidasa, impidiendo la síntesis del lanosterol. Por tanto, la vía enzimática es bloqueada en un paso anterior al inhibido por los azoles. Dando como

resultado, la acumulación del escualeno en la célula fúngica provocando la muerte del hongo.³⁸ Los principales representantes de esta clase de antifúngicos comúnmente utilizados son la terbinafina y la naftatina.¹¹ La presentación de estos medicamentos es en ungüentos y aerosoles a una concentración del 1% y su aplicación debe ser al igual que los azoles cada doce horas por 6 semanas.¹¹

Otro medicamento utilizado es la natamicina; su aplicación es local y se utiliza en una solución al 0.01% cada 4 días por 4 a 6 semanas. Después del tratamiento no se debe exponer al animal a la luz del sol.³⁷

El uso de antimicóticos sistémicos sólo se recomienda en caso de micosis persistentes, debido a que estos fármacos tienen un gran número de efectos secundarios en el paciente, por lo cual no es recomendable su uso frecuente. El medicamento de elección para tratar las dermatofitosis es la griseofulvina. Su acción consiste en interrumpir la metafase de la división celular, los efectos que se pueden presentar son náuseas, diarrea, dolor de cabeza, fotosensibilidad, hepatotoxicidad y rara vez daño neurológico. Otro medicamento utilizado es el itraconazol; los efectos en los humanos y también reportados en los caninos y felinos son hipertensión, hipocalcemia, edema, dolor de cabeza y hepatotoxicidad. Los efectos secundarios no han sido estudiados en los equinos.^{35,38}

1.6 Prevención

No hay medidas de prevención específicas para las dermatofitosis en medicina veterinaria. Las medidas inespecíficas de prevención que se utilizan son la descontaminación del entorno, ya que los artroconidios pueden mantenerse viables en el ambiente durante varios meses.³² El uso de hipoclorito de sodio al 0.5% y monoperoxisulfato de potasio al 0.5% usado 2 veces por semana ha sido eficaz en la desinfección de caballerizas, paredes, baldes u otros utensilios; mientras que el uso de enilconazol aplicado con intervalos de 10 días se ha utilizado para desinfectar los utensilios utilizados en el aseo corporal de los individuos.^{11,27} Además de la adecuada eliminación del material que se utiliza como cama (aserrín, arena, etc.), así como evitar el intercambio de utensilios de higiene corporal entre los caballos, los cuales deben ser descontaminados después de su uso.³³ Las mantas deben ser lavadas, desinfectadas y secadas. Finalmente, los animales sospechosos deben ser aislados para evitar

el contacto con individuos sanos; se debe hacer la confirmación de la infección mediante una prueba de laboratorio, de resultar positivo se implementará el tratamiento adecuado.^{11,35}

La vacunación ha demostrado que proporciona un grado razonable de protección. Se considera que la protección es adecuada siempre y cuando la vacuna sea específica para el miceto que causa la infección. Actualmente solo se cuenta con una vacuna para *Trichophyton verrucosum* la cual es utilizada principalmente en el ganado vacuno, también se ha aplicado en los equinos con una buena respuesta de parte de estos; sin embargo, solo se encuentran comercialmente disponibles en algunos países de Europa y en Cuba.^{39,40,41}

También existen investigaciones sobre la utilización de una vacuna para *Microsporium canis* para su uso en perros y gatos sin embargo hasta el momento no ha resultado efectiva, por lo que sigue en fase experimental.⁴²

1.7 Antecedentes del diagnóstico molecular de las dermatofitosis

Otro método de detección e identificación de dermatofitos es a través de procedimientos moleculares principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este procedimiento ha sido aplicado para el diagnóstico de dermatofitosis en medicina humana y se tienen pocos estudios sobre su utilidad dentro de la medicina veterinaria.

La aplicación de la biología molecular en la micología médica principalmente los dermatofitos han tenido un avance lento a diferencia de otros grupos de la microbiología.^{43,44,45} Sin embargo, se están observando cambios considerables en el estudio de los dermatofitos. El uso de herramientas moleculares para el diagnóstico de las dermatofitosis es escaso, sin embargo el desarrollo de diversas pruebas ha sido de gran utilidad debido a que para realizar el diagnóstico convencional es necesario contar con personal entrenado para realizar una adecuada identificación, además que el crecimiento de los dermatofitos es lento en el medio de cultivo, lo cual hace que los resultados se entreguen en un lapso de 15 días, por lo que el implemento de un diagnóstico molecular disminuye el tiempo de entrega de los resultados^{36,46}

En medicina humana la utilización de métodos moleculares para el diagnóstico de estas enfermedades es poco utilizada debido a que la mayoría de las infecciones superficiales

causadas por hongos son diagnosticadas solo observando los signos clínicos, sin realizar los estudios pertinentes para su diagnóstico definitivo.⁴⁷

La principal técnica utilizada en biología molecular es el uso de la Reacción en Cadena de la polimerasa PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction)

El fundamento de dicha técnica se basa en sintetizar varias veces un fragmento específico de ADN utilizando una enzima polimerasa que trabaja a temperaturas elevadas, y que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, de ahí su nombre comercial: taq polimerasa.

Una reacción de PCR simula lo que sucede en una célula cuando sintetiza el ADN. En un tubo se mezclan los reactivos necesarios para llevar a cabo este proceso, como un ADN polimerasa, un ADN del organismo que se va a utilizar como molde, oligonucleótidos que marcan el inicio de la síntesis de una nueva cadena de ADN (conocidos también como primers, iniciadores, cebadores, etc.), dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones adecuadas para que la enzima trabaje (pH neutro, cloruro de magnesio y cloruro de potasio). La PCR es una herramienta muy utilizada en la biología molecular ya que sus aplicaciones son variadas (genética de poblaciones, evolución molecular, genómica, medicina forense, diagnóstico, etc.).^{48,49}

La reacción PCR se lleva a cabo mediante ciclos y cada uno consta de tres fases, la primera llamada desnaturalización se realiza a una temperatura aproximada de 95°C, durante la cual la doble cadena del ADN se abren quedando en forma de cadenas sencillas; después sigue el alineamiento que se lleva a cabo a una temperatura con un intervalo entre 40° y 60°C, en esta fase se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, y aquellas uniones más estables durarán mayor tiempo, dejando a los oligonucleótidos “alineados” en su región blanco por lo que se forma una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este fragmento de ADN de doble cadena y cuando las condiciones sean las adecuadas comenzará a agregar bases en sentido 5’ a 3’, los puentes de hidrógeno que se forman con las bases adicionadas estabilizan la unión de la ADN polimerasa, permitiendo una polimerización eficiente de bases. Este proceso se llevará a cabo en el paso de la extensión en la que la temperatura sube a 72°C, la cual es la temperatura en la cual el ADN polimerasa alcanza su máxima actividad, y realiza la síntesis de los

fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado. Generalmente estos ciclos se repiten de 30 a 35 veces por PCR.⁴⁸ (Figura 12)

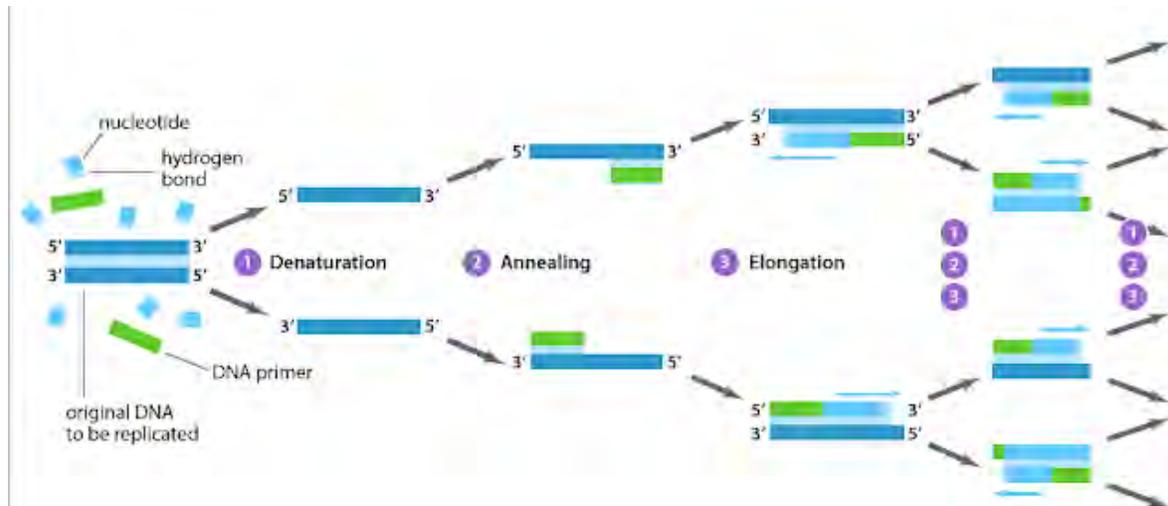


Figura 12. Descripción de una reacción de PCR, tomada de <http://biology4alevel.blogspot.mx/2016/07/157-pcr-and-gel-electrophoresis.html>

Han surgido numerosas modificaciones con el propósito de mejorar el rendimiento o la especificidad de la PCR, además de adaptarse a muestras particulares, como ARN monocatenario. Algunas de las variantes de la PCR que se utilizan con mayor frecuencia es la PCR en tiempo real (qRT-PCR), PCR multiplex (mPCR) y RT-PCR (amplificación de ADN a partir de ARN).⁴⁹

La qPCR es capaz de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre. Los datos son colectados a lo largo del proceso y no al final como en una PCR normal. La metodología de la qRT-PCR se basa en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN blanco. Antes se revisaba la cantidad de amplificaciones producidas después de un número fijo de ciclos, las pruebas de qRT-PCR determinan el punto en el tiempo durante el proceso de ciclado cuando se detecta por primera vez la amplificación de un producto de PCR. Se trata de una herramienta bastante útil, sin embargo, aún se trata de un método costoso.^{48,49}

La RT-PCR o PCR con transcriptasa inversa indica que se trata de una amplificación de ARN a través de la previa síntesis de su ADN complementario (cADN), cual se amplificará por una PCR, por lo que no se obtienen amplificadores del ARN sino de ADN.⁴⁹

La denominada PCR multiplex, se trata de una reacción que consigue amplificar simultáneamente, es decir en una única reacción, diferentes secuencias blanco. Se han desarrollado diversos protocolos prometedores mediante la utilización de qRT-PCR de forma que se puede evaluar la cinética de reacción, con esta variedad de la prueba. Sin embargo, se trata de una prueba que requiere mucho trabajo ya que lo que se espera es obtener un producto de amplificación en el cual no se vean afectados la sensibilidad, especificidad y el rendimiento de los reactivos utilizados.⁴⁹

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología. Además, se utilizan para localizar y aislar genes de interés. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos. Por lo que son utilizados conjuntamente con la PCR para poder realizar determinados estudios.⁴⁸

Los polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs) son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN y se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases a lo largo del genoma. El polimorfismo se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido ya sea por inserción o eliminación de los fragmentos en determinados sitios del genoma.^{48,49}

Los microsatélites son secuencias de ADN formadas por 1 a 4 pares de bases, Estos se localizan tanto en regiones codificantes como no codificantes del ADN. Los microsatélites de ADN nuclear se han utilizados principalmente en estudios de variación genética intra e interespecífica. Una de las ventajas que tienen es que son específicos para ciertos grupos de especies lo que permite hacer comparaciones entre especies y géneros de un mismo grupo.^{48,49}

El análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), es un método que muestra diferencias específicas en moléculas de ADN que fueron reconocidas

por enzimas de restricción específicas llamadas endonucleasas. Cada endonucleasa reconoce y corta una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre y cuando éstas no estén metiladas. Los RFLPs se producen por nuevos arreglos del ADN (pérdidas, inserciones o sustituciones de nucleótidos), lo que origina una ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico, observados mediante electroforesis, para poder observar dicho acontecimiento es necesario realizar una digestión al producto de PCR que se obtuvo previamente.^{48,49}

Estudios recientes realizados en micología han utilizado diversas técnicas de PCR para poder discriminar entre las especies de dermatofitos.^{50,51,52}

En algunos trabajos utilizaron el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP por sus siglas en inglés) para amplificar el gen Topoisomerasa II, técnica utilizada por Kanabe y colaboradores, consta de una PCR punto final con un set de oligonucleótidos denominados dPsD1, después se llevó a cabo una PCR anidada la cual utilizó los oligonucleótidos dPsD2, PsT y PsME los cuales amplificaban al gen de la topoisomerasa II. Los amplificados obtenidos de los oligonucleótidos PsT y PsME los cuales fueron capaces de hacer una identificación precisa hasta el nivel de especie, el amplificado del oligonucleótido dPsD2 presentó un tamaño de 2380bp dicho producto fue purificado y se realizó la digestión con 4 enzimas de restricción (*Hinc* II, *Hinf* I, *Afl* II or *Pfl*M I).

En este estudio se utilizaron dos técnicas moleculares que fueron: PCR anidada y PCR-RFLP. El objetivo fue utilizar el gen ADN topoisomerasa II como un método más específico y sensible para diferenciar al género y especie de un dermatofito de una forma simple y rápida; sin embargo, se concluyó que ambas técnicas son igual de efectivas para realizar la caracterización de los dermatofitos hasta el nivel de especie.⁵¹

Otro método descrito por Shehata y colaboradores menciona el uso de microsatélites, el cual consiste en contar el número de veces que se repite una secuencia simple, en el caso de los dermatofitos la secuencia que se utiliza es GACA₄, además también se comparó con una PCR la cual utiliza los oligonucleótidos ITS1 e ITS4; después de la amplificación se hizo una

digestión con la enzima MvaI. De acuerdo a los resultados obtenidos de este método es más confiable pues se llega a caracterizar las diferentes especies del género *Trichophyton*.⁵²

En los artículos referidos primero realizaron la caracterización del dermatofito a través de métodos convencionales, para después confrontar dicho procedimiento con el método molecular. Además de comparar algunas técnicas moleculares, hasta el momento los resultados han sido favorables hacia los métodos moleculares, dichos estudios han sido realizados para las especies de dermatofitos que afectan al hombre. También existen otros métodos reportados como el uso de PCR en tiempo real y el uso del MALDI-TOF para su caracterización molecular.

Pocos han sido los estudios realizados sobre la dermatofitosis en animales, ya que se trata de una enfermedad a la cual se ha restado importancia. Los principales estudios se han enfocado a animales de compañía, principalmente perros y gatos.

Cafarchia y colaboradores implementaron una prueba molecular para el diagnóstico de dermatofitosis en caninos y felinos, la cual utiliza una PCR punto final y una PCR anidada, la caracterización de los aislados se realizó mediante el método convencional y el molecular. Para la PCR punto final utilizaron las regiones ITS1 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal, así como el gen Chs-1, estas regiones fueron amplificadas de manera individual usando oligonucleótidos específicos; después, para realizar la PCR anidada, se utilizaron únicamente las regiones ITS1 e ITS2. Las especies que ocuparon en este estudio fueron *Microsporum canis* y *Trichophyton interdigitale* (zoonótico), aunque también usaron cepas de *Microsporum gypseum*, *Trichophyton terrestre* y *Chrysosporium* spp. para comprobar la sensibilidad y especificidad de su prueba, la cual resultó positiva en un 98%. Esta investigación ha sido la única realizada para estas especies,⁵³ mientras que en medicina equina existen dos trabajos han sido realizados y reportados en equinos. Uno de ellos fue realizado por Chung y colaboradores en el año 2010, en el cual lograron estandarizar una prueba de PCR que demostraban la presencia de hongos dermatofitos, utilizado como blanco la secuencia del gen de la proteína CHS1 (Chitin synthase 1). En esta prueba una vez demostrada la presencia de un dermatofito, el género se determinaba por el uso de un PCR fingerprinting en el cual se cuantificó el número de secuencias de microsatélites GACA₄ repetidas dentro de la clonación, con esto los autores pudieron demostrar solo la presencia de

Trichophyton mentagrophytes en muestras de pelo y escamas de equino.⁵⁴ Esta misma secuencia de microsatélite fue empleada para la identificación de las especies de dermatofitos que afectan al humano; sin embargo, no fue posible diferenciar a los géneros *Trichophyton* y *Microsporum*, y menos discriminar entre las especies de *Trichophyton*.⁵⁴ El trabajo realizado por El-Yazeed y colaboradores en el 2013 también utilizaron la secuencia del gene CHS1, utilizaron oligonucleótidos específicos de este gen descrito para los dermatofitos. En este ensayo no lograron determinar ni el género ni la especie, dado que la secuencia empleada está altamente conservada entre los géneros pertenecientes a este grupo de hongos.⁴⁴ Por lo descrito anteriormente, todavía no se confirma la utilidad de las pruebas moleculares en la clínica equina y solo han quedado como evidencias experimentales; los resultados de estos dos trabajos muestran que los métodos moleculares todavía no son tan confiables como los métodos convencionales, para la identificación de género y especie. Sin embargo, desde el punto de vista diagnóstico, son igual de útiles que los métodos convencionales ya que demuestran la presencia o ausencia del microorganismo, asimismo las técnicas moleculares son más precisas pues detectan un mayor número de casos positivos, además de que se tiene el resultado en menor tiempo, lo que permite establecer rápidamente el tratamiento. La única limitante de este método diagnóstico es el costo.⁵²

2. Justificación

La dermatofitosis es una enfermedad que afecta a todo tipo de animales, además impactan el bienestar y el aspecto físico del individuo, además es una fuente de sufrimiento debido a que ocasionan molestias como la irritabilidad, prurito y favorece la susceptibilidad a desarrollar otras enfermedades. Los agentes causales son hongos queratinofílicos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Nannizzia*, los cuales afectan principalmente a los équidos.

Además como se mencionó anteriormente se trata de una parte de la micología veterinaria que ha sido poco estudiada debido a que los problemas causados por los dermatofitos no ponen en riesgo la vida de los individuos por lo que existen pocos trabajos realizados para la identificación de dichos hongos que afectan a los animales, en equinos se cuentan con 2 trabajos en los que se desarrolló una PCR punto final ambos mencionan que no había logrado tener un resultado preciso en poco tiempo por lo que en esta investigación se pretende estandarizar una prueba de PCR multiplex para el diagnóstico preciso y en poco tiempo de las dermatofitosis equina, ya que se diseñaran oligonucleótidos específicos para cada una de las 5 especies que afectan principalmente a los équidos, además esto también ayudará a realizar y conocer el estado epidemiológico de esta afección en el país, pues no se cuenta con un estudio similar.

3. Hipótesis

Se desarrollará una prueba de PCR multiplex a partir de ADN de pelo y escamas de équidos con dermatofitosis, la cual será útil para establecer el diagnóstico de aproximadamente el 80% de los casos en un menor tiempo, además de identificar al agente causal.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Desarrollar una prueba de diagnóstico basada en la PCR multiplex con la cual se podrán detectar las principales especies de dermatofitos asociadas a équidos en menor tiempo y se apoyarán las investigaciones en epidemiología de los dermatofitos en equinos.

4.1 Objetivos específicos

- Diseñar oligonucleótidos para las especies de *Trichophyton*, *Microsporum* y *Nannizzia* que afectan a los équidos.
- Estandarizar el proceso de extracción de ADN a partir de muestras de pelo y escamas de équidos.
- Estandarizar una prueba de PCR multiplex para la detección de las diferentes especies de *Trichophyton*, *Microsporum* y *Nannizzia*.
- Evaluar la prueba desarrollada con muestras de pelo y escamas de équidos para conocer su eficiencia.

5. Materiales y métodos

5.1 Muestras y aislados clínicos

Los aislamientos y las muestras de tejido queratinizado utilizadas para la realización de este trabajo fueron tomadas de un estudio previo en el cual se recolectaron 120 muestras de individuos sospechosos de dermatofitosis, a los cuales se les realizó una prueba de KOH al 20%, un cultivo en ADS adicionado con cloranfenicol, ciclohexamida y ácido nicotínico (vitamina B3), las muestras fueron obtenidas de diversas partes de la Ciudad de México y el Estado de México, como Xochimilco, Milpa Alta, Álvaro Obregón, Atizapán de Zaragoza, adquiriendo una mayor cantidad de muestras provenientes del suroriente de la Ciudad, principalmente de las alcaldías de Tlalpan (Campo Militar 1-C Heroico Colegio Militar SEDENA) e Iztapalapa (Agrupamiento a Caballo de la SSP). Las muestras se recibieron y se procesaron (KOH 20% y cultivo).

5.2 Cultivo monospórico para la extracción de ADN

Cada aislamiento con el que se trabajó se obtuvo a partir de un cultivo monospórico, para lo cual al tubo de conservación se les agregó 1mL de agua destilada estéril con 1% de tween 80, para obtener solo las conidias del microorganismo, después se colocó en un tubo de 1.5 mL y se hicieron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 las cuales se cultivaron por duplicado en agar dextrosa papa (ADP) a las cuales se les agregó 200 µL de la dilución correspondiente y se dispersó por toda la placa con la ayuda de una varilla de vidrio, se incubaron a 29 °C durante 7 días, cuando se observaba el crecimiento de una sola colonia, está fue colocada en una placa nueva para que a partir de esta se realizará el inóculo para la extracción de ADN.

El cultivo monospórico se inoculó en un matraz con 50 ml de caldo dextrosa Sabouraud, los aislamientos fueron *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Microsporum canis*, *Nannizzia gypsea*.

La cepa de *Trichophyton equinum* fue adquirida de la colección CBS- Knaw Fungal Biodiversity Center and Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences con número de identificación CBS 292.81.

Los cultivos fueron incubados en agitación orbital por 120 horas manteniéndolos en agitación a 150 revoluciones por minuto con una temperatura de 29°C; posteriormente se filtró el cultivo para obtener la biomasa utilizando un embudo y papel filtro estéril; ya separada la masa fúngica se realizaron dos lavados con 10 mL agua destilada estéril para eliminar los restos de sales que contiene el medio y finalmente se secó totalmente entre hojas de papel filtro estéril. Cuando la extracción no era realizada en ese momento se guardaba la biomasa a -20°C hasta el momento de su uso, tratando de no superar los 15 días de almacenaje para evitar afectar el material genético.

5.3 Extracción de ADN

5.3.1 A partir de cultivo

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito por el Dr. Leonel Mendoza en el 2002 con algunas modificaciones.

En un mortero estéril se depositó el micelio seco, se maceró con ayuda del nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue transferido a tubos de 1.5 mL colocando previamente 600 µL del amortiguador de lisis y se mezcló. Después se añadieron 10 µL de proteinasa K (Vivantis®) a una concentración de 200 mg/mL y nuevamente se mezcló. En seguida se incubaron los tubos en baño María a 56°C durante 60 minutos. Transcurrido este lapso se añadió 60µL de CTAB y se volvió a incubar a 56°C durante 10 minutos más; después se agregaron 500 µL de fenol: Cloroformo: Alcohol-isoamílico en proporciones respectivamente de 25:24:1 (Sigma-Aldrich®), se agitó firmemente hasta observar que la muestra se tornó en un aspecto lechoso y se centrifugó en la microcentrífuga (marca: Eppendorf®, modelo: 5417R) a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos. Se recuperó un total de 300 µL de la fase acuosa, que fue transferida a un tubo de 1.5 mL nuevo y se repitió nuevamente el paso de la extracción fenólica. A continuación, se le añadieron 0.1 volumen de solución de acetato de sodio (J.T. Baker®) 3M, más 2 volúmenes de etanol absoluto grado biología molecular (IBI Scientific®), el tubo se invirtió suavemente hasta visualizar las hebras de ADN (si esto no ocurría se dejaba la muestra incubando a -20°C durante 24 hrs) y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos para observar un precipitado en el fondo de tubo. Luego se decantó el etanol y se resuspendió la muestra con 400µL de

solución TE y 2 μL de RNAsa, se puso a incubar en baño María a 37°C durante una hora, transcurrido ese tiempo se añadió 1mL de etanol al 70%, se invirtió el tubo suavemente varias veces y se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 minutos. Nuevamente se decantó el etanol y se dejó secar el ADN a temperatura ambiente. Finalmente, el sedimento fue resuspendido en 30 μL de agua inyectable; se conservó a 4°C y luego se guardaron a -20°C.⁵⁶

La pureza e integridad del ADN obtenido se evaluó mediante electroforesis (40 amperes/50 min) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5mg/mL).⁵⁵

5.3.2 A partir de pelo y escamas

En este estudio se utilizó el método de extracción de ADN a partir de tejido queratinizado descrito por Refai M, Abo El- Yazid y El-Hariri, la muestra fue colocada en un tubo de 1.5 mL, se le adicionó 100 μL de buffer de lisis el cual contiene 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 1 M KCl, 10 mM EDTA, se incubó a 100°C por 30 minutos. Después se le agregaron 50ng de proteinasa K y se vuelve a incubar a 55°C por 16 horas enseguida se incubó a 100°C por 30 minutos. Posteriormente se le agregó 100 μL de la mezcla de fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue removido y se le adicionó la misma cantidad de isopropanol, el ADN se incubó a 80°C por 1 hora. Para purificar el ADN obtenido se hicieron dos lavados con 500 μl de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante se removió y se dejó secar el ADN a una temperatura de 37°C durante 20 minutos, luego se resuspendió en agua destilada y se conservó a -20°C hasta su uso.⁵¹

También se probó un protocolo para extraer ADN de tejido queratinizado de reptil con algunas modificaciones. Primero se fragmenta la muestra de pelo y escamas y se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se le añadió 500 μL de la solución de lisis (25mM de TrisMa pH8, 10 mM de EDTA pH8 y 2% de Sarkosyl) y 20 μL de proteinasa K a una concentración de 200mg/mL y se metió a incubar a baño María a una temperatura de 56°C durante 18 horas. Transcurrido este lapso se añadió 500 μL de fenol: Cloroformo: Alcohol-isoamílico a una proporción de 25:24:1 (Sigma-Aldrich®), se agitó hasta que se tornó en un aspecto lechoso y se centrifugó en una microcentrífuga (marca: Eppendorf®, modelo: 5417R) a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. En seguida se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le

colocaron 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 6, 2.5 µL de solución de acrilamida⁵³ y 2 volúmenes de etanol absoluto, se dejó incubar en el congelador por 20 minutos. Después se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se decantó el etanol y se dejó secar el ADN, Finalmente se resuspendió en 30µL de agua inyectable.⁵⁷

Cuantificación

El ADN obtenido fue cuantificado con el biofotómetro (marca: Eppendorf®, modelo: D-5000-3000), utilizando una dilución del ADN 1:100 en agua grado inyectable, las lecturas se llevaron a cabo a una absorbancia de 260/280 nm; si la relación es menor a 1.8 indica que el ADN extraído aún contiene proteínas.⁵⁵

5.5 Diseño de oligonucleótidos específicos para las diferentes especies de *Trichophyton*, *Microsporium* y *Nannizzia* que afectan a los équidos

Las secuencias de ADN y el ARN han sido utilizadas en la microbiología clínica para la clasificación e identificación de bacterias y hongos por varios años. El ADN ribosomal (rDNA) cuenta con una serie de genes que se encuentran en todos los microorganismos y se sabe que acumula mutaciones constantes a un ritmo lento conforme pasa el tiempo. La heterogeneidad de la secuencia de nucleótidos dentro de esta región puede ser usada para la clasificación filogenética de estos microorganismos. Los interespacios cuentan con secuencias altamente conservadas de genes del rDNA, estas regiones de secuencias variables son denominadas regiones del transcripto interno (spacer regions ITS)⁵⁹

Las secuencias homólogas dentro de los genes del rDNA de los hongos (18S, 5.8S, y 28S) y sus diferencias dentro de las regiones ITS (ITS1 e ITS2) son las bases genéticas para la organización de los hongos en grupos taxonómicos, por lo tanto, al saber un poco de los aspectos biológicos de estas regiones se considera su uso enfocado en diferenciar entre géneros y especies micóticas.^{59,60}

Las secuencias reportadas dentro de la literatura para realizar una certera identificación molecular para el género *Trichophyton* es la región ITS y la región del EF-1α (Factor de elongación 1α) mientras que para los géneros *Microsporium* y *Nannizzia* solo se utiliza la región ITS.^{17,20,23}

Por otra parte, un oligonucleótido o iniciador va a delimitar la zona de ADN que se desea amplificar, al ser reconocidos por la enzima ADN polimerasa III permite iniciar la reacción. Son secuencias cortas de aproximadamente 18 a 22 nucleótidos. Se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN.⁶⁰

Conforme a lo descrito anteriormente se diseñaron los oligonucleótidos específicos a partir de las regiones ITS1 e ITS2 entre estas regiones está la región 5.8S, para el género *Trichophyton* también se recomienda el uso del gen TEF-1 α . De acuerdo a Bolívar y colaboradores el juego ideal de oligonucleótidos que se empelan en un PCR-multiplex es de 3, ya que esto garantiza confiabilidad técnica, sin embargo, restringe la amplitud del diagnóstico.⁶¹

Se identificaron las secuencias de la región ITS en el NCBI Genbank y se alinearon con el programa Reverse Complement^{®60}. Posteriormente fueron colocadas en un archivo de block de notas para alinearlas y se reconocieron las regiones candidatas para desarrollar los oligonucleótidos.

Una vez concluido el diseño se ingresaron en el programa DNAMAN[®] para conocer la temperatura de alineación (Tm), porcentaje de C/G, si formaban o no horquillas, se aliñaban con su iniciador complementario o con los otros oligonucleótidos diseñados.

Finalmente corroboró su homología por medio de la base de datos BLAST del NCBI.

Los oligonucleótidos que se diseñaron para cada especie fueron:

Microsporium gypseum

MgypITS-373F: ATACTGTTCCGTCTGAGCG

MgypITS-373R: ATCTCTGACGGAAACTGAGC

Tm. 56°C

Trichophyton equinum

TequITS-442F: GCGAGCCTCTCTTTATAGC

TequITS-442R: AAACAGATTTTGAGGCCAG

Tm. 55°C

Trichophyton mentagrophytes

TmenITS-331F: GCGAGCCTCTCTTTAGTGGCT

TmenITS-331R: GCACCCCCAAAGACGG

Tm. 60°C

Trichophyton verrucosum

TverITS-426F: CTTCGGGGGCTTTAGCTGG

TverITS-426R: CTCAGAGAGATTTGGGGGAAGG

Tm.62°C

Para *Microsporium canis* se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos con diferentes temperaturas de alineación, para poder moverlo a cualquiera de las dos reacciones multiplex, los oligonucleótidos son los siguientes:

Microsporium canis

McanITS-297F: TCGCCGGAGGATTACTCT

McanITS-297R: AAGCGGTGGGTGGTTACT

Tm. 58°C

MnisITS-295F: GATTTACTCTGGAAAACACACTCTTGAA

MnisITS-295R: GCGGTGGGTGGTTACTGG

Tm. 62°C

5.6 Estandarización de PCR punto final

Para obtener una buena prueba se requiere de un balance adecuado para la amplificación de productos y reducir al mínimo los productos inespecíficos ⁵¹

Para correr la reacción de PCR se utilizaron las alícuotas a una concentración de 10mM/50µl de cada oligonucleótido. Una vez cuantificado el ADN, se alicoutó en tubos de 0.6µl a una concentración de 50ng/µl de ADN para colocar en cada reacción 100ng de material genético.

Como controles positivos se utilizó ADN de los aislamientos obtenidos de forma convencional en un trabajo previo, *Microsporium canis* cepa N2, *Trichophyton verrucosum* Z29, *Trichophyton mentagrophytes* F4, *Nannizzia gypsea* K8 y la cepa de referencia de

Trichophyton equinum CBS 292.81. Como control negativo se utilizó el aislamiento de *Chrysosporium* spp. J29, igualmente aislada de un caballo.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (marca: Techne®, modelo TC-412) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94° C por 4 minutos seguida de 30 ciclos de los cuales cada ciclo consiste en una desnaturalización a 94°C por 30 segundos. La temperatura de alineación fue diferente para cada especie; para *T. equinum* fue a 55°C, *N. gypsea* 56°C, *M. canis* 58°C, *T. mentagrophytes* 60°C, *T. verrucosum* 62°C una extensión a 72°C por un minuto y por último una extensión final a 72°C por 4 minutos.⁵⁴

El producto obtenido se observó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (5mg/ml) en un amortiguador TAE 1X a 93 amperes, durante 50 minutos. Posteriormente se documentó el producto amplificado.²⁶

5.7 Prueba de especificidad de los oligonucleótidos

Una vez estandarizadas las pruebas de PCR de manera individual se desafió cada par de oligonucleótidos con ADNs diferentes al blanco, el reto se hizo con el ADN de las especies obtenidas de los aislamientos, además también se utilizó como control negativo a *Chrysosporium* spp., para corroborar la especificidad de cada par de oligonucleótidos.

Las pruebas de especificidad se llevaron a cabo tanto de manera normal, como a través de una PCR *in silico*, usando el programa “*In silico* simulation of molecular biology experiments”,⁶² por medio del cual se desafió la especificidad con otros hongos queratinofílicos y no queratinofílicos.

5.8 Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos

Una vez realizadas las pruebas de especificidad de cada oligonucleótido de forma individual, se hicieron decuples del ADN, quedando una concentración de 10 ng/μl, 1 ng/μl, 0.1 ng/μl, 0.01 ng/μl y 0.001 ng/μl.

Después de hacer las diluciones se llevaron a cabo las reacciones para conocer cuál es la concentración mínima de ADN detectable para la prueba y que se revelaba perfectamente en el gel de agarosa.

5.9 Estandarización de la PCR Multiplex a partir de ADN de los aislados y la cepa de referencia

A partir de los resultados de la concentración mínima de ADN necesaria para la amplificación se procedió a estandarizar la temperatura de alineación adecuada para cada uno de los pares de oligonucleótidos.

Para esta parte se utilizó el Termociclador de gradiente MultiGene, marca Labnet modelo TC-9600-G/TC-9600-G-230V, para el ADN de *T. equinum*, *M. canis*, *N. gypsea* las temperaturas que se manejaron para su alineación fueron de 55°C, 56.4°C, 58.2°C y 58.6°C. La temperatura de alineación calculada para cada especie fue de 55°C, 58°C y 56°C respectivamente.

Para el ADN de *T. verrucosum* y *T. mentagrophytes* las temperaturas que se emplearon fueron de 59.6°C, 60.4°C, 62.2 y 62.2 °. La temperatura de alineación calculada para cada especie fue de 62°C y 60°C respectivamente.

Después de seleccionar la temperatura de alineación adecuada para el ADN, el siguiente paso fue desafiar cada par de oligonucleótidos, para ello en un tubo se colocó un par oligonucleótidos con su ADN blanco y adicionó un juego de oligonucleótidos de otra especie, en otro tubo se colocaron dos muestras de ADN y solo un par de oligonucleótidos, para observar si existía o no una competencia entre el ADN y/o los oligonucleótidos y que esto interfiriera en las amplificaciones (figura 13-14)

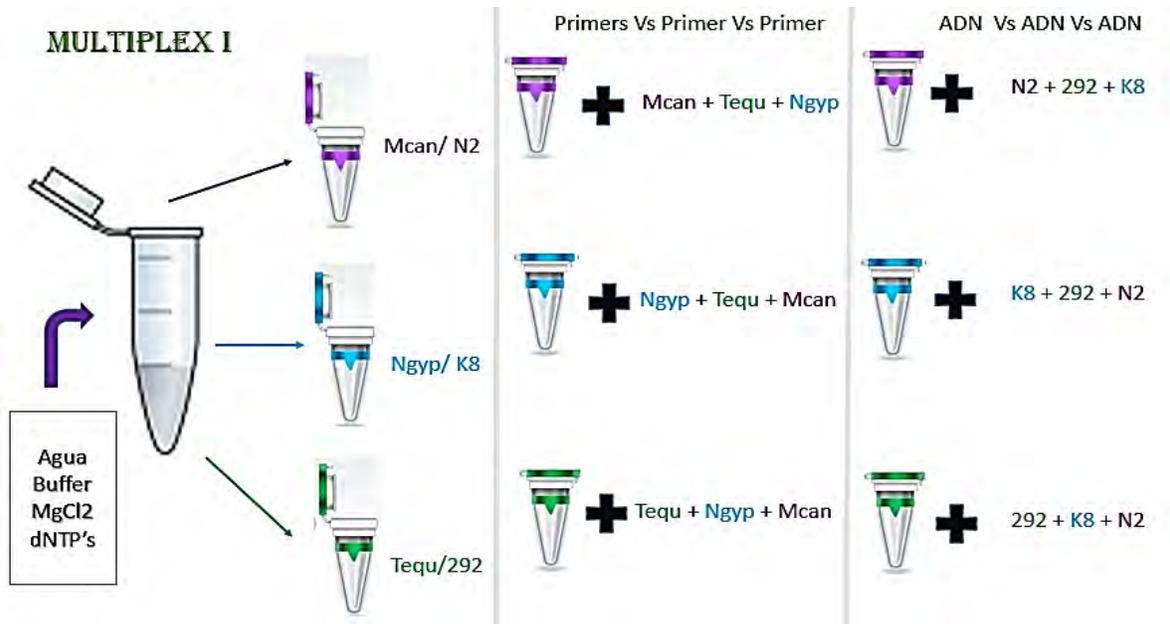


Figura13. Diagrama de las pruebas de desafío para observar la competitividad entre los iniciadores para la prueba Multiplex I (M-I)

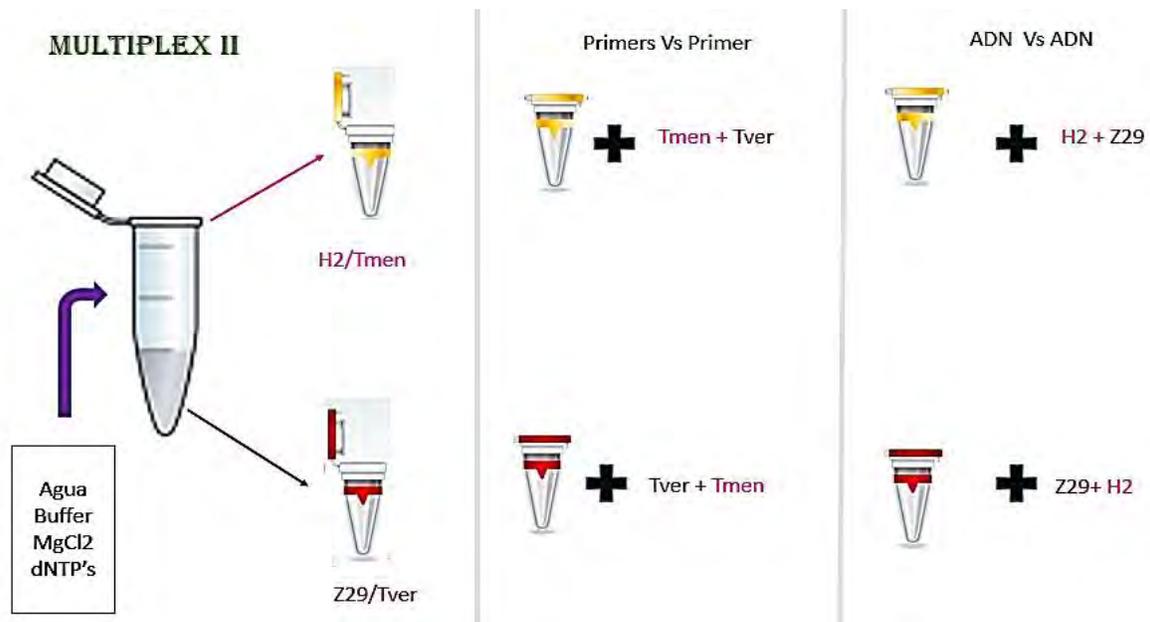


Figura 14. Diagrama de las pruebas de desafío para observar la competitividad de los iniciadores para la prueba Multiplex II (M-II)

5.10 Confrontación de la prueba multiplex con ADN extraído de pelo y escamas

Para la prueba M-I se preparó una mezcla de reactivos que contenía agua inyectable, buffer de reacción 10X, cloruro de magnesio, dNTP's, oligonucleótidos de *N. gypsea* y de *T. equinum*, ADN de la muestra y taq polimerasa (BioTechMol®)

Para la prueba M-II se preparó una mezcla de reactivos la cual contenía agua inyectable, de buffer de reacción 10X, cloruro de magnesio, dNTP's, los oligonucleótidos de *T. mentagrophytes* y de *T. verrucosum*, de ADN de la muestra y taq polimerasa.

Las constantes que se utilizaron para la PCR fueron: desnaturalización inicial a 94° C por 4 minutos seguida de 30 ciclos, cada ciclo consistió en una desnaturalización a 94°C por 30 segundos, la temperatura de alineación de la prueba multiplex I fue de 58.2°C y para la múltiplex II fue de 60.4°C, seguido de una extensión a 72°C por un minuto y finalmente una extensión final a 72°C por 4 minutos.

Una vez lograda la estandarización se realizó el desafío de las pruebas con el ADN obtenido de las muestras de pelo y escamas previamente cuantificado, proveniente de casos clínicos sospechosos de tener una dermatofitosis.

5.11 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con el software estadístico XLSTAT-BIOMED utilizando el programa Microsoft Excel aplicando tablas de contingencia para calcular la sensibilidad y especificidad de la prueba en estudio; además se calculó el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

6. Resultados

6.1 Muestras y aislados clínicos

En un estudio previo se recolectaron un total de 120 muestras de pelo y escamas, de estas se 22 fueron positivas al aislamiento y se obtuvieron 26 aislamientos, lo que representa un 18.33% de muestras positivas de las cuales se recuperaron seis especies de dermatofitos que fueron 4 *Trichophyton equinum* lo que representa un 15.38%, 1 de *Trichophyton verrucosum* representa el 3.8%, 7 de *Trichophyton mentagrophytes* representa el 26.94%, 2 de *Microsporum canis* representa el 7.69%, 11 *Nannizzia gypsea* que representa 42.30% y 1 de *Nannizzia nana* 3.8%.

Se tomaron las 22 muestras positivas en el aislamiento y 28 fueron elegidos al azar de los 98 restantes, teniendo un 44% (22/50) de cultivos positivos. La frecuencia que mostró cada especie fue: *Trichophyton mentagrophytes* 7/50 (1.4%), *Trichophyton equinum* 4/50 (8%), *Trichophyton verrucosum* 2/50 (4%), *Microsporum canis* 2/50 (4%), *Nannizzia gypsea* 11/50 (22%) y *Nannizzia nana* (antes *Microsporum nanum*) 1/50 (2%).

Los aislamientos fueron conservados en 10 mL agua destilada estéril y en tubos viales de 15x 80mm con agar avena.

La cepa de referencia proveniente de la micoteca de CBS- Knaw Fungal Biodiversity Center con número de identificación CBS 292.81. (figura 15)

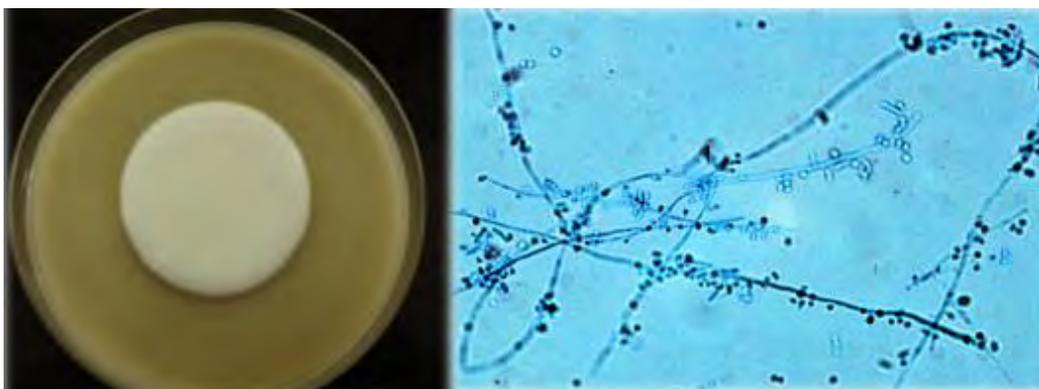


Figura 15. Cultivo de *T. equinum* cepa CBS 292.81 de 12 días, en medio lactritmel y microcultivo

6.2 Cultivos monospóricos para la extracción de ADN

En la figura 16 se muestran las condiciones en las que se realizaron los cultivos monospóricos para obtener la biomasa suficiente para llevar a cabo la extracción de ADN. Los cultivos en caldo Sabouraud se incubaron en una incubadora de agitación orbital, a 29°C durante 10 días.



Figura 16. Cultivo de los aislamientos N2, K8 y H2 en caldo dextrosa Sabouraud

6.3 Extracción de ADN

6.3.1 A partir de cultivo

Extracción de ADN a partir de cultivo puro se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mendoza (2002) siguiendo la metodología utilizada en el laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina (LM-FM) y el que contenía algunas modificaciones que es con que se contaba en el Laboratorio de Micología-FMVZ (LM-FMVZ).

En el gel de la figura 17 se observan varias bandas de un peso molecular mayor a los 1000 bp que corresponden al ADN que se extrajo (flecha verde), en la mayoría de las bandas se aprecia un ADN limpio y de buena calidad (flecha azul), la muestra del carril 3 presenta un ligero barrido debido a que contiene residuos de proteínas y carbohidratos (flecha roja). Esta extracción de ADN se realizó con el protocolo del LM-FMVZ.



Figura 17. ADN de aislamientos clínicos extracción hecha con el protocolo FMVZ

Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb (Vivantis)

Carril 2: Agua destilada (C-)

Carril 3: *N. gypsea*

Carril 4: *T. mentagrophytes*

Carril 5: *M. Canis*

Carril 6: *T. verrucosum*

Carril 7: *T. equinum/ N. gypsea*

En el gel de la figura 18, se logró la extracción de una cantidad adecuada de ADN, sin embargo, se observan residuos orgánicos de forma abundante excepto en la muestra del carril 13. El ADN tiene un peso molecular mayor a los 2000 pb.

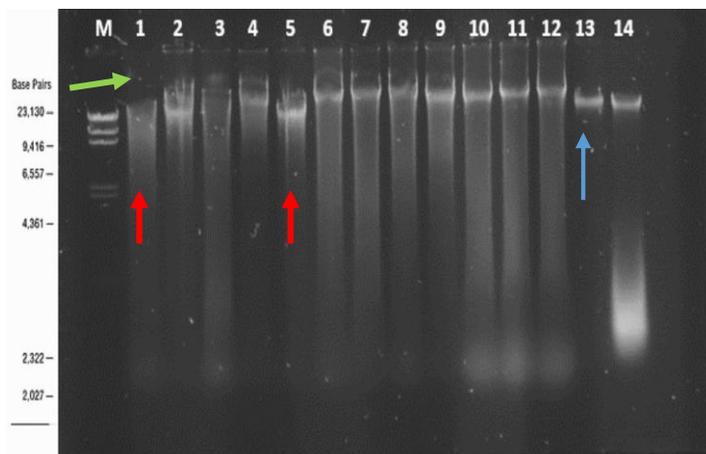


Figura 18. Extracción fenólica de ADN Protocolo Fac. de Medicina. ADN de aislamientos clínicos

M: Marcador λ Hind III

Carril 1,2,3 y 4: *M. canis*

Carril 5, 6,7 y 8: *N. gypsea*

Carril 9,10,11 y 12: *T. mentagrophytes*

Carril 13 y 14: *T. verrucosum*

Comparando ambos métodos de extracción de ADN con el protocolo del LM-FMVZ, se consiguió ADN puro e integró. La principal diferencia entre ambos procedimientos fue el momento en el que se usa la RNAsa, en el LM-FMVZ se coloca antes de realizar el último lavado con etanol al 70%, mientras que en el LM-FM este es el último paso que se lleva a cabo.

El ADN fue cuantificado y alicuotado en tubos a una concentración de 50ng/50 μ L para su uso en la reacción de PCR.

6.3.2 A partir de pelo y escamas

El protocolo empleado para la extracción de ADN a partir de escamas de reptil fue el ocupado para las muestras de pelo y escamas, pero no mostró el rendimiento deseado.

Se pretendió demostrar que no era necesario el uso de nitrógeno líquido para pulverizar el tejido, así que solo se fragmento, después de transcurrir las 24 horas de la extracción se preparó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a 70 amperes por 40 minutos, para corroborar si se extrajo ADN.

En la figura 19 se observa que a partir de la muestra proveniente de un canino (carril 2) si se logró extraer una cantidad adecuada de ADN, mientras que en las otras muestras no se logra apreciar el ADN.

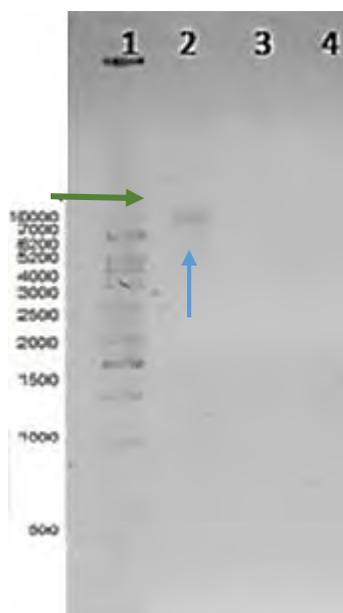


Figura 19. ADN obtenido de muestras de pelo y escamas
Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb (Vivantis)
Carril 2: Muestra de pelo de Canino
Carril 3: Muestra de pelo de equino
Carril 4: Muestra de pelo bovino

6.4 Diseño de oligonucleótidos específicos para las diferentes especies de *Trichophyton*, *Microsporium* y *Nannizzia* que afectan a los équidos.

Para el diseño de oligonucleótidos se utilizó la región ITS 1 e ITS 2 del ADN ribosomal que es una región conservada, las secuencias fueron tomadas del NCBI Genbank, se alinearon y compararon para obtener un iniciador específico para cada especie.

Una vez terminado el diseño de los oligonucleótidos fueron sintetizados y posteriormente resuspendidos en 500µL de agua inyectable y almacenado a -70°C.

El tamaño de uno de los productos de PCR fue *Microsporium canis* 297bp y 295bp, *Nannizzia gypsea* 373bp, *Trichophyton equinum* 442pb, *Trichophyton mentagrophytes* 331bp y *Trichophyton verrucosum* de 426pb.

Los amplificadores de *T. mentagrophytes* y *T. equinum* tuvieron unas fallas por lo que a pesar de realizar numerosos lavados a las muestras de ADN y de extraer ADN nuevamente de cultivos jóvenes no se logró producir nuevamente una amplificación de estos fragmentos por lo que fue necesario diseñar otros oligonucleótidos utilizando el gen TEF-1α, el cual es reportado como un gen importante en la taxonomía y caracterización en este género. Los nuevos oligonucleótidos diseñados se muestran a continuación.

Trichophyton equinum

Tequi Tef1-531F GCCACATACCACTAGCCAG

Tequi Tef1-531R GGAGGGGAAAGGTAAAGAAA

Tm. 58 °C

Trichophyton mentagrophytes

TmenTef1-338F CTTTTTTTGTTGCTTGGTGGG

TmenTef1-338R TGGAGGGGAAAGGTAAAGAGAA

Tm. 60°C

6.5 Estandarización de la PCR punto final

Para realizar la estandarización de la reacción se siguieron las condiciones estándar que menciona la literatura ⁶³ sin embargo; aunque si se observó el amplificado en el gel, la cantidad de reactivos utilizados en cada reacción eran demasiado, por lo que se decidió hacer una prueba usando de referencia las porciones utilizadas por Montes de Oca⁵⁵ la amplificación de los fragmentos deseados, se hizo una modificación la cual consistió en aumentar la cantidad de taq polimerasa (Vivantis® y Bio TecMol®) de 0.3µL a 0.5µL por reacción. (Cuadro 1)

	<i>Concentración inicial</i>	<i>Cantidades por tubo</i>
<i>dNTPs</i>	100mM	0.5 µl
<i>Magnesio</i>	25mM	1.5 µl
<i>Oligo Forward</i>	10 µM	0.5 µl
<i>Oligo Reverse</i>	10 µM	0.5 µl
<i>Enzima</i>	5U/µl	0.5 µl
<i>Buffer</i>	10x	5 µl
<i>Agua inyectable</i>	--	39.5 µl
<i>ADN</i>	0.1 mg/ml	2µl

Cuadro 1. Reactivos empleados para la amplificación de la región ITS y el gen TEF-1 α

Las constantes que se utilizaron para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa para los dermatofitos fueron las referidas por Refai y colaboradores, una vez finalizados los ciclos se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio.

En la figura 20 se muestran los amplicones de las 5 especies que se trabajaron, en el carril 1 se muestra a *M. canis* con un peso de casi 300bp, en el carril 2 está la muestra de *Nannizzia gypsea* con un peso aproximado de 373 bp, en el carril 4 está la muestra *T. mentagrophytes* y se hace evidente que tiene un peso menor al *N. gypsea* que es de 331 pb, por cual no se pueden llegar a confundir al momento de correr la prueba con muestras reales.

En el carril 5 está la muestra de *T. equinum* y se muestra que es la banda con mayor peso, este es de 442bp, finalmente en el carril 6 corresponde al amplificado de *T. verrucosum* el cual es ligeramente menos pesado que *T. equinum* con 426 bp, estos últimos podrían causar confusión al momento de correr la PCR con ADN proveniente de pelo y escamas, pero cada uno de estos amplificados se realizan con una Tm diferente.

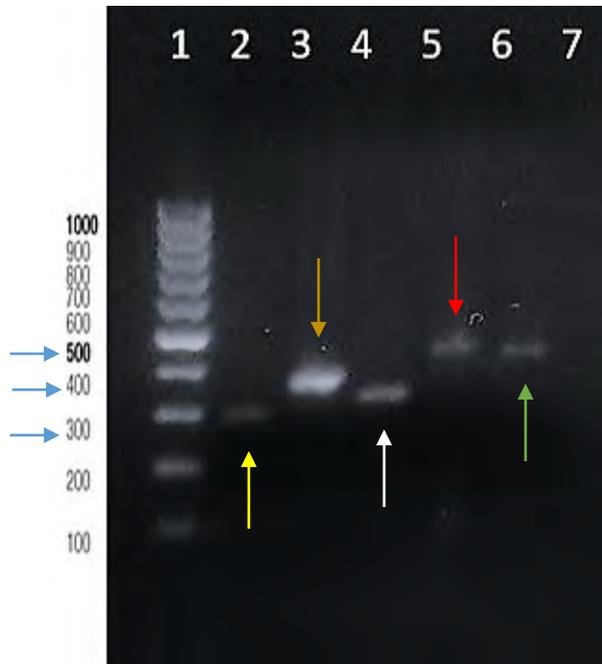


Figura 20. Amplificados individuales de cada especie de dermatofito.

Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 bp Invitrogen

Carril 2: *M. canis* (297 bp)

Carril 3: *N. gypsea* (373 bp)

Carril 4: *T. mentagrophytes* (331 bp)

Carril 5: *T. equinum* (442 pb)

Carril 6: *T. verrucosum* (426 bp)

Carril 7: Control negativo *Chrysosporium*

6.6 Prueba de especificidad de los oligonucleótidos

Luego de observar los amplificados de forma individual se llevó a cabo una prueba de competencia para cada par de oligonucleótidos y sus respectivos ADN blanco.

El principal ensayo de estas pruebas fue con los oligonucleótidos de *T. mentagrophytes* y *T. equinum* ya que la homología que presentaban en la región ITS mostraba una similitud de un 98% a 100%. En la figura 21 se corrobora la especificidad de los oligonucleótidos de *T. mentagrophytes*, ya que solo amplificó con la especie para el que fue diseñado. El peso molecular del amplificado es menos a 500 pb, y se supone que es aproximadamente de 300 bp, esto debido a que en este punto del experimento todavía no se contaba con el marcador de peso molecular de 100bp.

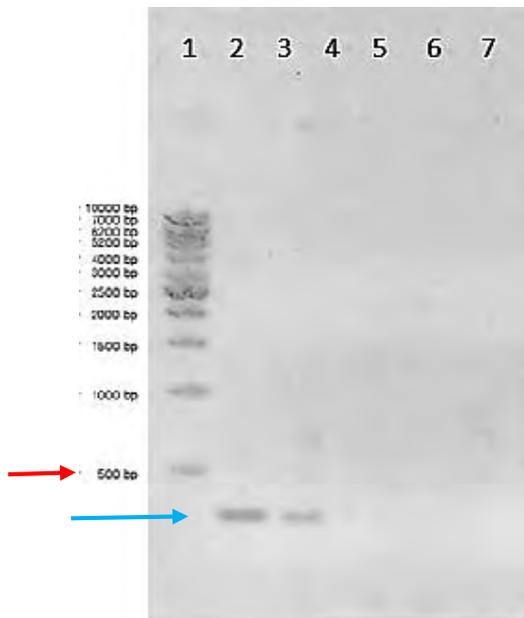


Figura 21. Prueba de especificidad para los iniciadores TmenITS-331F y TmenITS-331R

Carril 1: Marcador de peso molecular 1 kb Vivantis

Carril 2: Control positivo *T. mentagrophytes*

Carril 3: Muestra H2 (*Trichophyton mentagrophytes*)

Carril 4: Muestra M3 (*T. equinum/Nannizzia gypsea*)

Carril 5: Z29(*Trichophyton verrucosum*)

Carril 6: K8 (*Nannizzia gypsea*)

Carril 7: N2 (*Microsporum canis*)

En la figura 22 se observa que los oligonucleótidos específicos para *T. equinum* si presentaron un amplificado inespecífico de aproximadamente 900 bp cuando se usaba el ADN de la muestra M3 en la que estaban presentes *N. gypsea* y *T. equinum*, con *T. mentagrophytes* tampoco se presentó el amplificado inespecífico.

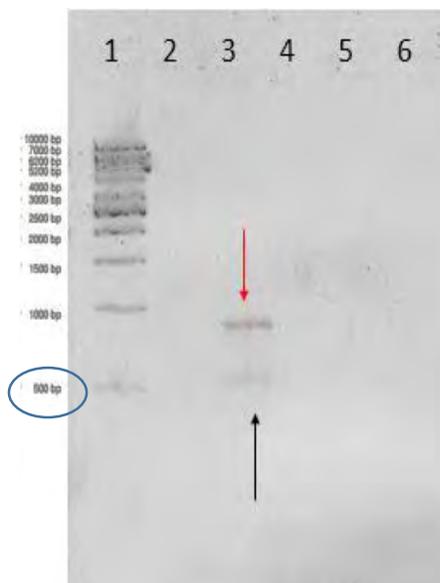


Figura 22. Prueba de especificidad de los iniciadores TequITS-442F y TequITS-442R

Carril 1: MPM 1 kb

Carril 2: *N. gypsea* (K8)

Carril 3: M3 (*N. gypsea/ T. equinum*)

Carril 4: *T. mentagrophytes* (H2)

Carril 5: *T. verrucosum* (Z29)

Carril 6: *M. canis* (N2)

Finalmente se hizo una PCR con ADN de *Chrysosporium* spp. aislado de un caballo para corroborar que no existiera un amplificado inespecíficos con los oligonucleótidos, además se llevaron a cabo diversos ensayos *in silico* para corroborar la especificidad de cada uno, a

pesar de que en este ensayo la especificidad fue de 100% al realizar ensayos con las muestras clínicas con algunos oligonucleótidos existieron amplificaciones inespecíficas.

6.7 Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos

Una vez finalizadas las pruebas de especificidad para cada oligonucleótido se realizaron diluciones decuples de cada ADN quedando en cada tubo 10ng/μL, 1ng/μL, 0.1ng/μL, 0.01ng/μL y 0.001ng/μL y se efectuaron las reacciones de PCR, para conocer cuál era la concentración mínima de ADN detectable para realizar la amplificación.

En la figura 23 se muestra que para *Microsporium canis* y *Nannizzia gypsea* la cantidad mínima de ADN sensible para la PCR fue de 0.001ng/μL (flecha roja). *Trichophyton equinum* fue poco sensible a baja concentración de ADN ya que se observa una banda hasta la cantidad de 1ng/μL (flecha amarilla). Estos resultados son satisfactorios ya que al traspolar estas cantidades a una muestra real es benéfico pues en una muestra también hay ADN de otros individuos.

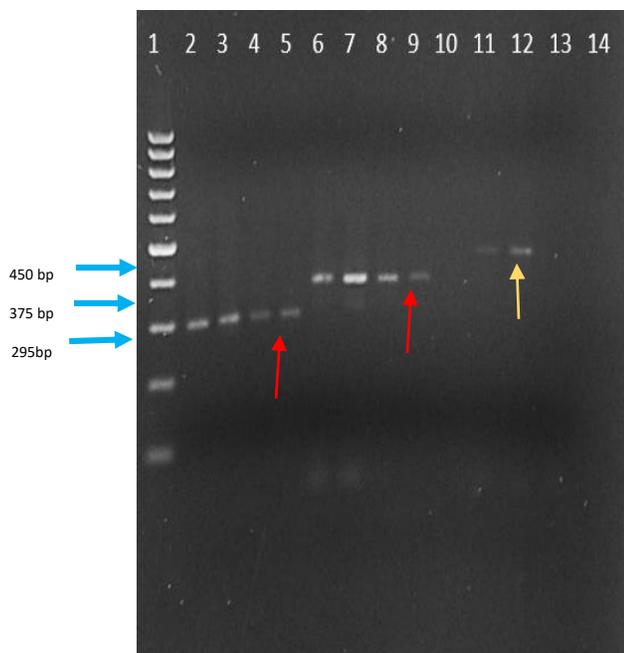


Figura 23. Productos de PCR de las diferentes concentraciones de ADN.

- Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 bp Invitrogen
- Carril 2: Dilución 1 (*Microsporium canis*)
- Carril 3: Dilución 2 (*Microsporium canis*)
- Carril 4: Dilución 3 (*Microsporium canis*)
- Carril 5: Dilución 4 (*Microsporium canis*)
- Carril 6: Dilución 1 (*Nannizzia gypsea*)
- Carril 7: Dilución 2 (*Nannizzia gypsea*)
- Carril 8: Dilución 3 (*Nannizzia gypsea*)
- Carril 9: Dilución 4 (*Nannizzia gypsea*)
- Carril 10: Dilución 1 (*T. equinum*)
- Carril 11: Dilución 2 (*T. equinum*)
- Carril 12: Dilución 3 (*T. equinum*)
- Carril 13: Dilución 4 (*T. equinum*)

En la figura 24 se muestra que en el caso de *Trichophyton mentagrophytes* la concentración de ADN a la que es sensible la prueba es similar a la *Trichophyton equinum* la amplificación que se aprecia mejor es hasta la concentración de 1ng/μL, aunque se visualiza una tenue

banda con la cantidad de 0.01 ng/ μ L no se toma en cuenta pues al realizar otra reacción de PCR puede llegar a observarse o no la amplificación. *Trichophyton verrucosum* fue sensible hasta la concentración de 0.001ng/ μ L al igual que *M. canis* y *N. gypsea*.

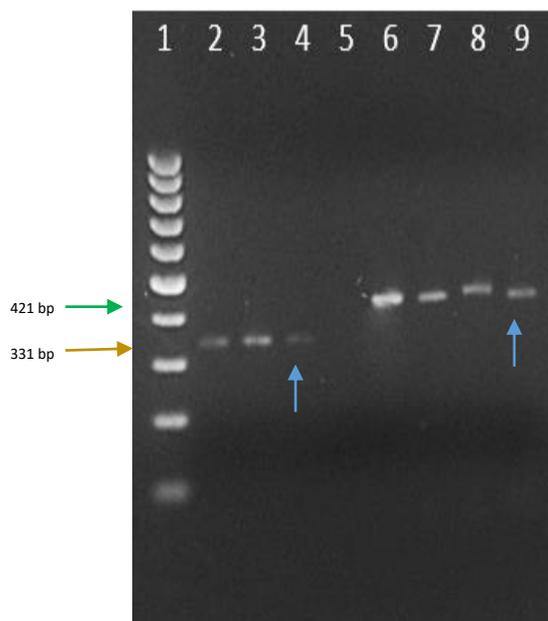


Figura. 24. Productos de PCR de las diferentes concentraciones de ADN.

Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 bp Invitrogen
Carril 2: Dilución 1 (*T. mentagrophytes*)
Carril 3: Dilución 2 (*T. mentagrophytes*)
Carril 4: Dilución 3 (*T. mentagrophytes*)
Carril 5: Dilución 4 (*T. mentagrophytes*)
Carril 6: Dilución 1 (*T. verrucosum*)
Carril 7: Dilución 2 (*T. verrucosum*)
Carril 8: Dilución 3 (*T. verrucosum*)
Carril 9: Dilución 4 (*T. verrucosum*)

6.8 Estandarización de la PCR Multiplex con ADN de aislamientos y la cepa de referencia

Después de terminar las pruebas de sensibilidad se inició con la primera fase para la estandarización de la PCR multiplex, por lo que se trabajaron diferentes temperaturas de alineación para cada prueba multiplex. En la prueba MI se colocaron a *M. canis*, *T. equinum* y *N. gypsea* y en la prueba MII a *T. verrucosum* y *T. mentagrophytes*.

La temperatura seleccionada para la prueba MI fue de 58.2°C y para la prueba MII fue de 60.4°C, a estas temperaturas se logró una amplificación de todas especies, después se desafiaron todos los oligonucleótidos.

En la figura 25 se muestra el desafío de la prueba M-II que solo cuenta con 2 especies, el resultado que se obtuvo fue bueno ya que no presentó ningún problema en la amplificación, ambos pares de oligonucleótidos fueron específicos para cada una de las especies, sin embargo, en baja cantidad de los oligonucleótidos de ambas especies si lograron alinearse y amplificar al otro ADN, tal y como lo indican las flechas, se distingue que los amplificados

inespecíficos tienen un peso molecular similar al esperado para cada par de oligonucleótidos. Estos amplificados dejaron de observarse cuando se aumentó la temperatura de alineación de 60.4°C a 61°C. Existe una especificidad adecuada entre el oligonucleótido diseñado y su ADN blanco.

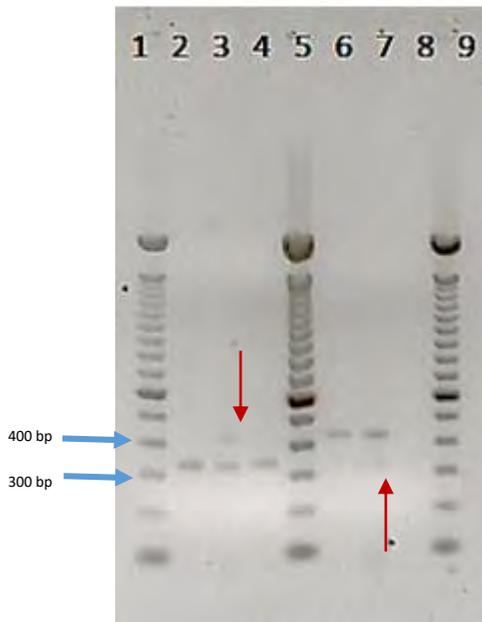


Figura 25. Desafíos entre los oligonucleótidos y el ADN para la prueba M-II
 Carril 1: Marcador de peso molecular 100 bp Invitrogen
 Carril 2: *T. mentagrophytes* C+
 Carril 3: H2 primer Vs primer
 Carril 4: H2 ADN Vs ADN
 Carril 5: MPM 100 bp Invitrogen
 Carril 6: *T. verrucosum* C+
 Carril 7: Z29 primer Vs primer
 Carril 8: Z29 ADN Vs ADN
 Carril 9: MPM 100 bp Invitrogen

En la figura 26 se muestran los resultados de la prueba M- I, se realizaron 2 pruebas para cada par de oligonucleótidos y los ADNs, al no encontrarse ninguna interferencia por parte de los oligonucleótidos ni del ADN, se prosiguió a realizar el, siguiente paso de la prueba la cual consistió en colocar los 3 pares de oligonucleótidos con una muestra de ADN, el cual era blanco de uno de los 3 pares de oligonucleótidos, después en otro tubo se colocaron las 3 muestra de ADN con un solo par de oligonucleótidos.

Los resultados fueron satisfactorios excepto en el caso de *M. canis*, en esta prueba se colocó al ADN de *M. canis* con los 3 pares de oligonucleótidos, al correr el gel se demostró que existía competencia entre los oligonucleótidos, por lo que no hubo amplificación del fragmento, esta prueba se repitió dos veces más obteniendo el mismo resultado, observando detenidamente el gel se pudo ver una tenue amplificación casi imperceptible, además se observa una banda inespecífica de un peso molecular menor al de *M. canis*.

Para eliminar la banda inespecífica se decide aumentar la concentración de los oligonucleótidos de *Microsporium canis* de 0.5µl a 1µl de cada oligonucleótido.

En la figura 26 se muestra el gel con los resultados de todas las pruebas hechas para las 3 especies. Del carril 2 al 4 se muestran las pruebas para *M. canis*, en el carril 3 se observan los tenues amplificadores que se mencionaron señalados con una flecha roja, como se mencionó son casi imperceptibles. Los carriles 6 a 8 muestran las pruebas para *N. gypsea* los cuales corresponden al peso molecular que ya se había descrito antes, dichas pruebas no tuvieron problema. Finalmente, los carriles 10 a 12 corresponden a *T. equinum* nuevamente esta correcto el peso molecular y no presentaron obstáculos en la amplificación.

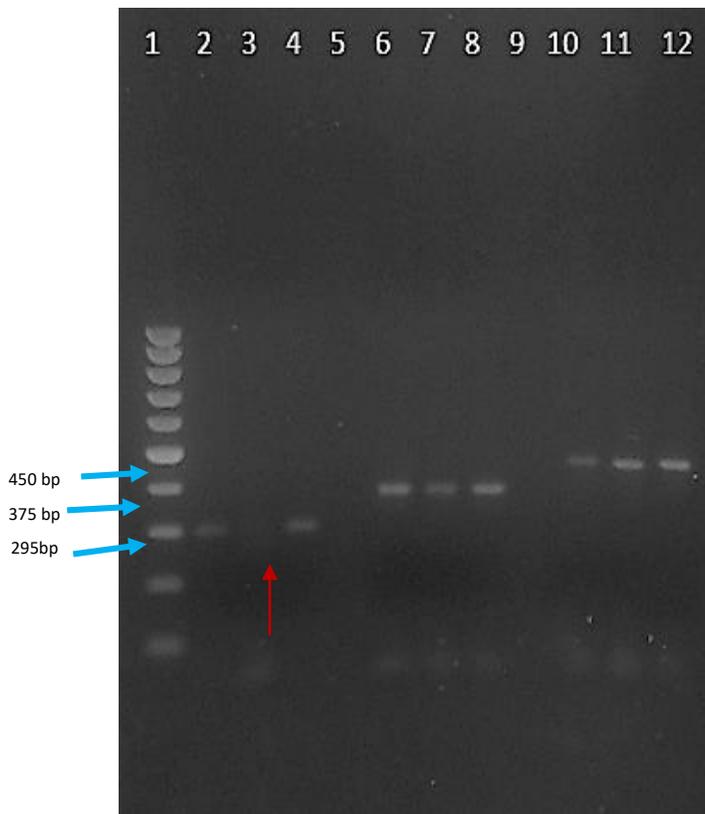


Figura 26. Desafíos entre los oligonucleótidos y el ADN para la prueba M-I

Carril 1: MPM 100 bp Invitrogen

Carril 2: *M. canis* C+

Carril 3: N2 primer Vs primer Vs primer

Carril 4: N2 ADN Vs ADN Vs ADN

Carril 5 y 9: nada

Carril 6: *N. gypsea* C+

Carril 7: K8 primer Vs primer Vs primer

Carril 8: K8 ADN Vs ADN Vs ADN

Carril 10: *T. equinum* C+

Carril 11: 292.81 primer Vs primer Vs primer

Carril 12: 292.81 ADN Vs ADN Vs ADN

La última parte de la estandarización de las pruebas M-I y M-II, consistió en colocar en un solo tubo el mix de ADN y oligonucleótidos, para evidenciar los amplicones de los agentes involucrados en la PCR multiplex.

En la prueba M-I primero se colocaron dos especies y luego las tres. En el tubo se mezclaron los reactivos en las mismas cantidades como ya se había referido. En la figura 27 en el gel se

observa la amplificación de ambas especies (*T. equinum* y *N. gypsea*), el fragmento más pequeño es el que se observa con mayor intensidad, así que para igual la intensidad de los amplificados se jugó con la concentración de los oligonucleótidos de *T. equinum* denominados TequITS-442F/R, las concentraciones fueron de 0.5 μ l a 0.75 μ l de cada oligonucleótido, la concentración en la que se observaron intensidades similares se observan en el carril 5 en donde *T. equinum* tiene una cantidad de 0.75 μ l y *N. gypsea* de 0.5 μ l. en el carril 4 es demasiado tenue la banda de *T. equinum* y en el carril 6 se observa la banda con mayor intensidad que *N. gypsea*.

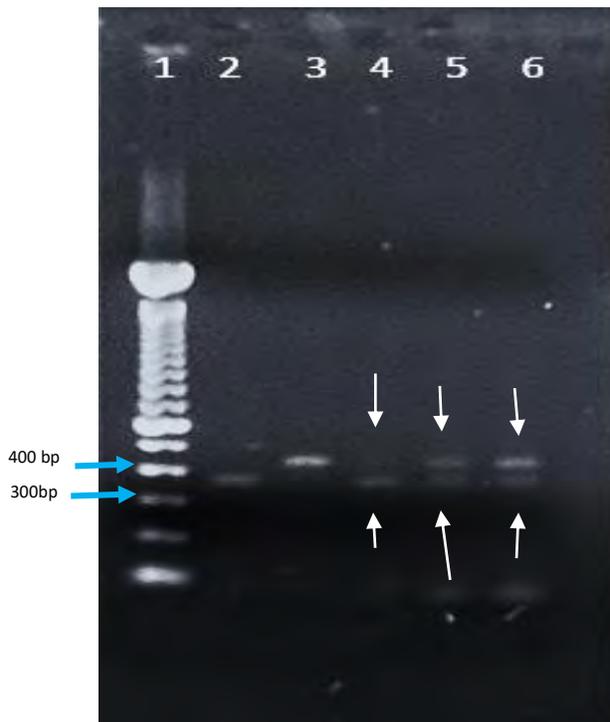


Figura 27. M-I con las diferentes concentraciones de oligonucleótidos
 Carril 1: MPM 100 bp
 Carril 2: Control positivo *N. gypsea*
 Carril 3: Control positivo *T. equinum*
 Carril 4: M-1 (0.5/ 0.5)
 Carril 5: M-1 (0.5/0.75)
 Carril 6: M-I (0.5/ 1)

Después se agregó en la prueba a *M. canis*, esta vez fueron colocadas las siguientes cantidades de oligonucleótidos para cada especie 0.5 μ l NgypITS-373F/R, 0.75 μ l de TequITS-442F/R y 1 μ l de McanITS-297F/R.

En la figura 28 se muestra que el resultado no fue satisfactorio ya que *T. equinum* no amplificó, *N. gypsea* si pero se observa muy tenue. *M. canis* al ser el fragmento más pequeño es el que resalta mejor, en el carril 2 solo están *T. equinum* y *N. gypsea*, el carril 3 muestra los resultados de la multiplex completa.

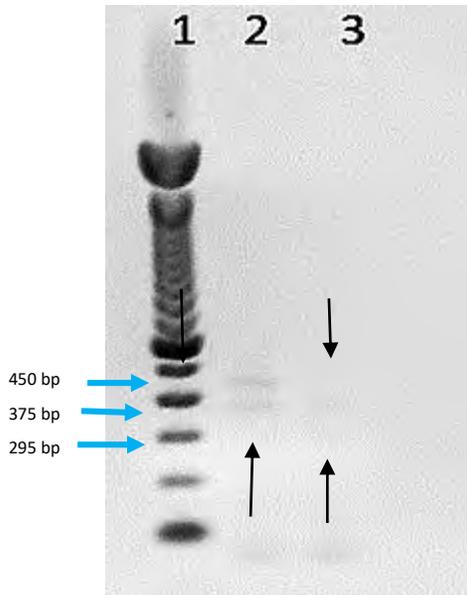


Figura 28. Prueba M-I completa
 Carril 1: MPM 100 bp
 Carril 2: Multiplex I (*N. gypsea*/*T. equinum*)
 Carril 3: Multiplex I (*M. canis*/*N. gypsea*/*T. equinum*)

A pesar de haber realizado varios intentos en la estandarización de la M-I no se lograron buenos resultados, los oligonucleótidos TequITS-442 y McanITS-297 compitieron entre ellos y no permitieron la amplificación de *T. equinum*, como se mencionó antes se presentó nuevamente el amplificado inespecífico como lo muestra la flecha roja de la figura 27 en el carril 5, en el resto de los carriles se muestra que el único que siempre amplificó fue *N. gypsea* por lo que se corrobora la competencia entre los oligonucleótidos de *M. canis* y *T. equinum*.

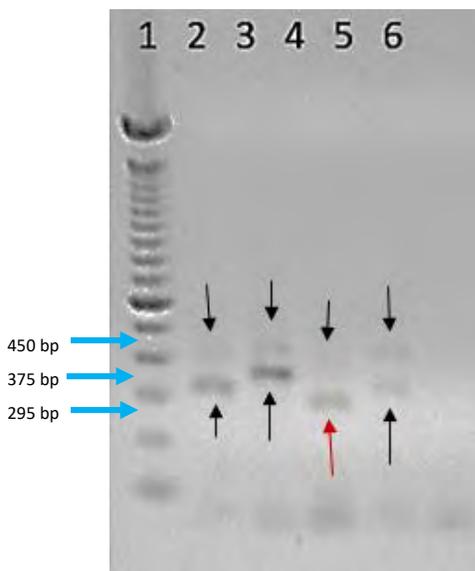


Figura 29. Prueba M-I con diferentes concentraciones de oligonucleótidos.
 Carril 1: MPM 100 bp Invitrogen
 Carril 2: M-I (*T. equinum*/*N. gypsea*)
 Carril 3: M-I (*T. equinum* 1ul/*N. gypsea* 0.5ul/*M. canis* 0.5ul)
 Carril 4: M-I (*T. equinum* 0.75ul/*N. gypsea* 0.75ul/*M. canis* 0.5ul)
 Carril 5: M-I (*T. equinum* 1.25ul/*N. gypsea* 0.75ul/*M. canis* 0.5ul)
 Carril 6: M-I (*T. equinum* 1.5ul/*N. gypsea* 1ul/*M. canis* 0.75ul)

En la prueba M-II amplifican perfectamente ambas especies, pero nuevamente el fragmento más pequeño es el que se observa con mayor intensidad, así que se aumentó la cantidad de los oligonucleótidos TverITS-426F/R para igualar su fluorescencia, se colocó 1µl de cada oligonucleótido de *T. verrucosum*. El resultado mostró ahora mayor intensidad el fragmento correspondiente a *T. verrucosum*, así que se realizó otra amplificación colocando ahora 0.75µl de oligonucleótido, con esta cantidad de oligonucleótidos se aprecian adecuadamente ambos fragmentos.

Debido a los problemas presentados en la prueba M-1 tomó la decisión de quitar a *M. canis* de la prueba de M-I y añadirlo a la prueba M-II utilizando el otro par de oligonucleótidos diseñados. Se realizaron nuevamente las pruebas de sensibilidad y especificidad de los oligonucleótidos, sin embargo, los resultados fueron los mismos por lo que se tomó la decisión de dejar la prueba M-I con dos agentes *T. equinum* y *Nannizzia gypsea*, la prueba M-II con dos agentes *T. verrucosum* y *T. mentagrophytes*. Finalmente, *Microsporum canis* se amplifica de forma individual

Desafortunadamente en algún punto de la fase experimental se presentaron problemas con la amplificación de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton equinum*, a las muestras de ADN que ya se tenían se les realizaron diversos lavados, sospechando que este aún contenía residuos de proteínas y carbohidratos los cuales interferían en la amplificación del fragmento deseado, al no obtener resultados favorables se diseñaron nuevos oligonucleótidos utilizando el gen TEF1- α para ambas especies, en la figura 30 se observan los amplificadores de los nuevos oligonucleótidos, en el carril 2 se muestra un fragmento con un peso molecular de 531bp que corresponden a *Trichophyton equinum*, en el carril 3 el amplicón tiene un peso de 338 bp aproximadamente el cual corresponde a *T. mentagrophytes*. En los carriles 4 y 5 están los controles positivo y negativo que se utilizaron. Finalmente *T. equinum* volvió a amplificar con los oligonucleótidos que ya se tenían y para *T. mentagrophytes* se emplearon los nuevos oligonucleótidos para el desafío de la prueba con muestras reales.

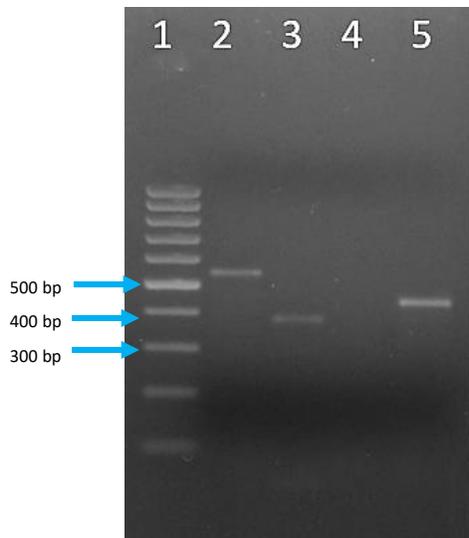


Figura 30. Nuevos oligonucleótidos de *T. equinum* y *T. mentagrophytes*
 Carril 2: *T. equinum* oligonucleótidos TequiTef1-531F/R (531bp)
 Carril 3: *T. mentagrophytes* oligonucleótidos TmenTef1-338F/R (338bp)
 Carril 4: *Chrysosporium* (control negativo)
 Carril 5: *T. verrucosum* (control positivo)

Al término del proceso de estandarización de la PCR multiplex, se decidió conservar solo a la prueba M-I y el resto de los agentes fueron amplificados de forma individual.

6.9 Confrontación de la prueba multiplex con ADN extraído de pelo y escamas

Para realizar el desafío de la PCR multiplex se tomaron las 22 muestras positivas en el aislamiento y las 29 restantes fueron elegidas al azar de los 98 sobrantes. A las 50 muestras se les extrajo ADN, para cada muestra se corrieron 4 pruebas una PCR multiplex y tres PCR punto final de forma individual (mPCR *T. equinum* y *N. gypsea*, PCR punto final *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* y *M. canis*).

En el cuadro 2 se muestran cuáles fueron las muestras seleccionadas, para la selección no se siguió un criterio específico de selección ya que solo se muestrearon individuos que presentaran lesiones sugerentes a una dermatofitosis sin distinción de raza, edad o género.

Muestras	Seleccionadas			
F4	A77	16/036	Tosco	
F6	J29	16/034	Vulcano	
F9	C8	17/021	Poblano	
M3	K6	14/026	Prodigio	
J47	E37	Corso	Intenso	
K38	N2	Linaje	kadafi	
A59	K17	Karma	Keiser	
B32	K19	Lotus	Prieto	
I4	H2	Bohemia	Isis	<i>T. mentagrophytes</i>
A69	J20	Cabúl	Caro	<i>T. equinum</i>
I47	K8	Horizonte	Bronco	<i>T. verrucosum</i>
C6	L17	Jaral		<i>N. gypsea</i>
M10	C19	Kosako		<i>M. canis</i>
				<i>N. nana</i>

Cuadro 2. Muestras seleccionadas para el desafío de la prueba, se encuentran señaladas las muestras positivas y el dermatofito aislado.

La PCR de *M. canis* tuvo mayor sensibilidad, detectó un mayor número de casos positivos que en la prueba convencional, por lo tanto, esta prueba cuenta con amplia sensibilidad ya que detectó cantidades mínimas de ADN. Las muestras identificadas como N2 y Kosako fueron las únicas en las que se obtuvo aislamiento, en la figura 31 se muestran los resultados de la primera serie de PCR, los pesos moleculares corresponde a las 295bp de *M. canis*, el control positivo se muestra en el carril 3, los carriles 12 y 14 señalados con las flechas verdes corresponden a los amplificados esperados ya que son las muestras positivas que se tenían. Los carriles 5,6 y 7 señalados con las flechas rosas presentan una banda de identificación del mismo tamaño que *M. canis*, así que se toman como positivos.

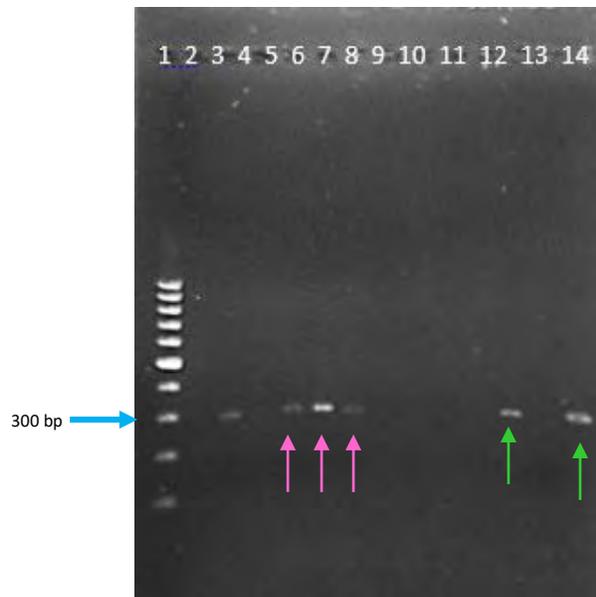


Figura 31. Desafío de la prueba para *M. canis* con ADN extraído de pelo y escamas
 Carril 1: marcador de peso molecular 100 bp
 Carril 2: control negativo
 Carril 3: Control positivo *M. canis*
 Carril 4: F9
 Carril 5: Cabul
 Carril 6: 17/021
 Carril 7: Karma
 Carril 8: J29
 Carril 9: Lotus
 Carril 10: F6
 Carril 11: K19
 Carril 12: N2
 Carril 13: A59
 Carril 14: Kosako

En la figura 32 se muestran las otras muestras positivas a la PCR de *M. canis*, en el carril 2 está el control positivo y en los carriles 8, 9, 13 y 14 se ven los amplificados positivos que corresponden al peso molecular de *M. canis*.

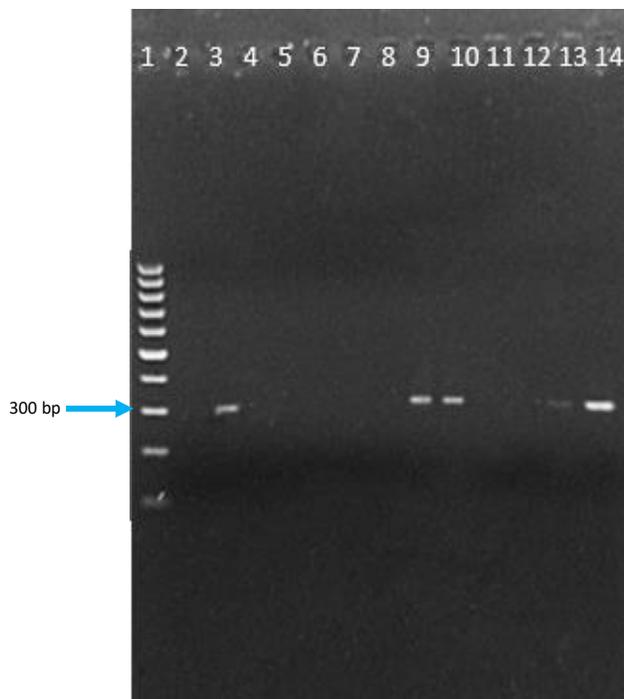


Figura 32. Desafío de la prueba para *M. canis* con ADN extraído de pelo y escamas
 Carril 1: marcador de peso molecular 100 bp
 Carril 2: control positivo *M. canis*
 Carril 3: Control positivo *M. canis*
 Carril 4: H2
 Carril 5: Poblano
 Carril 6: E37
 Carril 7: L17
 Carril 8: A69
 Carril 9: Keiser
 Carril 10: F4
 Carril 11: K8
 Carril 12: J20
 Carril 13: Linaje
 Carril 14: C6

En la figura 33 los carriles 4, 6 y 9 muestran las bandas correspondientes al mismo peso molecular que *M. canis*, los amplicones de los carriles 6 y 9 se observan de manera tenue, como lo muestra la flecha blanca.

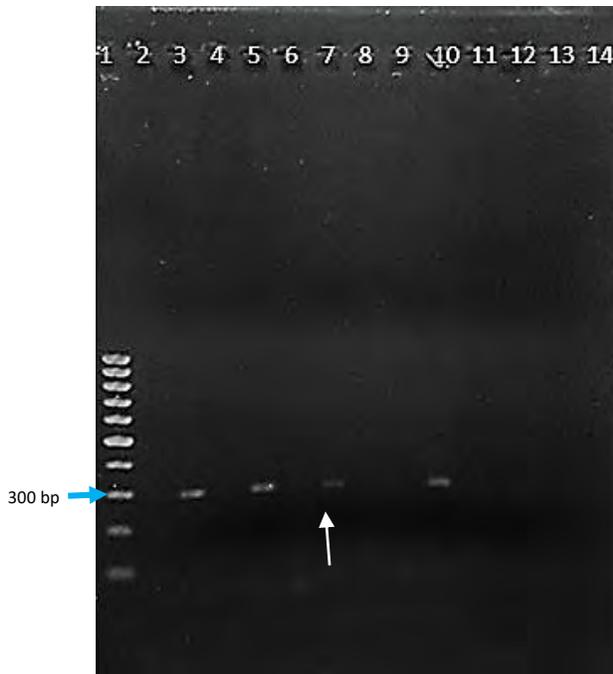


Figura 33. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio

Carril 1: marcador de peso molecular 100 bp

Carril 2: control negativo

Carril 3: Control positivo *M. canis*

Carril 4: K17

Carril 5: M3

Carril 6: A77

Carril 7: Vulcano

Carril 8: M10

Carril 9: Isis

Carril 10: Horizonte

Carril 11: Corso

Carril 12: I47

Carril 13: Prieto

Carril 14: Bronco

La PCR de *T. verrucosum* tuvo una sensibilidad adecuada, pero no es un resultado relevante que deba ser tomado en cuenta ya que solo se trabajó un caso positivo.

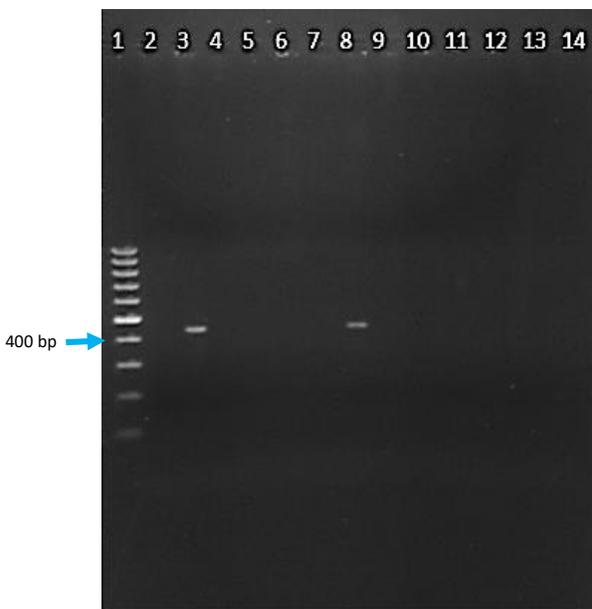


Figura 34. Desafío de la prueba para *T. verrucosum* con ADN extraído de pelo y escamas

Carril 1: marcador de peso molecular 100 bp

Carril 2: control negativo

Carril 3: Control positivo *T. verrucosum*

Carril 4: F9

Carril 5: Cabúl

Carril 6: J29

Carril 7: Karma

Carril 8: 17/021

Carril 9: Lotus

Carril 10: F6

Carril 11: K19

Carril 12: N2

Carril 13: Kosako

Carril 14: A59

En momento de hacer las extracciones de ADN a partir de tejido, se utilizaron 3 muestras de bovino positivas al cultivo con este agente, las 3 presentaron amplificación al momento de realizar la PCR de forma experimental. En la figura 35 se muestra el gel de los amplificados de *T. verrucosum* en la fase de prueba del protocolo de extracción, los amplificados son tenues, pero si se logran apreciar como lo indican las flechas.

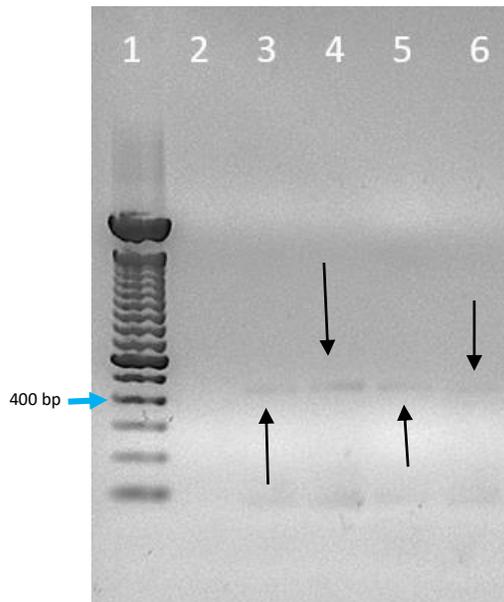


Figura 35. PCR para *T. verrucosum* ADN extraído a partir de pelo y escamas (pruebas)
 Carril 1: MPM 1kb
 Carril 2: Control negativo
 Carril 3: Muestra Z29/13 (bovino)
 Carril 4: Muestra H 17/021 (equino)
 Carril 5: Muestra 48/83 (bovino)
 Carril 6: Muestra 2115 /13 (bovino)

La PCR de *T. mentagrophytes* tuvo poca sensibilidad tuvo menos casos positivos en comparación con los detectados con la prueba de oro. En la figura 36 se muestran los amplicones que se obtuvieron en el carril 6, 9 y 14, todos corresponden al peso del control positivo que es de 331bp.

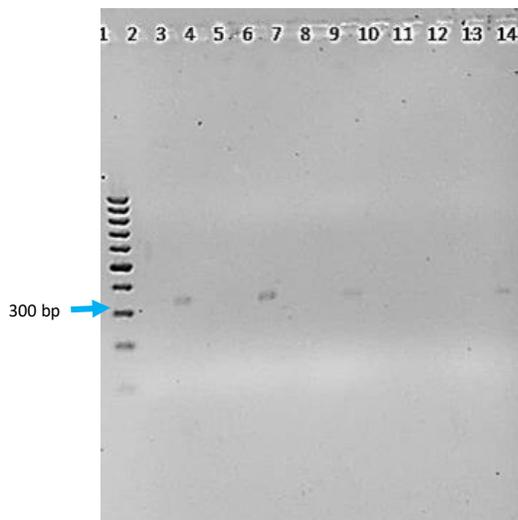


Figura 36. Desafío de la prueba para *T. mentagrophytes* con ADN extraído de pelo y escamas
 Carril 1: marcador de peso molecular 100 bp
 Carril 2: control negativo
 Carril 3: Control positivo *T. mentagrophytes*
 Carril 4: E37
 Carril 5: Poblano
 Carril 6: H2
 Carril 7: C6
 Carril 8: A69
 Carril 9: F4
 Carril 10: Keiser
 Carril 11: K8
 Carril 12: J20
 Carril 13: Linaje
 Carril 14: L17

En la prueba M-I se corroboraron la mayoría de los aislamientos positivos que se tuvieron en el aislamiento, solo en 2 casos no se obtuvo en resultado esperado. En la figura 37 se observa en el carril 3 y 4 los controles positivos de *T. equinum* y *N. gypsea* la muestra del carril 11 fue un amplificado que no se esperaba y que corresponde con el peso molecular de *N. gypsea*. Las muestras del carril 13 y 14 corroboran el aislamiento doble que se tuvo en la prueba convencional, en las muestras de los carriles 6 y 8 se esperaba el mismo resultado, sin embargo, solo se logró amplificar a *N. gypsea*.

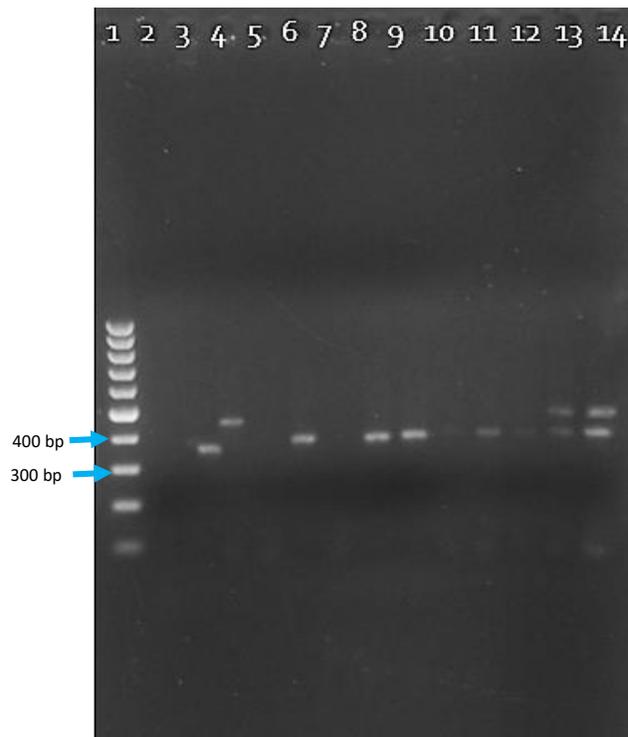


Figura 37. Desafío de la prueba para M-I con ADN extraído de pelo y escamas
 Carril 1: MPM 100 bp
 Carril 2: control – *Chrysosporium*
 Carril 3: control + *N. gypsea*
 Carril 4: Control + *T. equinum*
 Carril 5: B32
 Carril 6: F6
 Carril 7: Carolina
 Carril 8: M3
 Carril 9: Prieto
 Carril 10: Caro
 Carril 11: Rosillo
 Carril 12: Bronco
 Carril 13: A59
 Carril 14: K38

En las figuras 38 y 39 se muestran los resultados de la M-I en los carriles 3 y 4 están los controles negativos, todos los amplificados corresponde con el peso de *N. gypsea* que es de aproximadamente de 375 bp, en la figura 38 en el carril 8 de la muestra J20 no el tuvo amplificado que se esperaba, fue la única muestra que no amplificó para las 11 muestras positivas que se tuvieron de *N. gypsea*.

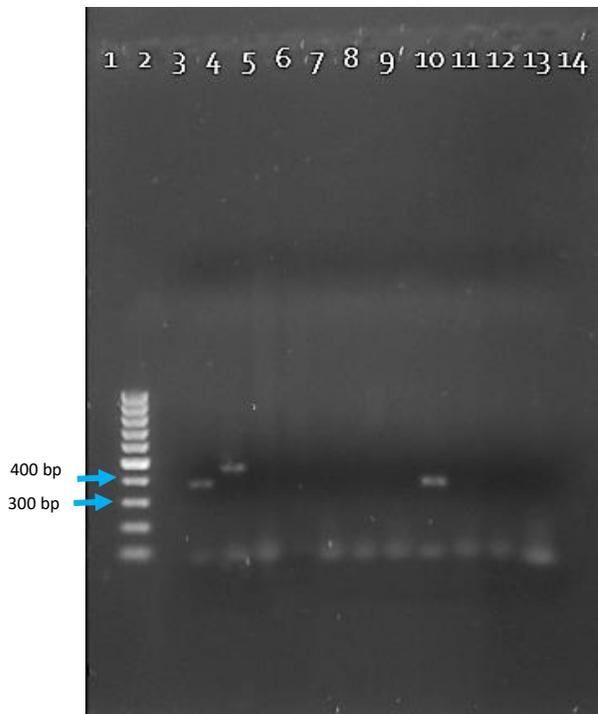


Figura 38. Desafío de la prueba para M-I con ADN extraído de pelo y escamas
 Carril 1: MPM 100 bp
 Carril 2: control – *Chrysosporium*
 Carril 3: control + *N. gypsea*
 Carril 4: Control + *T. equinum*
 Carril 5: K19
 Carril 6: Intenso
 Carril 7: J20
 Carril 8: Prodigio
 Carril 9: L17
 Carril 10: K8
 Carril 11: H2
 Carril 12: Poblano
 Carril 13: C19
 Carril 14: Linaje

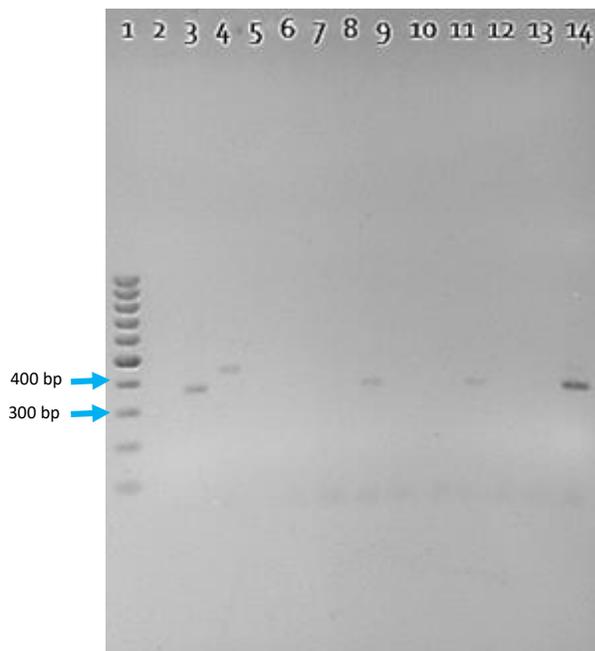


Figura 39. Desafío de la prueba para M-I con ADN extraído de pelo y escamas
 Carril 1: MPM 100 bp
 Carril 2: control – *Chrysosporium*
 Carril 3: control + *N. gypsea*
 Carril 4: Control + *T. equinum*
 Carril 5: F9
 Carril 6: J29
 Carril 7: 14/026
 Carril 8: J47
 Carril 9: N2
 Carril 10: Karma
 Carril 11: Keiser
 Carril 12: Lotus
 Carril 13: E37
 Carril 14: Isis

Después de los 4 desafíos realizados, se muestra que las PCRs para *M. canis* y *N. gypsea* amplificaron en la mayoría de los positivos al aislamiento por lo que tienen una sensibilidad y especificidad adecuada. En el caso del género *Trichophyton* no se lograron los resultados deseados.

6.10 Análisis estadístico

Para poder medir la capacidad que tiene una prueba para discriminar entre los individuos sanos y los enfermos se necesitan valorar las medidas tradicionales que son la sensibilidad y la especificidad ya que son características intrínsecas que al momento de ser medidas deben presentar resultados idénticos. La estabilidad de ambas medidas permite aplicar la misma prueba diagnóstica en diversas regiones y esperar un resultado similar; además permite comparar a dicha prueba con otras.

Para el análisis estadístico se utilizó el software XLSTAT-Biomed para Excel, con el cual se realizó el análisis de contingencia para las pruebas de PCR multiplex y PCR punto final clasificando las muestras en positivas y negativas tanto en el aislamiento como en la amplificación del gen para medir la sensibilidad y especificidad de la prueba en estudio y saber cuál fue la eficiencia en comparación con la prueba de oro.

La información obtenida durante la fase experimental se dividió en dos partes para poder hacer el análisis estadístico. En la primera parte se llevó a cabo el análisis general de los datos que fueron evaluados mediante los cuadros de contingencia y se calculó la sensibilidad y la especificidad de la prueba (Tabla 1).

En este se puede observar que la PCR a comparación del aislamiento tuvo una especificidad de un 82.1% la cual representa a los casos verdaderamente negativos, del otro lado se tiene a la sensibilidad que presentó un porcentaje del 68.2% lo cual se considera dentro de un rango bajo ya que este rublo detecta a los verdaderos positivos, también se hizo una correlación entre el KOH y la PCR, esto con la finalidad de observar si existía una relación entre observar o no la presencia de estructuras micóticas en el tejido y la adecuada amplificación de la muestra al momento después de realizar la extracción de ADN y correr la PCR, el resultado obtenido fue muy similares los obtenidos con KOH vs cultivo, teniendo una sensibilidad baja y una especificidad alta en comparación con la prueba convencional

Estadístico	PCR VS Cultivo	Cultivo vs KOH	PCR vs KOH
	Valor	Valor	Valor
Clasificación correcta	0.760	0.600	0.560
Error de clasificación	0.240	0.400	0.440
Sensibilidad	0.682	0.667	0.100
Especificad	0.821	0.591	0.867
Tasa de falsos positivos	0.179	0.409	0.133
Tasa de falos negativos	0.318	0.333	0.900
Prevalencia	0.440	0.120	0.400
PPV (valor predictivo positivo)	0.750	0.182	0.333
NPV (valor predictivo negativo)	0.767	0.929	0.591
LR+ (razón de verosimilitud positiva)	3.818	1.630	0.750
LR- (razón de verosimilitud negativa)	0.387	0.564	1.038
Riesgo relativo	3.214	2.545	0.815
Razón de probabilidad	9.857	2.889	0.722

Tabla 1. Análisis estadístico de la prueba convencional (aislamiento y KOH) y la prueba molecular (PCR)

Después de este el análisis se ejecutó las comparaciones entre la prueba de PCR específica para cada especie estudiada en esta investigación obteniendo los siguientes resultados (tabla 2). Se puede observar que la prueba de PCR para los géneros de *N. gypsea* y *M. canis* presentaron una sensibilidad del 81.8 % y 99.99% y una especificidad del 97.4% y 81.3% respectivamente. Mientras que las especies pertenecientes al género *Trichophyton* los tres tuvieron una especificidad del 99.99%, aunque para *T. verrucosum* todavía se requiere realizar un mayor número de desafíos pues solo se contaba con un aislamiento positivo, por lo que no se considera un resultado confiable, en cuanto a *T. equinum* la sensibilidad que presentó fue de un 50% y *T. mentagrophytes* una sensibilidad del 42.9%.

	<i>N. gypsea</i>	<i>M. canis</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. verrucosum</i>
Estadística	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
Tasa de clasificación correcta	0.940	0.820	0.960	0.920	1.000
Tasa de clasificación errónea	0.060	0.180	0.040	0.080	0.000
Sensibilidad	0.818	1.000	0.500	0.429	1.000
Especificidad	0.974	0.813	1.000	1.000	1.000
Tasa de falsos positivos	0.026	0.188	0.000	0.000	0.000
Tasa de falsos negativos	0.182	0.000	0.500	0.571	0.000
Prevalencia	0.220	0.040	0.080	0.140	0.020
PPV (Valor predictivo positivo)	0.900	0.182	1.000	1.000	1.000
NPV (valor predictivo negativo)	0.950	1.000	0.958	0.915	1.000
LR+ (razón de verosimilitud positiva)	31.909	5.333			
LR- (razón de verosimilitud negativa)	0.187	0.000	0.500	0.571	0.000
Riesgo relativo	18.000		24.000	11.750	
Razón de probabilidad	171.000				

Tabla 2. Análisis estadístico de cada especie trabajada en este estudio

7 Discusión

La obtención de ADN puro e íntegro es el paso inicial para realizar cualquier prueba molecular. Uno de los problemas que se presentan en este proceso es la dificultad para obtener este material a partir de pelo y escamas, debido a la composición que presenta este tipo de tejido y a que cada especie animal cuenta un tipo de pelo característico.⁶⁵

Dentro de la Medicina forense se reporta que el análisis del tejido queratinizado es complicado debido a la composición del epitelio y del cabello, este último cuenta con una cantidad adecuada de material genético para realizar un análisis genético siempre y cuando se encuentre con el folículo piloso, si el cabello se encuentra recortado el contenido de material genético es pobre para realizar el análisis. Para el diagnóstico de las dermatofitosis se comparte el mismo criterio: se requiere de la presencia del tallo piloso en la muestra ya que allí se encuentran presentes las estructuras del dermatofito, por lo tanto, es más factible obtener ADN de esa parte.⁶⁵

La diferencia entre el pelo humano y el pelo de los animales radica en el grosor, la cantidad de canal medular, la sustancia cortical y la cutícula. A grandes rasgos, el pelo animal presenta un mayor grosor, la corteza es delgada en comparación con el canal medular y la cutícula tienen una distribución incompleta y están menos imbricadas. Dentro de las especies animales existen diferencias en cuanto al grosor de las estructuras antes mencionadas; el pelo de los bovinos y los cerdos presentan un mayor grosor seguido por el pelo de los equinos, por lo que se requiere una adecuada técnica para lograr una extracción adecuada de ADN.^{66,67}

En este tipo de muestras la degradación del material genético es lenta y requiere de varios años para destruirse por completo, siempre y cuando la muestra esté conservada adecuadamente, principalmente en un ambiente seco, ya que se ha demostrado que con la presencia de humedad la degradación del material genético es más rápida.

El material genético que requiere la PCR multiplex desarrollada es solo el del hongo sospechoso, por lo que no se requiere lisar por completo la muestra de tejido queratinizado para no obtener ADN del individuo infectado. Así, se decidió dividir la muestra y colocar una parte en la solución de lisis. Para extraer una cantidad adecuada de ADN, fue necesario

utilizar además proteinasa K, por lo que este paso requiere de un tiempo prolongado para llevarse a cabo.⁶⁵

Para la extracción de ADN a partir de tejido queratinizado se probaron 2 protocolos, uno descrito por Garg et. al. y el otro por Refai y colaboradores, ambos utilizan la extracción fenólica y Proteinasa K. Para favorecer la lisis de la muestra, Refai primero fragmentó el tejido y utilizó diversas temperaturas que van desde los 55 hasta los 100°C en el baño María por periodos de tiempo relativamente cortos. Mientras que Garg pulverizaba la muestra con nitrógeno líquido y empleaba el detergente Tritón X-100 al 0.01%, sin embargo, con ninguno de ambos protocolos se logró la cantidad suficiente de ADN para ser observada en un gel, así que se realizó la extracción utilizando un kit de la marca Vivantis, con resultados deficientes.

Finalmente se aplicó un protocolo de extracción utilizado para la extracción de ADN a partir de tejido queratinizado de reptiles, el cual empleaba el uso de Sarkocyl que es un detergente relacionado con el SDS, con mayor actividad en la degradación del tejido. Se requirió de incubar la muestra en la solución de lisis por 16 hrs; cada 2 horas se adicionaban 20 µl de proteinasa K, ya que ésta va perdiendo su eficiencia, lo que hace a este método costoso. Después se realizó la extracción fenólica del material genético obteniendo un resultado favorable.

Actualmente el diagnóstico micológico convencional sigue siendo el más utilizado a pesar de que el tiempo que se requiere para el aislamiento es uno de los principales problemas a los que se enfrenta el micólogo clínico, ya que precisa de un periodo de 15 a 21 días para tener el resultado; además requiere de personal capacitado para poder identificar adecuadamente a los dermatofitos y así emitir un resultado preciso.⁵³ Por el tiempo prolongado para tener un diagnóstico preciso, la mayoría de los médicos veterinarios no envían las muestras al laboratorio de diagnóstico micológico y prefieren administrar el tratamiento.^{15,46}

Actualmente y con el advenimiento de la biología molecular, la micología clínica dispone de una extensa gama de técnicas de moleculares, las cuales son útiles para determinar al agente causal en diversos niveles taxonómicos. Cada prueba tiene diferente sensibilidad o

especificidad, por lo que es importante escoger adecuadamente la técnica que se va a utilizar en función del objetivo del estudio: diagnóstico, epidemiológico o taxonómico.^{47,50}

La taxonomía del grupo de los dermatofitos ha presentado pocas modificaciones en mucho tiempo, en comparación con otros hongos. Estos cambios solo han sido basados en las variaciones genómicas y han dejado de lado las características fenotípicas macroscópicas y microscópicas, así como el nicho ecológico, el tipo de hospedero y su fisiología.^{11,68,69}

El uso de la PCR es utilizado ampliamente en el diagnóstico micológico en medicina humana, mientras que en medicina veterinaria su aplicación ha sido más limitada, particularmente para el diagnóstico de las dermatofitosis, ya que se trata de una enfermedad que no compromete la vida del individuo y por consiguiente son subestimadas. Las pruebas estandarizadas en el diagnóstico veterinario generalmente incluyen un par de oligonucleótidos universales para los dermatofitos, utilizando el gen CHS-1, con el cual no se caracterizan a todas las especies de interés veterinario. la reacción se hace de forma individual con una PCR punto final de acuerdo con lo reportado por El-yazeed y Chung. En otro estudio Cafarchia y colaboradores utilizaron una PCR anidada con el gen CHS-1 y la región ITS, después hicieron una PCR punto final ocupando la región ITS.

Autores como de Hoog y Gräser describen varios genes que han sido utilizados en diferentes estudios de análisis filogenético para los dermatofitos, abarcando la región ITS y los genes de la β -tubulina (BT2), traslación del factor de elongación 1α (TEF- 1α), la calmodulina, 60S, LSU, topoisomerasa II (TOP II) y quitina sintetasa 1 (CHS-1).^{6,11}

Las regiones utilizadas para el diagnóstico de los dermatofitos son la región ITS y el factor de traslación de elongación 1α (TEF- 1α) para el género *Trichophyton*, mientras que para *Microsporum* y *Nannizzia* se prefiere solo la región ITS, ya que en estas regiones se encuentran diferencias significativas para cada especie.

Anteriormente era utilizado el análisis del gen CHS-1, pero debido a que la secuencia de este gen es altamente conservada dentro de este grupo, el estudio de las secuencias del gen CHS1 solo reveló que el género *Microsporum* es distinto de *Chrysosporium* y *Trichophyton* y fue complicado caracterizar a cada una de las especies de este género.⁷⁰

En varios estudios, cuando se demostraba la presencia de este gen dentro de una muestra sospechosa, únicamente se confirmaba la presencia de un hongo queratinofílico, sin llegar a identificar el género y a especie, ya que solo utilizaron un par de oligonucleótidos específicos para esta región. Dentro de la Medicina Veterinaria se ha empleado este gen para el diagnóstico de las dermatofitosis en caninos, felinos y equinos.^{45,35,36}

Shehata y colaboradores utilizaron la amplificación de la región ITS y para llegar a la identificación de género y especie utilizaron una prueba de PCR fingerprinting y el uso de RFLP para cuantificar y observar el patrón repetitivo de la secuencia del microsatélite GACA₄, y solo lograron la identificación de *Trichophyton mentagrophytes*.⁵² El uso de este tipo de pruebas no es confiable, ya que este tipo de microsatélites pueden presentar variaciones entre los individuos de una misma especie, dependiendo del origen de la muestra.

El-Yazeed et.al. utilizaron oligonucleótidos específicos para la región CHS-1 reportados anteriormente por Brillowska, con los cuales demostraban la presencia de hongos queratinofílicos, pero no determinaban el género y especie, pero con ese resultado justificaban su utilidad diagnóstica en la clínica equina, sin embargo; no es eficaz su uso dentro de la epidemiología.⁴⁶

En otro estudio, Cafarchia y colaboradores aplicaron una PCR punto final utilizando como blanco los genes ITS y CHS-1; después determinaban el género y la especie mediante una PCR anidada utilizando solo el fragmento ITS.³⁵

Después de analizar minuciosamente las distintas pruebas que han sido utilizadas para el diagnóstico molecular de las dermatofitosis tanto en humanos como en animales, además de los resultados obtenidos, se decidió considerar la región ITS por ser un gen de gran utilidad diagnóstica en este grupo de hongos. Así, se determinó diseñar una serie de oligonucleótidos específicos para cada una de las 5 especies a estudiar. Después de realizar la alineación y el análisis de la región, se observó una diferencia significativa entre *Microsporum canis* y *Nannizzia gypsea*, por lo que no hubo problema en el diseño de ambos oligonucleótidos.

El género *Trichophyton* presentó un reto en el diseño de los oligonucleótidos específicos para *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton equinum*, ya que mostraban una similitud de

un 98% y 100%; además las regiones candidatas para diseñar los oligonucleótidos formaban horquillas tanto al inicio y como al final del oligonucleótido, lo cual iba a dificultar su eficiencia en el momento de realizar la prueba. Finalmente se logró obtener los oligonucleótidos específicos los cuales fueron probados en una PCR in silico obteniendo resultados favorables y esperando que en la prueba PCR no existiera una amplificación inespecífica con otra especie. Para *Trichophyton verrucosum* no hubo problema en el diseño de los oligonucleótidos. El objetivo de diseñar oligonucleótidos específicos fue para apoyar el estudio epidemiológico de las dermatofitosis en el país.

La PCR multiplex fue descrita en 1988, la cual consiste en la amplificación de varios genes en una sola reacción. Ha sido aplicada de forma satisfactoria en diversas áreas, por ejemplo: en el área de la epidemiología detecta simultáneamente diferentes patógenos. Sin embargo, para estandarizar una prueba confiable, requiere de la inversión de mucho tiempo para obtener los amplificadores que se desean, sin que exista competencia entre los diferentes oligonucleótidos.⁶³

En medicina humana han sido reportados tres estudios en donde se emplea una PCR multiplex para el diagnóstico de esta infección. El primer trabajo fue realizado por Young y colaboradores en 2011 en el cual utilizaron la región ITS, 18S y 28S y diseñaron oligonucleótidos generales para las 11 especies de dermatofitos que trabajaron. Los resultados de las amplificaciones de los genes 18S y 28S, las 11 especies mostraron bandas de pesos similares, mientras que en la región ITS las bandas presentaban bandas de pesos diferentes las cuales se apreciaban a simple vista, por lo que confirma el uso diagnóstico de la región ITS, de acuerdo a lo descrito por Young cada par de oligonucleótidos cuenta con una temperatura de alineación (T_m) diferente, para la región ITS la T_m es de 60°C, en la 18S es de 57.5°C y para la 28S es de 50°C, no se mencionan si estandarizaron una temperatura específica para los 3 pares de oligonucleótidos cuando realizaron la PCR multiplex. Como resultados se reportó que en una sola reacción se colocaron los 3 pares de oligonucleótidos y una muestra de ADN, realizando la identificación del agente de acuerdo al peso molecular de los amplificadores obtenidos.⁷¹

Dhib y colaboradores estandarizaron una PCR multiplex para el diagnóstico de las onicomycosis, utilizaron a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton interdigitale*, los

oligonucleótidos fueron diseñados utilizando la región ITS y el gen CHS-1, los oligonucleótidos para CHS-1 son universales, mientras que los de la región ITS fueron específicos para cada especie, los oligonucleótidos presentan una temperatura de alineamiento similar que va de los 60°C hasta los 64°C. Las pruebas de especificidad de los oligonucleótidos se llevaron a cabo con *T. violaceum*, *M. gypseum*, *M. ferrugineum*, *M. canis*, *T. verrucosum*, *C. albicans* y *T. tonsurans*. Todos los dermatofitos involucrados amplificaron con los oligonucleótidos CHS-1, mientras que los oligonucleótidos específicos solo amplificaron con la especie para que fueron diseñados.

Al correr la mPCR, en un solo tubo se colocó una muestra de ADN y los oligonucleótidos, dependiendo del peso del amplificado realizaban la caracterización de las especies.⁷¹

De acuerdo con lo anterior para desarrollar la mPCR se diseñaron oligonucleótidos específicos para las cinco especies que afectan comúnmente a los équidos, utilizando la región ITS, como lo mencionan Young y Dhib la diferencia entre la cantidad y el contenido de los pares de bases entre las especies de *Trichophyton* son similares entre si y las diferencias radican solo en una o dos bases, en algunas especies se aprecia un máximo seis bases. En este estudio se presentó dicho problema con las especies de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton equinum*, pero se logró diseñar los oligonucleótidos específicos para ambos. Sin embargo, surgieron contratiempos durante el desarrollo de esta prueba, por lo que se tomó la decisión de diseñar nuevos pares de oligonucleótidos a partir de gen TEF1- α , para *Trichophyton equinum* y *Trichophyton mentagrophytes*, este gen es eficaz para su uso en el diagnóstico molecular de este género, de acuerdo a lo reportado por de Hoog y colaboradores, debido a que los oligonucleótidos diseñados de la región ITS presentaron fallas al momento de la amplificación.

El gen TEF1- α presentó similitudes de un 98% para ambas especies, afortunadamente las regiones candidatas para el diseño de oligonucleótidos no mostraron la formación de horquillas, sin embargo, al terminar el diseño de los oligonucleótidos se elaboró un dendograma del gen TEF-1 α para demostrar que a pesar la evidente similitud ambas especies se encontraron en estratos diferentes.

Uno de los principales conflictos en el desarrollo de oligonucleótidos de para una mPCR es la sensibilidad y especificidad de estos oligonucleótidos, es decir no debe de existir una competencia entre ellos y el ADN blanco. También es necesario que posean una temperatura de alineación similar. Tomando en cuenta estas reglas y debido a que no todos los oligonucleótidos tenían una temperatura de alineación similar la mPCR fue dividida en dos reacciones una con 3 especies llamada M-I (*T. equinum*, *N. gypsea* y *M. canis*) y la otra con 2 nombrada M-II (*T. mentagrophytes* y *T. verrucosum*).

Una vez dividida la prueba se corrieron las pruebas de sensibilidad y especificidad para cada oligonucleótido, en la prueba M-I no existía competencia entre los oligonucleótidos TequITS-442 F/R y NgypITS-373 F/R ni con los oligos NgypITS-373F/R y McanITS-297 F/R, sin embargo, cuando se colocaron los 3 pares de oligonucleótidos *T. equinum* ya no presentaba una amplificación ya que surgió una competencia entre los oligonucleótidos TequITS-442F/R y McanITS-297F/R, uno de ellos se alineaba al ADN que no era su blanco y formaba amplificaciones inespecíficas, a pesar de hacer diversas modificaciones en las cantidades de los reactivos y la temperatura para eliminar ese amplificado inespecífico, no fue posible amplificar a *T. equinum*. Así que se decidió trasladar a *M. canis* a la prueba M-II. Sin embargo, los oligonucleótidos *M. canis* nuevamente compitieron, presentando los mismos problemas, por lo que las pruebas fueron divididas nuevamente quedando en 2 reacciones multiplex y una reacción individual de *M. canis*.

La prueba M-I quedo estandarizada finalmente con los oligonucleótidos de la región ITS para ambas especies, también se probaron los oligonucleótidos del gen TEF1- α , y con ambos se tuvo una amplificación adecuada de forma individual para *T. equinum*.

La reacción de *M. canis* presentó una alta sensibilidad, ya que detecta poca cantidad de ADN, mientras que con la prueba de oro se obtuvieron solo dos aislamientos, en la prueba molecular se consiguió que en 10 muestras de la cuales no se presentó ningún aislamiento si se mostrara una banda de amplificación del mismo peso que el control positivo de *M. canis*, mostrando que tiene una sensibilidad del 99.99% y una especificidad del 81.3% resultados que coinciden con los reportes de Cafarchia y Faggi los cuales reportan un 94.1% a 94.4% de especificidad y un 94.4% a 100% de sensibilidad.

En cuanto a la prueba M-I de *T. equinum* y *N. gypsea*, después de su estandarización se corrieron las pruebas correspondientes a las 50 muestras seleccionadas, esta prueba no presentó una sensibilidad del 81.8% y una especificidad del 97.4% de los casos, de acuerdo a literatura cuando la sensibilidad o especificidad muestran un porcentaje mayor a la otra, una de las dos tiende a bajar su porcentaje es por ellos que al momento de estandarizar una prueba de diagnóstico deben medirse ambos rublos, y tratar que ambos tengan proporciones similares, en el caso de *N. gypsea* y *M. canis* se cumplen con estos objetivos.

En la prueba M-II se utilizaron los oligonucleótidos de la región ITS para *T. verrucosum* y TEF1- α para *T. mentagrophytes*, sin embargo, al correr las pruebas de especificidad no se tuvieron resultados satisfactorios ya que se presentaban amplificadas inespecíficas, debido al tiempo no se diseñaron otros oligonucleótidos para tratar de estandarizar la prueba, pero se seguirá trabajando en ese detalle. Para fines de este estudio solo se estandarizó una prueba multiplex con *T. equinum* y *N. gypsea*, mientras que *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* y *M. canis* se amplificaron de forma individual.

Los resultados estadísticos para el género *Trichophyton* se tuvo una menor sensibilidad. *T. mentagrophytes* y *T. equinum* presentaron una sensibilidad del 45% y 50% respectivamente, mientras que la especificidad fue de 99.99%. El factor principal que desencadenó estos resultados fue la deficiente cantidad de ADN extraído a partir del pelo y escamas a causa del protocolo utilizado. Al hacer las pruebas de sensibilidad, la cantidad de ADN mínima para ambas especies fue de 0.01ng/ μ l, otro factor que puede intervenir en la baja sensibilidad de la prueba es el tipo de parasitación que presentan algunas especies de dermatofitos, de acuerdo con Rebell y Taplin.⁷²

La mayoría de los dermatofitos zoofílicos presentan una parasitación ectotrix lo que significa que la presencia de la sabana de conidas se encuentra alrededor del folículo piloso, mientras que la parasitación endotrix las estructuras micóticas se encuentran dentro del pelo, si la infección es severa se pueden llegar a exponer ambas presentaciones y es llamada ectoendotrix. En base a esto se sugiere realizar la extracción a partir de las escamas de la muestra ya que es factible obtener de allí mayor cantidad de material genético, además se

trata de un tejido robusto en su estructura por lo que requiere el uso de una mejor técnica de extracción de ADN a partir del tejido queratinizado.^{35,46,72}

Los resultados estadísticos arrojados para *T. verrucosum* presentaron una sensibilidad y una especificidad de 99.99%, sin embargo, se trata de un resultado poco confiable ya que dentro del estudio solo se tuvo un aislamiento positivo y una de las muestras fue sospechosa a *T. verrucosum*, dicha muestra no presentó amplificación mientras que la otra si tuvo un amplificado con el mismo peso molecular de *T. verrucosum*, por los que se requiere un mayor número de muestras positivas a *Trichophyton verrucosum* para poder realizar un análisis estadístico certero. Mientras se realizaban los diversos protocolos de extracción de ADN a partir de tejido queratinizado se utilizaron 3 muestras provenientes de bovinos positivos a *Trichophyton verrucosum*, en los 3 casos si existió una banda de identificación de *T. verrucosum*.

De acuerdo a los estudios revisado la PCR multiplex de acuerdo con Dhid tiene una sensibilidad del 97% en comparación con la prueba convencional que es de 87.1%. En el caso de Kim obtuvo un 95% de sensibilidad la prueba que estandarizó. En nuestro caso la sensibilidad de la prueba de PCR en general fue del 68.2% mientras que la especificidad fue de 82.1%, cabe mencionar que las muestras trabajadas fueron obtenidas de individuos diferentes tanto Kim como Dhid, trabajaron con muestras provenientes de personas por lo que la carga de microorganismo es poca, en nuestro caso se trabajaron con muestras de animales que se encuentran confinados en una caballeriza o corral, y están en contacto con una mayor cantidad de microorganismo, lo cual afecta ya que extrae ADN de diferentes microorganismos.

El-yazeed y colaboradores desarrollaron una prueba de PCR utilizando el gen CHS-1 el resultado que presentó esta prueba muestran que la PCR tuvo una sensibilidad del 73.3 %, lo cual no se encuentra alejado de los resultados obtenidos por nosotros. El trabajo reportado por Chung y colaboradores los cuales también utilizaron el mismo gen CHS-1 tanto la prueba convencional como la molecular mostraron una sensibilidad del 66.66%, sin embargo, ambas referencias fueron hechas en base a una PCR punto final y no una PCR multiplex.

Finalmente, al no lograr el objetivo de desarrollar una sola prueba de PCR multiplex, se elaboraron 2 tablas comparativas para los oligonucleótidos que serían colocados en cada prueba.

En la tabla 5 se muestra la existencia de uniones entre el mismo oligonucleótido o con otro, dependiendo de la cantidad de alineamientos que existan la energía que se va requerir para romper esos enlaces va a ser más alta, dicha energía está representa por kilocalorías, esa resistencia va a ser controlar con la temperatura de alineación, entre más enlaces existan mayor será la temperatura para romperlos. Se puede observar que la adherencia entre los oligonucleótidos NgypITS-373F y NgypITS-373R es de 8.10 Kcal una cantidad considerable sin embargo no se tuvo problema alguno en el uso de estos oligonucleótidos.

Con el resto de los oligonucleótidos se puede observar que las cantidades de kilocalorías son menores a los de Ngyp, sin embargo, si es una cantidad considerable de kcal.

El problema al estandarizar la prueba M-I fue la presencia de una competencia entre los oligonucleótidos de McanITS-297F/R y TequITS-442F/R, dirigida hacia el ADN de *Microsporium canis*, ya que no se llegaba a observar ninguna banda de amplificación cuando se hizo la prueba de especificidad, después se observó que existía un amplificado inespecífico de un peso menor al de *M.canis*, el cual no era visible al momento de documentar el gel, por lo que se concluye que los oligonucleótidos TequITS-442F/R encuentran una región en el ADN de *M. canis* donde alinearse, a la cual tienen mayor sensibilidad que en el ADN blanco.

(Cuadro 3)

	Ngyp F	Ngyp R	Tequ F	Tequ R	Mcan F	Mcan R
Ngyp F	0 kcal/mol	8.10 kcal/mol	2.60 kcal/mol	1.70 Kcal/mol	3.30 kcal/mol	1.7 kcal/mol
Ngyp R			1.80 kcal/mol	0.30 kcal/mol	1.80 kcal/mol	1.80 kcal/mol
Tequ F			1.70 kcal/mol	4.40 kcal/mol	3.30 kcal/mol	1.50 kcal/mol
Tequ R				4.30 kcal/mol	1.20 kcal/mol	1.80 kcal/mol
Mcan F					4.80 kcal/mol	1.70 kcal/mol
Mcan R						0 kcal/mol

Cuadro 3. Cantidad de Kcal/mol necesarias para destruir los enlaces entre cada primer para la prueba Multiplex I

Además de esto existen otros amplificadores inespecíficos que presentaron los oligonucleótidos McanITS-297F/R en 3 de las muestras analizadas, los cuales sería importante purificar y secuenciar para saber a qué microorganismo pertenecen ya que la muestra contiene ADN de diferentes individuos (bacterias, Hongos, etc.)

En el caso de la prueba M-II no se observan cantidades de kcal tan altas, pero no se logró estandarizar la PCR con ninguno de los 3 géneros. Ya se había detectado que los oligonucleótidos de la región ITS tanto para *T. verrucosum* como *T. mentagrophytes*, presentaban una alineación entre su ADN blanco y el otro, dicha alineación desapareció cuando se aumentó la temperatura en el termociclador, al utilizar el nuevo par de oligonucleótidos se comprobó que no existía ningún amplificador inespecífico de acuerdo al resultado arrojado por la PCR *in silico* que se aplicó, a pesar de hacer varios intentos para estandarizar la PCR no se logró, por lo que se sugiere diseñar otros oligonucleótidos utilizando un gen diferente para tratar de estandarizar la prueba y obtener los resultados deseados. (Cuadro 4)

	TmTEF1-a F	TmTEF1-a R	Tver F	Tver R	Mnis F	Mnis R
TmTEF1-a F	0 kcal/mol	0.40 kcal/mol	0.30 Kcal/mol	1.50 kcal/mol	0.70 Kal/mol	0 kcal/mol
TmTEF1-a R		0 kcal/mol	1.30 kcal/mol	1.80 kcal/mol	1.0 kcal/ mol	0.90 kcal/ mol
Tver F			1.30 kcal/mol	0.10 kcal/mol	1.50 kcal/mol	0.00 kcal/mol
Tver R				1.80 kcal/mol	1.70 kcal/mol	1.50 kcal/mol
Mnis F					1.20 kcal/mol	1.70 kcal/mol
Mnis R						0 kcal/mol

Cuadro 4. Cantidad de Kcal/mol necesarias para destruir los enlaces entre cada primer para la prueba Multiplex

Al final de cuentas se está trabajando con una ciencia inexacta, por lo que no siempre se logrará observar los mismos resultados de un ensayo *in silico* en un ensayo *in vivo*.

El desarrollo de tecnologías moleculares para el diagnóstico de enfermedades es parte de la modernidad y de los avances que ha tenido de la ciencia, pero no hay que dejar de lado el uso de métodos convencionales en el diagnóstico micológico; una prueba molecular puede ser lo suficientemente sensible como para detectar la presencia del material genético específico de un agente infeccioso, aunque eso no siempre demostrará si realmente dicho agente es el causante de la infección en el individuo.

8 Conclusiones

1. Se requiere aumentar el número de muestras para el género *T. verrucosum* para corroborar la utilidad diagnóstica de la prueba.
2. En el caso de PCR para *M. canis* fue capaz de manifestar la presencia de casos positivos que no fueron detectados en el aislamiento micológico.
3. Utilizar otro protocolo de extracción de ADN a partir de pelo y escamas barato y eficaz.
4. La prueba es de utilidad diagnóstica en el caso de *M. canis* y *N. gypsea* porque tienen una sensibilidad y especificidad adecuada.
5. En el caso del género *Trichophyton* se requieren hacer algunos ajustes para poder ofertar la prueba diagnóstica.
6. Las pruebas diseñadas otorgan un diagnóstico preciso en un plazo máximo de 72 hrs. en comparación con el diagnóstico convencional que es de 15 días.

9 Referencias

1. Ajello L. Natural history of dermatophytes and related fungi. *Mycopathol Mycol Appl* 1974; 53:93-110.
2. Echevarria GL. Reseña Histórica del Descubrimiento de los Hongos Dermatofitos desde el Siglo I a.C. hasta los trabajos actuales. *SIJ*, 2016; 13(3): 21-33.
3. Bonifaz AT. *Micología Médica Básica*, 4° edit. México: McGraw-Hill Interamericana, 2010. Pág. 93.
4. Pascoe RR. Studies on the prevalence of ringworm among horses in racing and breeding stable. *Australian Vet. J.* 1976; 52:419-421.
5. Gräser Y, Scott J, Summerbell R, The New Species Concept in Dermatophytes- Polyphasic Approach, *Mycopathol* 2008;166:239-256.
6. de Hoog, G. S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., Rezaei-Matehkolaei, A. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathol*, 2016;182: 5-31.
7. Hibbett DS, Taylor WJ., Fungal Systematics: is a new age of enlightenment at hand? *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(2):129-33
8. De Hoog, G. Sybren, et al. Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(4):1056-62.
9. Luque A. *Micología Dermatofitosis*, Fac. Cs. Bioq. Y Farm. UNR (Centro de Referencia de Micología) 2012 Marzo; [citado 26 septiembre de 2017] disponible en: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIAL_2012/POWER_POINT_EN_PDF/P.P._Dermatofitos_Micologia.pdf
10. Georg L.K. Ecology and diagnostic problems of fungal zoonoses. *Industrial Medicine and Surgery.* 1964; 33(5): 308-310.
11. Pascoe RR, Knottenbelt CD, McGarry WJ. *Principles & Practice of Equine Dermatology.* 2° edit. London; SAUNDERS. 2009: 167-175.
12. Biberstein EL. *Dermatophytes* En: Hirsh DC. Chung ZY. *Veterinary microbiology.* U.S.A.: Blackwell Science, 2001:214-219.
13. ST- Germain G, Summerbell R, *Identifying Fungi a clinical laboratory handbook*, 2° edit., Star publishing company inc., Korea, 2011, pag. 172, 248, 254.

14. Fisher F, Cook NB, Fundamentals of Diagnostic Mycology, W.B. Saunders Company, A Division of Hartcourt Brace and Company, USA 1998, 123., pág. 17,19, 23-29.
15. Quinn PJ. Veterinary microbiology and microbial diseases. 1º edit. Gran Bretaña: Blackwell Publishing, 2002.
16. Overy D.P., Marron-Lopez F., Muckle A., Bourque A., Lund L., MacHattie D., Lopez A. Dermatophytosis in farmed mink (*Mustela vison*) caused by *Trichophyton equinum*. J Vet Diagn Invest. 2015;27(5):621-6.
17. Mycology Online, The University of Adelaide. org [home page on the internet]. 2016 [update 2016 Jan. 6: cited 2017 May]. Available from: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>
18. Smith JMB, Jolly RD, Lucille K, Georg K, Connole MD. *Trichophyton equinum* var. autotrophicum; its characteristics and geographical distribution. Medical Mycology, 1968; 6(4):296-304.
19. Pascoe RR. The epidemiology of the ringworm in a race horses caused by *Trichophyton equinum* var. *autotrophicum*. Vet. J. 1979; 55: 403-407
20. Mycology Online, The University of Adelaide. org [home page on the internet]. 2016 [update 2016 Oct. 6: cited 2017 Sep. 27]. Available from: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/microsporium/>
21. Segundo ZC, Martínez A, Arenas R, Fernández R, Cervantes RA. Dermatomicosis por *Microsporum canis* en humanos y animales. Rev Iberoam Micol 2004; 21:39-41
22. Land G, The Genus *Microsporum*. Kane J, Summerbell R, Sigler L, Land G, Kraiden S. Laboratory Handbook of Dermatophytes. USA, 1997: 193-206.
23. Mycology Online, The University of Adelaide. org [home page on the internet]. 2016 [update 2016 Oct. 6: cited 2017 Sep. 27]. Available from: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/nannizzia/>
24. Mycology Online, The University of Adelaide. org [home page on the internet]. 2016 [update 2016 Oct. 6: cited 2017 Sep. 27]. Available from: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/paraphyton/>

25. Mycology Online, The University of Adelaide. org [home page on the internet]. 2016 [update 2016 Oct. 6: cited 2017 Sep. 27]. Available from: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/lophophyton/>
26. Pascoe RR, Knottenbelt DC. Manual of equine dermatology. 1° edit. Hong Kong: W.B. SAUNDERS, 1999.
27. Scott DW, Miller WH, Dermatología Equina, 1st edit. Argentina: Saunders, 2004.
28. López GR, Ladin GL, Argüelles GB, Lara TJ Dermatofitosis Equina, 2008.informativo veterinario Albéitar PV [serial online] 2008 septiembre; [citado 26 septiembre 17]; Disponible en: URL: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3631/ARTICULOS-OTROS-TEMAS-ARCHIVO/Dermatofitosis-equina>
29. Stephen D. W., Equine Bacterial and Fungal Diseases: A Diagnostic and Therapeutic Update, Elsevier Saunders, Clinical techniques in equine practice, 2005, pag. 302-310.
30. Cafarchia C. Figuerado LA. Otranto D. Fungal diseases of horses. Vet. Microbiol. 2013; 167 (1-2): 1-20.
31. Cabañes FJ, Dermatophytes in domestic animals. *Rev Iberoam Micol*, 2000; 17: 104-108.
32. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Vol. 1 Bacteriosis y micosis. 3° edit. Washington, D.C.; Organización Panamericana de la Salud. 2001: 354-361.
33. Pilsworth RC, Knottenbelt D. Skin dieases refresher Dermatophytosis (ringworm), Equine Vet. Educ. 2007; 3: 151-154
34. Ross Bond, Superficial veterinary mycoses, Elsevier, Clinics in Dermatology 2010: 28, 226–236.
35. Scott WJ, Anthony AY. Infectious Folliculitis and Dermatophytosis. Equine Dermatology. Dec. 2013; 29: 559-575.
36. Rochette F, Engelen M, Vanden BH. Antifungal agents of Use in Animal Health- Practical applications. J. vet. Pharmacol. Therap; 2003:26:31-53
37. Fernández TB. Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos (tesis de doctorado). (Reus) España: Universitat Rovira i Virgili, 2005.

38. Lloyd HD, Littlewood DJ, Craig MJ, Thomsett. Practical Equine Dermatology. 1^o edit. UK: Blacwell Science, 2003: 27-30
39. Lund, A., Douglas J. D. "Immunoprophylaxis of dermatophytosis in animals." Mycopathologia. 2008 ;166(5-6):407-24.
40. Mikaili, A., Chalabi, M., Ghashghaie, A., & Mostafaie, A. Immunization against bovine dermatophytosis with live *Trichophyton verrucosum*. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(23), 4950-4953.
41. Antúnez G., Ramírez W., Rodríguez Y. Dermatofitosis bovina: su prevención y tratamiento - Bovine dermatophytosis: prevention and treatment. REDVET, 2012;(13):3.
42. DeBoer, D. J., & Moriello, K. A. Investigations of a killed dermatophyte cell-wall vaccine against infection with *Microsporum canis* in cats. Research in veterinary science, 1995. 59(2), 110-113.
43. Heidy AE-Y, Effat M, Abdalla K, Bakry M, Alarousy R, Farahat E, Application of Molecular Techniques for Rapid Diagnosis of Dermatophytes Infection in Horses. Global Veterinaria. 2013; 10(3):310-317.
44. Hungerford LL. Campbell CL. Smith AR, Veterinary Mycology Laboratory Manual. USA: Iowa State University Press/Ames, 1998.
45. Roderick J, Hay DM, Morris RJ. New Molecular Tools in the Diagnosis of Superficial Fungal Infections. Clinics in Dermatology. 2010; 28: 190-196.
46. Guarro J. Taxonomía y Biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(1):33–39.
47. Cafarchia C., Iatta R., Latrofa M.S., Gräser Y, Otranto D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Dermatophytes. Infect Genet Evol, 2013; 20: 336–351
48. Moreno LA. Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología, UNAM. 2007
49. Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética, 2da edición, Elsevier, España, 2012.
50. Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati AK, Nath G. Rapid Detection of Dermatophytes from Skin and Hair. BioMed Central; 2009; (2): 60
51. Kanabe T, Suzuki Y, Kamiya A, Michizuki T, Kawasaki M, Fujihira M, Kikuchi A. Species-identification of Dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and

- Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP of the DNA Topoisomerase II Genes. Journal of Dermatological Science. 2003; 33; 41-54
52. Shehata AS, Mukherjee KP, Aboulatta NH, El Akhras AI, Abbadi HS, Ghannoum AM. Single-Step PCR Using (GACA)₄ Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains, Journal of Clinical Microbiology 2008;46:2641-2645.
 53. Cafarchia C., et al. An improved molecular diagnostic assay for canine and feline dermatophytosis. Med Mycol. 2013;51(2):136-43
 54. Chung TH, Park GB, Lim CY, Park HM, Cho GC, Youn HY, Chae JS, Hwang CY. A rapid molecular method for diagnosing epidemic dermatophytosis in a racehorse facility. Equine vet. J. 2010; 42 (1): 73-78
 55. Montes de Oca BV, Estudio Sobre la Presencia de Gliotoxina en Aislados de *Aspergillus fumigatus* de Casos de Aspergilosis Aviar Identificados por medio de Caracterización Micológica y Biología Molecular (tesis de maestría). D.F., México. UNAM. 2015.
 56. Mendoza L. Manual de Procedimientos. Course of Molecular Mycology, Medical Technology Program. Michigan State University 2002.
 57. Psifidi A, Dovas CI, Bramis G, et al. Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. PLoS One. 2015;10(1)
 58. Gaillard C., Strauss F., Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. Nucleic Acids Research, 1990; 18 (2): 378.
 59. Iwen PC, Hinrichs SH and Rupp Me. Utilization of the Internal Transcribed Spacer Regions as Molecular Targets to Detect and Identify Human Fungal Pathogens. Med Mycol, 2007; 40 (1): 87-109
 60. Bridge P.D., Arora D.K., Reddy C.A., Elander R.P. Applications of PCR in Mycology. Cab International. UK, 1998.
 61. Bolivar AM, Rojas A, García-Lugo P. PCR Y PCR-Múltiple: Parámetros Críticos y Protocolo de Estandarización, Avances en Biomedicina, Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica, Merida-Venezuela: 2014, 3(1): 25-33.
 62. https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

63. Refai M, Heidy AE-Y, El-Hariri M. Monograph on Dermatophytes A guide for isolation and identification of dermatophytes, diseases and treatment. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, 2013.
64. <http://insilico.ehu.es/>
65. Bengtsson F.C., Olsen E.M., Brandt O.L., Bertelsen F.M., Willerslev E., Tobin J.D., Wilson S.A., Gilbert P.M.T. DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2012, 194(1), 17-25
66. Kshirsagar, S. V., B. Singh, and S. P. Fulari. "Comparative study of human and animal hair in relation with diameter and medullary index." *Indian Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 2009; 2 (3): 105-8.
67. Álvarez MMD, Mateos MJ. Estudio Forense de Pelos, [home page on the internet]. [update S/D, cited 2018 Mar. 22]. Available from: <http://cleuadistancia.cleu.edu.mx/cleu/flash/PAG/lecturas/pelosyfibras/Estudio%20Forense%20de%20pelos-.pdf>
68. Alvarez. PS, García ME, Blanco JL, Diagnóstico micológico: algo está cambiando. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26: 638-46
69. Hirai, A., Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., & Hasegawa, A. Molecular taxonomy of dermatophytes and related fungi by chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2003;83(1):11-20
70. Kim YJ, Choe YB, Ahn KJ, Lee YW. Identification of Dermatophytes Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. 2011; 23(3): 304-312.
71. Dhib, I., Fathallah, A., Yaacoub, A., Hadj Slama, F., Said, M. B., & Zemni, R. Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophyte nail infections. *Mycoses*, 2014; 57(1), 19-26
72. Rebell G., Taplin D., *Dermatophytes Their Recognition and Identification*, University of Miami Press, USA 1979.

Anexo I Reactivos y soluciones

1. Solución de lisis para cultivo

Tris HCl 50mM pH 7.2	4 ml
EDTA 50 mM	4 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%	12 ml
2-Mercaptoetanol	400 µl
Agua destilada estéril	5.6 ml

➤ Tris HCl 50mM

Tris HCL.....	7.88g
Agua destilada.....	1000 ml

Disolver el Tris HCl en el agua destilada y ajustar el pH a 7.2. Almacenar a 4°C hasta su uso.

➤ EDTA 50 mM

EDTA.....	18.61 g
Agua destilada.....	1000 ml

Disolver el EDTA en el agua destilada y ajustar el pH a 8.0

➤ Dodecil sulfato de sodio al 3%

Dodecil sulfato de sodio (SDS).....	3 g
Agua destilada.....	100 ml

➤ 2-Mercaptoetanol 1%

2-Mercaptoetanol.....	1 ml
Agua destilada.....	100 ml

➤ Acetato de sodio 3M

Acetate de sodio (NaOAc).....	246.09 g
Agua destilada.....	3000 ml

Solución TE

➤ **Tris 10 mM**

TrisMa Base.....1.2114 g

Agua destilada.....1000 ml

Disolver el TrisMa base en el agua destilada y ajustar el pH a 8.0

➤ **EDTA 1mM**

EDTA.....3.7224 g

Solución TrisMa Base 10 mM.....1000 ml

Disolver el EDTA en la Solución de TrisMa Base

2. Solución de lisis para pelo y escamas

• **25mM Tris pH8**

TrisMa base 25mM.....3.027 g

Agua destilada1000 ml

Disolver el TrisMa base en agua destilada y ajustar el pH a 8.0

• **10 mM EDTA pH 8.0**

EDTA.....3.722 g

Agua destilada.....1000 ml

Disolver en EDTA en el agua destilada y ajustar el pH a 8.0

• **2% Sarkocyl**

Sarkocyl.....2 g

Agua destilada100 ml

Disolver el sarkocyl en el agua destilada

3. Solución de acrilamida para ADN

5% de acrilamida sin bisacrilamida

40 mM de Tris-HCL

20 mM de acetato de sodio

1 mM de EDTA pH 8.0

Agregar 1/100 volúmenes de persulfato de amonio al 10% y 1/1000 volúmenes de solución TEMED y dejar polimerizar por 30 minutos.

Precipitar el pellet con 2.5 volúmenes de etanol, centrifugar y redissolver el pellet en 20 vol. de agua. Conservar en refrigeración.

4. Solución TAE 50X

TrisMa Base.....242 g
Ácido acético glacial.....57.1 ml
EDTA 0.5 mM pH 8.0.....100 ml
Esterilizar la solución y llevar a la solución de trabajo que es de 1X

5. Solución para disolver la Proteinasa K (20 mg/ ml)

▪ Tris 50 mM pH 8.0

TrisMa base6.005 g
Agua destilada1000 ml
Disolver el trisMa en el agua destilada y ajustar el pH a 8.0

▪ Acetato de calcio 50 mM

Acetato de calcio8.80 g
Agua destilada.....1000 ml
Disolver el acetato de calcio en el agua destilada y llevarlo a la solución de trabajo que es de 1.5 mM

Anexo II Fórmulas del análisis estadístico

Una vez que la prueba se ha aplicado en población determinada, se utilizan diferentes índices para evaluar la prueba que son los que se describen a continuación:

	Disease +	Disease -
Test +	VP	FP
Test -	FN	VN

Verdaderos positivos (VP): Número de casos que la prueba declara positivos y que realmente son positivos.

Falsos negativos (FN): Número de caso que la prueba declara positivos y que realmente son negativos.

Verdaderos negativos (VN): Número de caso que la prueba declara negativos y que realmente son negativos.

Falsos positivos (FP): Número de caso que la prueba declara negativos y que realmente son

1. Sensibilidad (tasa de verdaderos positivos). Proporción de casos positivos que están bien detectadas por la prueba. La definición matemática es: $\text{Sensibilidad} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$.

2. Especificidad (Tasa de verdaderos negativos). Proporción de casos negativos que son bien detectadas por la prueba. La definición matemática es: $\text{Especificidad} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$.

3. Tasa de falsos positivos (FPR): Proporción de casos negativos que la prueba detecta como positivos.

4. Falso Negativo Precio (FNR): Proporción de casos positivos que la prueba detecta como negativo. - Prevalencia: la frecuencia relativa de los acontecimientos de interés en la muestra total $(\text{VP} + \text{FN}) / N$.

5. Valor Predictivo Positivo (VPP): Proporción de casos realmente positivos entre los casos positivos detectados por la prueba.

$\text{PPV} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FP})$, o $\text{PPV} = \text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia} / [(\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia} + (1 - \text{Especificidad}) (1 - \text{Prevalencia})]$. Es un valor que depende de la prevalencia, un índice que es independiente a la calidad de la prueba.

6. Valor predictivo negativo (VPN): Proporción de casos realmente negativos entre los casos negativos detectados por la prueba.

$VPN = VN / (VN + FN)$, o $VPP = \text{Especificidad} \times (1 - \text{Prevalencia}) / [(\text{Especificidad} (1 - \text{Prevalencia}) + (1 - \text{sensibilidad}) \times \text{Prevalencia})]$. Este índice depende también de la prevalencia que es independiente a la calidad de la prueba.

7. Razón de verosimilitud positiva (LR+): Esta relación indica hasta qué punto un individuo tiene más posibilidades de ser positivo, cuando en realidad la prueba es la que está diciendo es positivo.

$LR + = \text{sensibilidad} / (1 - \text{especificidad})$. La $RP +$ es un valor positivo o nulo.

8. Razón de verosimilitud Negativa (LR-): Esta relación indica hasta qué punto un individuo tiene más posibilidades de ser negativo, en realidad, cuando la prueba es la que está indicando es positivo.

$LR - = (1 - \text{sensibilidad}) / (\text{especificidad})$. El $LR -$ es un valor positivo o nulo.

9. Odds ratio: El odds ratio indica la probabilidad de un individuo de que más probable que sea positivo si el resultado es positivo, en comparación con los casos en que la prueba es negativa. Por ejemplo, un odds ratio de 2 significa que la probabilidad de que el caso positivo se produce es dos veces superior si la prueba es positiva que si es negativo.

El odds ratio es un valor positivo o nulo. Tenemos $\text{Odds ratio} = VP \times VN / (FP \times FN)$.

10. El riesgo relativo: El riesgo relativo mide el comportamiento de la prueba cuando se trata de un informe positivo que cuando es negativo. Por ejemplo, un riesgo relativo de 2 significa que la prueba es dos veces más potente cuando es positiva que cuando es negativo. Un valor cercano a 1 corresponde a un caso de independencia entre las filas y columnas, y una prueba de que funciona tan bien cuando es positiva que cuando es negativo.

El riesgo relativo es un valor nulo o un valor positivo dado por: $\text{riesgo relativo} = VP / (VP + FP) / (FN / (FN + VN))$.