



---

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Identificación feno y genotípica de aislados clínicos de dermatofitos  
procedentes de Guatemala

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

Presenta

Angélica Pérez Rodríguez

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: ABEL GUTIERREZ RAMOS**

**VOCAL: Profesor: JAVIER ANDRES JUAREZ DIAZ**

**SECRETARIO: Profesor: MARIA DEL ROCIO REYES MONTES**

**1er. SUPLENTE Profesor: GABRIELA LOPEZ HERRERA**

**2do. SUPLENTE Profesor: VERONICA GARROCHO VILLEGAS**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIDAD DE MICOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA. UNAM.**

**DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES  
ASESOR DEL TEMA**

**DR. ERICK OBED MARTÍNEZ HERRERA  
SUPERVISOR TÉCNICO**

**PÉREZ RODRÍGUEZ ANGÉLICA  
SUSTENTANTE**

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	10
HIPÓTESIS .....	14
OBJETIVO GENERAL .....	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
Muestras clínicas.....	15
Caracterización fenotípica .....	15
Aislamiento de dermatofitos .....	15
Obtención de cultivos monospóricos .....	16
Macromorfología.....	16
Micromorfología .....	17
Tamaño de conidios .....	18
Caracterización genotípica .....	18
Extracción de DNA genómico.....	18
Amplificación del gen de la $\beta$ -tubulina ( <i>BT2</i> ) .....	20
Curva de DNA. ....	21
Secuenciación de los fragmentos amplificados .....	21
Edición de las secuencias .....	22
Análisis filogenético.....	22

RESULTADOS .....	23
Caracterización fenotípica .....	23
Aislamiento e identificación de dermatofitos .....	23
Obtención de cultivos monospóricos .....	25
Macromorfología.....	25
Micromorfología .....	35
Tamaño de conidios. ....	38
Caracterización genotípica .....	40
Extracción de DNA genómico.....	40
Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR. ....	43
Amplificación de un fragmento del gen de la $\beta$ -tubulina ( <i>BT2</i> ) .....	43
Identidad de las secuencias de los dermatofitos aislados procedentes de Guatemala.....	44
Selección de modelo evolutivo. ....	46
Análisis filogenético. ....	46
DISCUSIÓN .....	50
CONCLUSIONES.....	56
PERSPECTIVAS.....	56
REFERENCIAS.....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Identificación de dermatofitos por la técnica de Rush Munro. ....	23
Tabla 2. Tamaño de conidios (identificación fenotípica).....	39
Tabla 3. Tamaño de conidios (identificación genotípica).....	40
Tabla 4. Cuantificación de gDNA por espectrofotometría. ....	41
Tabla 5. Identidad de las secuencias de los dermatofitos procedentes de Guatemala.....	44
Tabla 6. Reubicación de los aislados por el análisis filogenético. ....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie <i>T. mentagrophytes</i> .....	28
Figura 2. Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie de <i>T. rubrum</i> .....	30
Figura 3. Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie de <i>M. gypseum</i> .....	32
Figura 4. Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie de <i>M. canis</i> .....	33
Figura 5. Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie de <i>M. nanum</i> . ....	34
Figura 6. Ejemplos de la morfología microscópica de las especies de dermatofitos de los aislados clínicos procedente de Guatemala. ....	38
Figura 7. Cuantificación del gDNA en aislados de dermatofitos procedentes de Guatemala.....	42
Figura 8. Amplificación por PCR del fragmento del gen de la $\beta$ -tubulina. ....	44
Figura 9. Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud....	49

## RESUMEN

Los dermatofitos son hongos que tienen habilidad para degradar la queratina de pelo, uñas y plumas y pueden producir infecciones superficiales (dermatofitosis) en mamíferos, incluidos los humanos. Además, pueden penetrar en los tejidos más profundos en huéspedes inmunocomprometidos. Los dermatofitos pertenecen, principalmente, a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* (en su estado anamórfico) y *Arthroderma* y *Nannizzia* (en su estado teleomórfico), dentro de los cuales se incluyen cerca de 40 especies conocidas como posibles agentes patógenos para los seres humanos y otros mamíferos. La enfermedad causada por estos hongos se denomina dermatofitosis y es común en todo el mundo. Con base en su ecología, los dermatofitos se han dividido en tres grupos: antropofílicos, zoofílicos y geofílicos. La identificación de un dermatofito a nivel de especie es terapéuticamente significativa, ya que las especies de dermatofitos tienen diferente susceptibilidad a los antifúngicos. Además, también es importante desde el punto de vista tanto epidemiológico como ecológico.

Durante la última década, se han realizado progresos en la sistemática moderna de los dermatofitos; sin embargo, aún existen problemas en su caracterización, lo que es de gran relevancia para el análisis filogenético e identidad taxonómica, así como para la práctica clínica y epidemiología. Por lo tanto la identificación a nivel de especie de los dermatofitos es muy importante, ya que permitirá controlar las

fuentes potenciales de infección, elección de una terapia antifúngica adecuada y prevención de la transmisión.

**Objetivo.** Identificar las especies de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* en aislados clínicos procedentes de Guatemala, a través de métodos fenotípicos y genotípicos.

**Materiales y Métodos.** Se estudiaron 61 aislados de dermatofitos, correspondientes a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, procedentes de Guatemala. Se caracterizaron por métodos fenotípicos (macro y micromorfología, tamaño de conidios) y genotípico (PCR del gen de la  $\beta$ -tubulina (*BT2*)). Las especies se identificaron por el análisis filogenético de Máxima Verosimilitud.

**Resultados.** En la caracterización fenotípica (macro y micromorfología), se identificaron las siguientes especies: *T. mentagrophytes* (25 casos, 40.98%), *M. gypseum* (20 casos, 32.79%), *M. canis* (9 casos, 14.75%), *T. rubrum* (4 casos, 6.56%) y *M. nanum* (3 casos, 4.92%). El tamaño de conidios de las especies identificadas fue muy variable, en la mayoría de los casos, no correspondieron con los reportados en la literatura (Kwon-Chung y Bennett, 1992). La caracterización genotípica permitió reubicar a la mayoría de las especies de la siguiente manera: *T. interdigitale* (26 casos, 42.62%), *A. incurvatum* (13 casos, 21.31%), *A. otae* y *M. gypseum* (9 casos, 14.75%, cada uno), *A. obtusum* (3 casos, 4.91%) y *T. rubrum* (1 caso, 1.64%).

Estos resultados destacan la importancia de los métodos tanto convencionales como genotípicos para la identificación certera de las especies de dermatofitos, ya



que una incorrecta identificación puede afectar directamente en el tratamiento para el paciente y además para esclarecer la clasificación taxonómica de los dermatofitos.

## INTRODUCCIÓN

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos estrechamente relacionados, tienen la habilidad de digerir y de crecer en estructuras queratinizadas del huésped, como lo son la piel, las uñas y el pelo (Ahmadi *et al.*, 2016; Weitzman y Summerbell, 1995). Generalmente, estos hongos causan infecciones superficiales en huéspedes inmunocompetentes, denominadas dermatofitosis o *tineas*; sin embargo, en huéspedes inmunocomprometidos pueden ocasionar una infección grave y diseminada (Rezaei-Matehkolaei *et al.*, 2014).

Estos hongos pertenecen, principalmente, a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* en su estado anamórfico y, en su estado teleomórfico, a los géneros *Arthroderma* y *Nannizzia* (Hirai *et al.*, 2003). Sin embargo, la nueva taxonomía propuesta por de Hoog *et al.* (2017), integra a tres nuevos géneros: *Lophophyton*, *Paraphyton* y *Ctenomyces*. Los dermatofitos se clasifican en tres grupos de acuerdo a su hábitat: antropofílicos, zoofílicos y geofílicos (Rezaei-Matehkolaei *et al.*, 2014); las especies antropofílicas están principalmente asociadas con humanos y rara vez infectan a otros animales; las zoofílicas están asociadas con animales, pero frecuentemente infectan también a los humanos; y las geofílicas están fundamentalmente asociadas con material que

contiene queratina, como cuernos y plumas, que se encuentran en el ambiente y los hongos que ahí crecen, pueden transmitirse a los humanos y a los animales por contacto con el suelo (Kanbe, 2008).

## **MARCO TEÓRICO**

El concepto filogenético de especie ha revolucionado de manera importante la taxonomía de los dermatofitos (Ahmadi *et al.*, 2015). La introducción de este concepto ha originado reclasificaciones taxonómicas continuas y ha permitido identificar especies que hasta hace unos años sólo podían clasificarse a nivel de género.

Para distinguir entre las especies de dermatofitos, anteriormente se utilizaban las características morfológicas, tales como la macromorfología, la pigmentación de colonias, el tamaño y la forma de microconidios y/o macroconidios, la tasa de crecimiento, así como varias propiedades fisiológicas, como la producción de ureasa, ensayos *in vitro* para la perforación del pelo (Padhye *et al.*, 1980), crecimiento en arroz, producción alcalina en medio púrpura de bromocresol (Summerbell *et al.*, 1988), asimilación de sorbitol (Rezusta *et al.*, 1991), requerimiento de ciertas vitaminas o aminoácidos del microorganismo, además de algunas pruebas bioquímicas (Rebell y Taplin, 1978). Estos marcadores tienen la desventaja de que son limitados en número (las características a medir no son infinitas), se deben medir en cierta etapa del crecimiento, además, los microorganismos tienden a ser variables en su apariencia y algunos se someten a cambios degenerativos e irreversibles asociados con pleomorfismo, lo cual puede

ocurrir poco después del aislamiento o en repetidos cultivos. Las colonias se vuelven blancas y mullidas y pierden la habilidad de esporular. Asimismo, los medios y otras condiciones de crecimiento pueden afectar la morfología macroscópica y microscópica de los dermatofitos y ser influenciados por el ambiente. Así, los criterios utilizados podrían carecer, en algunos casos, de definición y objetividad. Por otro lado, los métodos quimiotaxonómicos, como electroforesis del filtrado de proteínas de cultivo, cromatografía gas-líquido pirolisis para estudiar ácidos grasos, electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente de extractos de proteínas totales para patrones de zimogramas, isoelectroenfoque de extractos somáticos en geles de poliacrilamida de capa delgada y MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-Of-Flight), han sido desarrollados como una alternativa para la identificación microscópica tradicional en aislados de dermatofitos, pero a menudo son inaccesibles para los laboratorios convencionales (Nenoff *et al.*, 2013).

En los últimos años, se han desarrollado métodos moleculares que poseen una alta precisión, sensibilidad y especificidad para clasificar a los dermatofitos (Assis-Santos *et al.*, 2010; Behzadi *et al.*, 2014). El desarrollo de los marcadores moleculares es útil y elimina tanto los inconvenientes de una selección con base en el análisis exclusivo del fenotipo como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva. Los marcadores moleculares pueden detectar diferentes polimorfismos, ya sea en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante. Se han utilizado diversas técnicas moleculares aplicadas a la taxonomía de los dermatofitos, como son: RFLP (Restriction

Fragment Length Polymorphisms) del DNA mitocondrial, PCR (Polymerase Chain Reaction) fingerprinting, REA (Restriction Enzyme Analysis) mediante la PCR, RAPD (Random Amplified Polymorphic-DNA), AP-PCR (Arbitrary Primer-PCR), SSR (Simple Sequence Repeats) o microsatélites, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), ISSR-PCR (Inter Single Sequence Repeat-PCR) y la secuenciación de genes codificantes de proteínas y regiones no codificantes ITS del DNA ribosomal (rDNA), la quitina sintasa-1 (*CHS-1*), topoisomerasa II (*TOP-II*), así como la subunidad pequeña ribosomal (18S rRNA) y la subunidad grande (28S rRNA) del rRNA,  $\beta$ -tubulina (*BT2*) (Faggi *et al.*, 2001).

La utilización de estos marcadores ha sido una herramienta importante para llevar a cabo numerosos estudios de epidemiología molecular de los dermatofitos para resolver la taxonomía de estos hongos. Nishio *et al.* (1992), utilizaron el análisis del mtDNA para definir la relación filogenética del género *Trichophyton* independientemente del fenotipo. El estudio mostró que los aislados de *T. rubrum* se dividieron en dos grupos (Tipo I y Tipo II) y se sugirió que el género forma un complejo de especies. *A. benhamiae* fue relacionado estrechamente con *T. mentagrophytes. var. erinacei*. Mientras que, *T. rubrum* de Tipo II, *T. tonsurans* y *A. vanbreuseghemii* mostraron un perfil de restricción similar y se sugirió que eran idénticos. Asimismo, *T. quinckeanum* y *T. schoenlenii* también mostraron un perfil de restricción idéntico, pero ligeramente diferente al de *A. vanbreuseghemii*. Además, estos resultados coinciden con lo reportado por de Bièvre *et al.* (1987).

Por otro lado, el método de RAPD, ha permitido la diferenciación de varias especies antropofílicas, por ejemplo, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. rubrum* y *E. floccosum*, por lo que se sugiere que este método puede ser útil para la identificación de estas especies. Además, este método permite identificar polimorfismos mínimos intraespecie en aislados de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (Mochinzuki *et al.*, 1997).

Adicionalmente, se ha utilizado la técnica de PCR fingerprinting, con base en oligonucleótidos no específicos como (AC)<sub>10</sub>, (GTG)<sub>5</sub>, M13 y AP3, para agrupar especies de dermatofitos e identificar variabilidad intraespecífica dentro de los complejos. En un estudio elaborado por Gräser *et al.* (1998), se logró distinguir a partir de los perfiles de bandas de la PCR fingerprinting, a *T. tonsurans* de *T. mentagrophytes* var. *granulosum*, además distinguieron a *T. mentagrophytes* var. *granulosum* de *T. erinacei*, *T. quinckeanum* de *T. mentagrophytes*, las cuales son intraespecies del complejo *T. mentagrophytes*; sin embargo, este método no fue útil para distinguir las intraespecies del complejo *T. tonsurans*. La combinación de los métodos AFLP y PCR fingerprinting, también se ha usado para la identificación de las especies y para la detección de las variaciones genómicas dentro y entre los complejos, en donde se ha logrado distinguir a *T. erinacei* de *A. benhamiae* y de la variedad típica de *T. mentagrophytes*. También ha permitido distinguir a *A. vanbreuseghemii* de *T. mentagrophytes*, todas estas interespecies, pertenecientes al complejo *T. mentagrophytes*, mientras que en el complejo *T. rubrum* solo se

podieron distinguir las interespecies *T. rubrum* y *T. violaceum* (Gräser *et al.*, 1999, 2000).

Por otro lado, los marcadores microsatélites han sido útiles en la identificación intraspecies de dermatofitos, así como en la asociación especie-origen geográfico (Gräser *et al.*, 2007; Kaszubiak *et al.*, 2004; Ohst *et al.*, 2004; Pasquetti *et al.*, 2013). Ohst *et al.* (2004), desarrollaron un marcador microsatélite (T1) y comprobaron que este marcador contiene una repetición (GT)<sub>8-10</sub>, que identifica específicamente a *T. violaceum*, separándola de *T. rubrum*, lo que apoya su estrecho parentesco, además agrupó los aislados de *T. soudanense* y *T. gourvillii* con *T. rubrum* y no con *T. violaceum*, de acuerdo con datos de secuencias ITS. El trabajo realizado por Gräser *et al.* (2007), quienes utilizaron el microsatélite T1 y seis marcadores microsatélites adicionales, reconocieron 55 genotipos multilocus en 200 aislados identificados como *T. rubrum*, que permitió una subdivisión de la especie en dos poblaciones: los aislados de la población 1, provenían de diferentes partes del mundo (excepto de África), y las manifestaciones clínicas asociadas a estos aislados fueron *tinea pedis* y onicomycosis; mientras que los aislados de la población 2, eran de origen africano y las manifestaciones clínicas asociadas a estos fueron *tinea capitis* y *tinea corporis*. Este hallazgo sugiere que los genotipos están asociados con el sitio corporal del huésped humano (cuero cabelludo o pie) y con el origen geográfico.

Actualmente, la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS) del rDNA, se utiliza como estándar de oro para el análisis filogenético, éste ha sido muy útil para la identificación y la taxonomía de las especies de dermatofitos, debido a que se han observado pequeñas diferencias de nucleótidos entre estas, especialmente dentro del género *Trichophyton*. (Ahmadi *et al.*, 2016; Mirhendi *et al.*, 2015). En un estudio realizado por Makimura *et al.* (1998), se identificaron exitosamente las especies del complejo *T. mentagrophytes*, y demostraron su relación filogenética a través del análisis de secuencias ITS1, y evidenciaron 3 grupos homólogos; grupo 1, con las especies *A. vanbreuseghemii* y *T. mentagrophytes*; grupo 2, integrado por *A. simii*, agrupamiento respaldado también por la habilidad de apareamiento, por lo que se demostró que era una especie única; finalmente, el grupo 3 agrupó a las especies *A. benhamiae*, *T. erinacei* y un aislado de *T. mentagrophytes* (zoofilico).

A pesar de las diversas ventajas que tiene la región ITS y que se considera como el marcador genético primario para la identificación de dermatofitos, es necesario utilizar nuevos marcadores moleculares que permitan analizar las secuencias y los conceptos tradicionales de las especies, para identificar correctamente las especies e intraespecies de los dermatofitos. Además, los resultados también podrían ser útiles para el diagnóstico, a través de una identificación certera de los dermatofitos en entornos clínicos y epidemiológicos (Ahmadi *et al.*, 2016; Mirhendi *et al.*, 2015).

La  $\beta$ -tubulina (*BT2*) es una proteína globular monomérica implicada en la generación de microfilamentos; se ha utilizado con éxito para la diferenciación de especies en otros grupos de hongos, tales como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Scedosporium*, y *Phaeoacremonium* (Balajee *et al.*, 2009; Gilgado *et al.*, 2005; Mostert *et al.*, 2005; Serra y Peterson, 2007). Este locus incluye algunos intrones, que son buenos estimadores para la identificación de especies estrechamente relacionadas. En un estudio realizado por Rezaei-Matehkolaei *et al.* (2014), se utilizó el marcador *BT2* y la región ITS con el fin de evaluar la variación intra e interespecífica de 26 aislados de dermatofitos, incluidos en los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. El dendrograma obtenido con las secuencias del gen *BT2*, presentó una topología similar a la construida con secuencias ITS; sin embargo, mostró mejor resolución el árbol construido con el gen *BT2*.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En Guatemala, las dermatofitosis eran popularmente conocidas como *jjote*, *rasquiña*, *sarna* o *tineas*. Cabe mencionar que actualmente este último término se sigue ocupando para hacer referencia a estas infecciones. En un estudio que llevó a cabo Caceres *et al.* (1991), encontraron que las especies más comúnmente aisladas en el humano son: *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *algonosa*, *T. mentagrophytes* var. *granulare* y *T. rubrum*. Martínez *et al.* (2009), establecieron la epidemiología de la *tinea capitis*, diagnosticada por parasitación pilosa y/o cultivo, en el Instituto de Dermatología y



Cirugía de Piel “Prof. Dr. Fernando A. Cordero C”, en la ciudad de Guatemala. Los autores llevaron a cabo un estudio retrospectivo de 121 casos de pacientes con sospecha clínica de *tinea capitis* que asistieron al Instituto de 2005 a 2007. De los 121 casos, 60 resultaron positivos a *tinea capitis*, 53 de los cuales (88.3%) revelaron cultivo positivo y 56 (93.3%) parasitación pilosa; la forma *ectoendothrix* se observó en 15 casos (25%). El género más afectado fue el femenino, con 34 casos (56.7%). La evolución promedio de la enfermedad fue de 4.6 meses, y la variedad clínica más común fue la seca (38 casos, 63.3%), además los agentes más frecuentes fueron *M. canis* con un 69.8%, seguido de *T. rubrum* con 13.1%. Asimismo, Martínez *et al.* (2012), analizaron 2418 casos en Guatemala, en un periodo comprendido de mayo de 2008 a junio de 2009 y la distribución de las especies aisladas fue la siguiente: *T. rubrum* (85.0%), *M. canis* (7.0%), *T. mentagrophytes* (5.92%), *E. floccosum* (1.0%) y *M. audouinii* (0.08%). El cuadro clínico con mayor frecuencia fue onicomycosis con 57.85%, seguido de otras dermatofitosis con 42.15%. Además, evaluaron la frecuencia de dermatofitos por edades y se observó que el intervalo de edad más afectado fue entre los 30 y 39 años (22.7%). Por último, observaron que las mujeres fueron las que en su mayoría, acudieron por consulta relacionada a dermatofitosis (63.0%) seguida por los hombres (37.0%).

Martínez *et al.* (2013a), estudiaron el caso de una paciente de 35 años de edad proveniente del área rural de Guatemala, con onicomycosis distrófica total de cinco años de evolución. En el examen directo observaron hifas y arthroconidios, y en el

cultivo en agar Sabouraud con antibióticos se identificó *M. nanum*. El tratamiento instaurado fue itraconazol en pulsos durante tres meses, que produjo la curación clínica y micológica.

Adicionalmente, Martínez *et al.* (2013b), analizaron 4220 casos de muestras provenientes de onicomycosis que fueron identificadas en un periodo de 41 meses (mayo de 2008 a septiembre de 2011), hallaron que la mayoría de los casos tuvieron como agente etiológico a *T. rubrum*, mientras que 18 de estos casos fueron provocados por especies del género *Microsporum*, representando un 0.43% del total del número de casos de onicomycosis. Diez de los 18 casos fueron atribuidos a *M. canis* (0.24%), siete a *M. gypseum* (0.17%) y uno a *M. nanum* (0.024%). No hubo diferencias significativas en la distribución por sexo, por lo que *M. canis* afectó tanto a hombres como a mujeres, al igual que *M. gypseum*, sin embargo, *M. nanum* solo afectó a una mujer. Diecisiete casos eran pacientes adultos y uno fue de un niño. *M. canis* afectó a personas con edades de 8 a 74 años; *M. gypseum*, de 18-61 años y *M. nanum* sólo afectó a una persona de 35 años de edad. Todos los pacientes tenían onicomycosis en la uña del dedo del pie. El cuadro clínico más común fue subungueal distal y lateral (OSDL), seguido de onicomycosis distrófica total (ODT) y onicomycosis blanca superficial (OBS). *M. gypseum* causó en su mayoría OSDL, mientras que en *M. canis* había distintos cuadros clínicos y *M. nanum* causó ODT.

Estos antecedentes muestran que la identificación de las especies de dermatofitos, en la mayoría de los laboratorios de Guatemala, se realiza principalmente a través de una combinación de métodos macroscópicos (descripción de la morfología de colonias y cultivo *in vitro*) y microscópicos (descripción de estructuras conidiales, tamaño de conidios) (de Hoog *et al.*, 2000), a lo que se agrega la realización de pruebas fisiológicas para los aislamientos atípicos; sin embargo, la identificación a menudo es complicada y laboriosa debido a la similitud morfológica y el pleomorfismo que estos presentan, además de que se requiere mucho tiempo (Kanbe, 2008; Weitzman y Summerbell, 1995), por lo que estos análisis fenotípicos muchas veces no son suficientes para una correcta identificación y clasificación taxonómica, por ello se recurre a las técnicas moleculares con el fin de obtener una clasificación más clara de los dermatofitos, ya que la identificación a nivel de especie es importante, puesto que la profilaxis y el tratamiento pueden variar dependiendo de la especie involucrada (Cafarchia *et al.*, 2013). Debido a estos inconvenientes, y a las dificultades que presenta la taxonomía de estos hongos, en este trabajo se identificaron aislados clínicos de dermatofitos procedentes de Guatemala, utilizando métodos fenotípicos (macro y micromorfología, tamaño de conidios) y un método genotípico (PCR del gen de la  $\beta$ -tubulina).

## **HIPÓTESIS**

Los aislados clínicos de dermatofitos procedentes de Guatemala se ubicarán correctamente en las especies correspondientes a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* a través de métodos fenotípicos y genotípicos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar las especies de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* en aislados clínicos procedentes de Guatemala a partir de métodos fenotípicos y genotípicos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Identificar por métodos fenotípicos (macro y micromorfología, tamaño de conidios) las especies de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* de aislados clínicos procedentes de Guatemala.
2. Amplificar por PCR, el gen *BT2*, de todos los aislados clínicos procedentes de Guatemala incluidos en el estudio y obtener su secuencia.
3. Comparar las secuencias obtenidas de los dermatofitos estudiados con todas las secuencias de nucleótidos pertenecientes a hongos, para confirmar la identidad de la secuencia.
4. Construir una filogenia a partir de las secuencias problema y las de referencia, para identificar y ubicar correctamente las especies de los aislados clínicos dentro de los complejos de dermatofitos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Muestras clínicas.** Se utilizaron 61 muestras biológicas con cuadro clínico compatible con dermatofitosis, procedentes del Instituto de Dermatología y Cirugía de Piel “Prof. Dr. Fernando A. Cordero C.” de la Ciudad de Guatemala, Guatemala.

### **Caracterización fenotípica**

**Aislamiento de dermatofitos.** Las muestras de los dermatofitos procedentes de Guatemala, se sembraron en agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (peptona de soya al 27.82%, dextrosa al 27.82%, agar al 43.11%, cicloheximida al 1.11%, cloranfenicol al 0.14%) (Bioxon, Becton Dickinson, México, MX) y se incubaron a 28 °C por 2 semanas, o hasta que se observó crecimiento de hongos filamentosos. Estos hongos inicialmente se observaron por la técnica de Rush-Munro, la cual consiste en recortar un cuadro pequeño de cinta adhesiva transparente y colocarlo, con la ayuda de pinzas estériles, sobre la muestra del hongo de interés por el lado del adhesivo. Posteriormente, se coloca sobre un portaobjetos al cual se le añadió previamente una gota de azul de algodón. La preparación se observó en un microscopio óptico con los objetivos 10x y 40x con la finalidad de identificar estructuras características de los dermatofitos. Los hongos identificados presuntivamente como dermatofitos se aislaron y se sembraron en agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) e incubados a 28 °C por 8-10 días para realizar el cultivo monospórico.

**Obtención de cultivos monospóricos.** Se basó en la metodología descrita por Frías De León *et al.* (2011), la cual consiste en utilizar los primoaislamientos de las muestras de dermatofitos, mismos que se sembraron en medio agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y se incubaron durante 8-10 días a 28 °C. Posteriormente, se realizó una suspensión de conidios agregando 1 mL de Tween-80 al 0.05% a cada tubo de cultivo y se ajustó la cantidad de conidios a una concentración de 50 a 100 conidios/mL, utilizando una cámara de Neubauer (BRAND, Wertheim, DE). Para obtener el número de conidios/mL se utilizó la siguiente ecuación:  $(A \times 10,000)/B = N$  (A= número de células; B= número de cuadrados de la cámara y N= número de conidios por mL).

Una vez ajustada la concentración de conidios, se sembraron 25 µL en una caja de Petri con medio agar papa dextrosa (APD) (almidón de papa 10.26%, dextrosa 51.28%, agar 38.46%) (Bioxon, Becton Dickinson, México, MX). El inóculo se dispersó en la placa con una varilla de vidrio estéril, las cajas se incubaron a 28 °C haciendo observaciones a las 24 y 48 h, con finalidad de obtener colonias separadas, jóvenes y sin esporular. Una vez que las colonias crecieron, se eligió una y se sembró en una caja con agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y APD (Bioxon) y se incubó a 28 °C hasta observar una esporulación abundante.

**Macromorfología.** La macromorfología se realizó de acuerdo con lo reportado por Frías De León *et al.* (2011). Los aislados se sembraron en cajas de Petri con APD

(Bioxon) y agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y se incubaron a 28 °C durante 4-8 días. Posteriormente, se observaron las características morfológicas de las colonias de cada cultivo, tales como el color, el aspecto de la superficie, la pigmentación de la colonia. Para el registro de los aislados se tomaron fotografías con una cámara digital (SONY Cyber-shot 8.1 mega pixeles, México, MX).

**Micromorfología.** Las características micromorfológicas de los dermatofitos se analizaron mediante la técnica de microcultivo de Ridell (1950), que consiste en cortar asépticamente cubos de 1.0 cm<sup>2</sup> de agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y medio APD (Bioxon). Se colocó un cubo de cada medio de cultivo sobre un portaobjetos estéril que previamente se colocó en una caja de Petri de vidrio y se inoculó por los cuatro lados del medio de cultivo con el aislado correspondiente. Posteriormente, sobre cada cubo, se colocó un cubreobjetos estéril, para evitar la deshidratación del agar durante la incubación, se colocó un algodón humedecido con agua estéril dentro de la caja de Petri y se incubó a 28 °C por 4-8 días. Posteriormente, se separó cuidadosamente el cubreobjetos del agar y se depositó sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se observó al microscopio (Olympus América Inc., Melville, NY, USA), con el fin de analizar las características morfológicas de los conidios (tamaño y forma). El registro de las características microscópicas de los aislados se realizó con una cámara digital (SONY).

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

### **Caracterización genotípica**

**Extracción de DNA genómico.** A partir de cada cultivo monospórico del dermatofito sembrado en APD (Bioxon) o Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), se inoculó el hongo en 50 mL de medio líquido YEPD (dextrosa al 66.66%, extracto de levadura al 66.66%, peptona de caseína al 16.67%) y se incubó a 37 °C en agitación por 2 días o hasta observar crecimiento micelial. Se recolectó individualmente la biomasa micelial de cada aislado por filtración (con filtros swinex) utilizando papel Whatman No. 1 (Merck, New York, USA) estéril. En seguida, se lavó el micelio con agua Milli Q estéril y se secó con papel filtro estéril. Se tomaron 100 mg de masa micelial húmeda y se depositaron en microtubos de 1.5 mL con 0.2 g de perlas de vidrio previamente estériles (400 a 455 µm de diámetro lavadas previamente con ácido clorhídrico) y se adicionó el amortiguador de extracción AP1 del Kit DNeasy Plant Mini Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, DE). Los tubos se colocaron en un equipo FastPrep (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA) y se realizaron pruebas para definir la velocidad y tiempos óptimos de agitación para obtener la mayor cantidad de masa fúngica rota. El método que se utilizó para el rompimiento de la pared del micelio del hongo fue el



propuesto por Williams *et al.* (2001). El ensayo se inició con las siguientes condiciones: 3 periodos de 40 s a 6 m/s con 5 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Se analizaron las suspensiones de micelio resultantes bajo el microscopio (Olympus), para determinar el tiempo y velocidad óptima con la que se obtiene el mayor porcentaje de micelio roto y su contenido liberado dentro de la suspensión. Posteriormente, se modificaron las condiciones a 4 periodos de 40 s a 6 m/s con 5 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Después de que se rompió el micelio, se adicionaron 4  $\mu\text{L}$  de RNAsa-A a 100 mg/mL, se agitó vigorosamente y se incubó la mezcla por 10 min a 65 °C, mezclando 2 o 3 veces por inversión. Posteriormente, la extracción del DNA se llevó a cabo con el Kit DNeasy Plant Mini Qiagen (Qiagen), de la siguiente manera: se adicionaron 130  $\mu\text{L}$  del amortiguador AP2 y se incubaron por 5 min en hielo, se centrifugaron durante 5 min a 372 g. Se transfirió el volumen total del sobrenadante a la columna lila QIAshredder mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL para centrifugarse a 427 g por 1 min. La fracción no unida se transfirió a un nuevo tubo y se le adicionó 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E y se mezcló rápidamente con ayuda de una micropipeta. Se transfirieron 650  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior a la columna DNeasy mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó 1 min a 427 g desechando el sobrenadante obtenido, se repitió este paso hasta acabar el volumen. Posteriormente, se cambió el tubo colector, y se realizaron dos lavados con 500  $\mu\text{L}$  del amortiguador AW, el primero se centrifugó por 1 min a 427 g y el segundo por 2 min a 427 g. Por último, la columna se colocó en un microtubo nuevo de 1.5 mL, adicionándole a la membrana 100  $\mu\text{L}$  de agua Milli Q,

se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 427 g para eluir la muestra. La concentración del DNA se determinó comparando los DNA problema con diferentes concentraciones del fago  $\lambda$  (GIBCO, Brooklyn, USA) de 10, 30 y 50 ng/ $\mu$ L, por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% teñido con GelRed™ (10,000 X, Biotium Inc., Hayward, USA) aplicando una corriente de 100 V por aproximadamente 60 min, finalmente se observó el gel en un fotodocumentador GelDoc™XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). También se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría, considerando el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. La pureza de las muestras se evaluó a través de la relación  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ , utilizando el espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Wilmington, DE, USA). El DNA purificado de cada muestra se ajustó a una concentración final de 15 ng/ $\mu$ L para su posterior utilización.

**Amplificación del gen de la  $\beta$ -tubulina (*BT2*).** Para la amplificación por PCR del fragmento del gen *BT2* se utilizaron los oligonucleótidos T1-F (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') y Bt2b-R (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Sigma-Aldrich, Corp., USA) que amplifican un fragmento de aproximadamente 750 pb, reportado previamente por O'Donnell y Cigelnik (1997) y Glass y Donaldson (1995). Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo de acuerdo a lo reportado por O'Donnell y Cigelnik (1997) en un volumen final de 25  $\mu$ L. Se utilizaron: 2.0 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTP (Applied Biosystems Inc. Foster, CA, USA), 1.0 U de *Taq*

polimerasa (Applied Biosystems Inc.) y 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido en amortiguador de reacción 1X, además se emplearon 2.0  $\mu$ L de DNA genómico (gDNA) como molde. La amplificación se realizó en un termociclador MJ Mini™ Thermal Cycler (BioRad, Hércules, CA, USA) con el siguiente programa de amplificación: un ciclo a 96 °C por 6 min; 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min y 72 °C por 45 s y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ (0.5  $\mu$ g/ 100 mL). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V durante por 60 min en amortiguador TBE 0.5X (TrisBase 62.66%, ácido bórico al 31.90%, EDTA al 5.44%). El estándar de tamaño molecular que se empleó fue 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, CA, USA). Se utilizó como testigo la mezcla de reacción de PCR sin DNA. Las imágenes de los geles se capturaron en un MultiDoc-It™ Imaging System (Upland, CA, USA).

**Curva de DNA.** Se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de DNA (10, 15, 20 y 25 ng/ 2  $\mu$ L), para amplificar el fragmento del gen *BT2*. La PCR se realizó bajo las condiciones de amplificación antes mencionadas.

**Secuenciación de los fragmentos amplificados.** Los productos de PCR obtenidos (aproximadamente 750 pb) de los 61 aislados de dermatofitos, se enviaron a secuenciar en ambos sentidos (Macrogen Inc. Seoul, KO).

**Edición de las secuencias.** Las secuencias de los aislados se editaron con el programa BioEdit ver. 7.2.5. (Hall, 1999). Inicialmente, se revisó cada una de las secuencias para buscar la presencia de bases no definidas, éstas fueron comparadas con el electroferograma respectivo y se corrigieron las bases, editando la secuencia manualmente. Posteriormente, se analizaron las secuencias con el algoritmo Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)) para verificar la similitud (grado de coincidencia entre dos secuencias), la identidad (cobertura entre dos secuencias), y “e-valor”(que indica si el alineamiento es verdadero o producto del azar). Si “e-valor” es cercano a cero, nos indica que el alineamiento es verdadero.

**Análisis filogenético.** Las secuencias obtenidas se analizaron mediante una relación filogenética, en donde se incluyeron secuencias de referencia correspondientes a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Arthroderma* y *Nannizzia* obtenidas en el GenBank. Se realizó el alineamiento múltiple de todas las secuencias utilizando el programa MEGA 7. Por otro lado, para obtener el mejor modelo evolutivo, se utilizó el programa JModeltest, considerando los siguientes parámetros: criterio de información AKAIKE (AIC), criterio de información bayesiano (BIC), criterio de información de verosimilitud (-lnL) y teoría de decisiones (DT), que posteriormente se utilizó para llevar a cabo el análisis filogenético.

Se construyó un árbol filogenético, utilizando el método estadístico de Máxima Verosimilitud, el cual consiste en una búsqueda heurística, bajo los criterios de verosimilitud con 100 repeticiones de secuencias de adición aleatoria y el algoritmo de intercambio de ramas en el árbol por bisección-reconexión (TBR). Además, se empleó un análisis de bootstrap para estimar el apoyo de las ramas en el árbol construido, en donde se realizaron 1,000 réplicas. El análisis se llevó a cabo con el programa MEGA7 ([www.megasoftware.net/](http://www.megasoftware.net/)) (Kumar *et al.*, 2016).

## RESULTADOS

### Caracterización fenotípica

**Aislamiento e identificación de dermatofitos.** Los aislados, sembrados en medio Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) e incubados a 28°C, fueron identificados utilizando la técnica de Rush Munro (cinta adhesiva), en donde se observaron diferentes estructuras microscópicas características de los dermatofitos, agrupándolos en los géneros *Trichophyton* y *Microsporum* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Identificación de dermatofitos por la técnica de Rush Munro

Clave interna	Clave Externa	Dermatofito
GT01	<i>M. nanum</i> (2)	<i>M. nanum</i>
GT02	678	<i>M. gypseum</i>
GT03	2249	<i>M. gypseum</i>
GT04	2917	<i>M. gypseum</i>
GT07	536	<i>T. mentagrophytes</i>
GT08	216	<i>T. rubrum</i>
GT09	3379	<i>T. mentagrophytes</i>
GT10	871	<i>M. gypseum</i>
GT11	1155	<i>M. gypseum</i>

GT12	<i>M. fulvum</i>	<i>M. canis</i>
GT13	932	<i>M. gypseum</i>
GT14	3353	<i>M. canis</i>
GT15	407	<i>M. gypseum</i>
GT16	3359	<i>T. mentagrophytes</i>
GT17	5-678	<i>M. gypseum</i>
GT18	3365	<i>T. mentagrophytes</i>
GT19	<i>M. nanum</i> (2)	<i>M. nanum</i>
GT20	<i>M. fulvum</i>	<i>M. canis</i>
GT22	1218	<i>T. mentagrophytes</i>
GT24	739	<i>M. gypseum</i>
GT25	1010	<i>T. rubrum</i>
GT26	249	<i>M. gypseum</i>
GT28	1126	<i>M. gypseum</i>
GT29	215	<i>T. rubrum</i>
GT30	1179	<i>T. mentagrophytes</i>
GT31	1101	<i>M. gypseum</i>
GT33	3141	<i>M. gypseum</i>
GT36	1112	<i>T. mentagrophytes</i>
GT39	992	<i>T. mentagrophytes</i>
GT40	3999	<i>T. mentagrophytes</i>
GT41	219	<i>T. mentagrophytes</i>
GT42	204x2	<i>T. mentagrophytes</i>
GT43	204	<i>T. mentagrophytes</i>
GT45	819	<i>T. mentagrophytes</i>
GT46	<i>M. nanum</i> (1)	<i>M. nanum</i>
GT47	1075	<i>T. mentagrophytes</i>
GT48	659	<i>M. gypseum</i>
GT49	249	<i>M. gypseum</i>
GT51	872	<i>T. mentagrophytes</i>
GT52	667	<i>M. gypseum</i>
GT53	844	<i>M. canis</i>
GT54	12x8	<i>T. mentagrophytes</i>
GT55	<i>M. nanum</i> (1)	<i>M. gypseum</i>
GT56	1112	<i>M. canis</i>
GT57	346	<i>T. mentagrophytes</i>
GT58	176	<i>T. rubrum</i>
GT59	2396	<i>T. mentagrophytes</i>
GT60	858	<i>M. canis</i>
GT61	3177	<i>M. canis</i>
GT62	1120	<i>T. mentagrophytes</i>
GT63	1012	<i>T. mentagrophytes</i>
GT64	854	<i>M. canis</i>


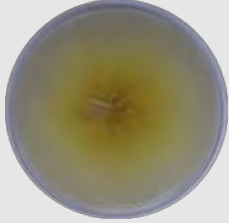
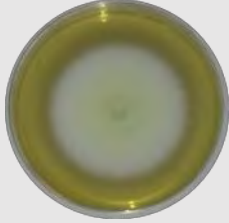


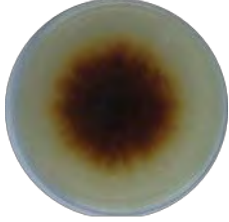

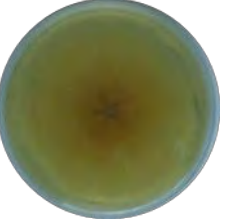












GT65	954	<i>T. mentagrophytes</i>
GT66	885	<i>M. canis</i>
GT67	3459	<i>T. mentagrophytes</i>
GT68	2166	<i>M. gypseum</i>
GT69B	3494	<i>T. mentagrophytes</i>
GT71	1082	<i>M. gypseum</i>
GT72	1118	<i>T. mentagrophytes</i>
GT73	615	<i>T. mentagrophytes</i>
GT75	1039	<i>M. gypseum</i>

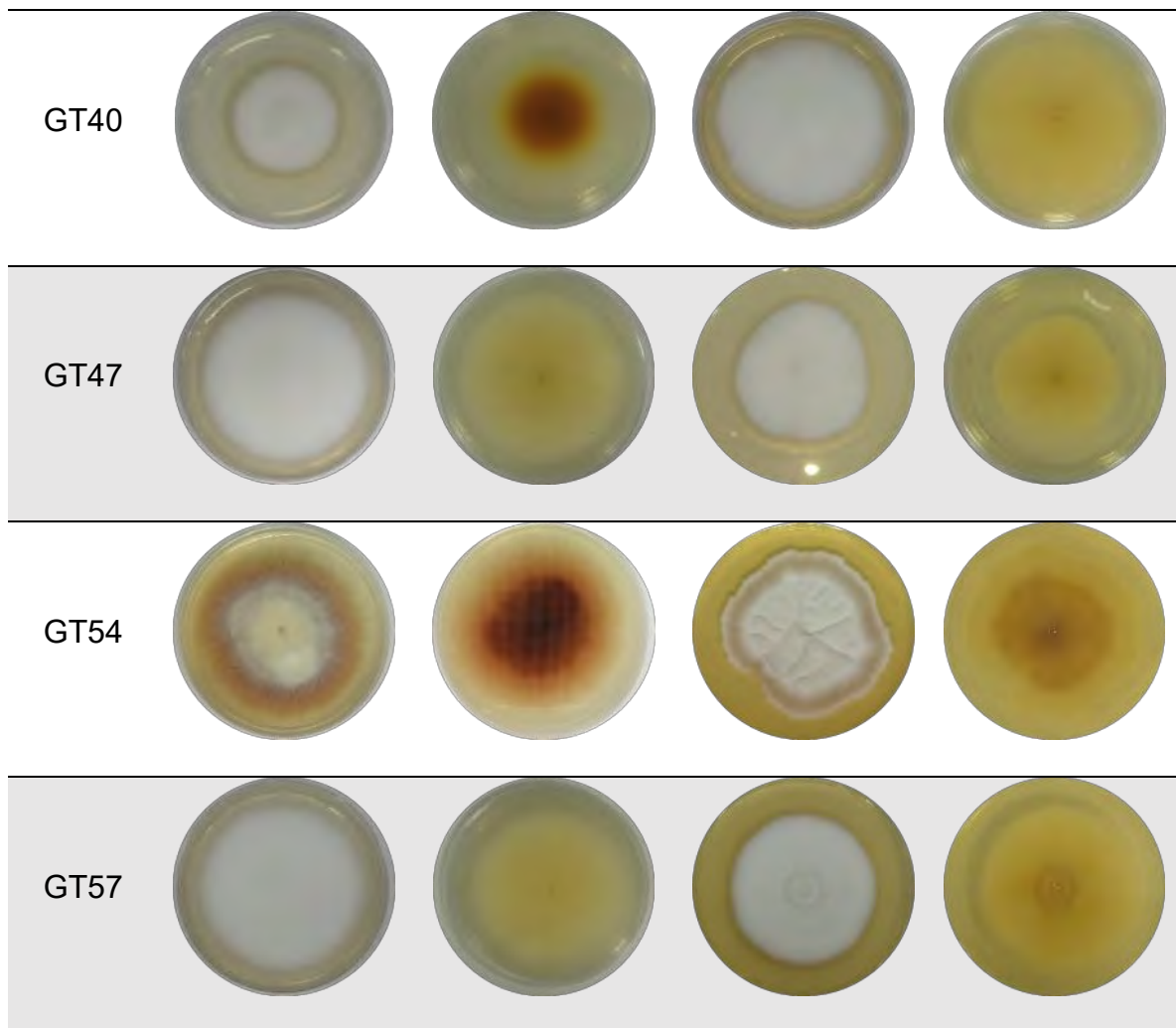
**Obtención de cultivos monospóricos.** Se obtuvieron 61 cultivos monospóricos pertenecientes a las especies de los dermatofitos incluidos en el estudio y se conservaron en una solución de Tween-80 al 0.05%, como se mencionó previamente en materiales y métodos.

**Macromorfología.** Con base en la morfología macroscópica, se identificaron 25 aislados como *T. mentagrophytes*, en donde se observaron dos tipos de colonias, una en medio APD y otra en Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon). En medio APD (Bioxon), 17 aislados presentaron colonias con una superficie plana, de aspecto granular a pulverulento, con borde ilimitado e irregular, de color blanco a amarillo pálido y 5 aislados desarrollaron centro crateriforme; con respecto a la morfología del reverso, 14 aislados desarrollaron pigmento ante-café con ramificaciones marrones, en 2 casos (GT07, GT62) desarrollaron pigmento amarillo y solo el aislado GT54 presentó una pigmentación rosa-rojizo (Figura 1). Los otros 8 aislados presentaron colonias con una superficie de aspecto algodonosa a vellosa, con borde ilimitado y regular, de color blanco a amarillo pálido; la morfología del reverso mostró que 4 aislados (GT47, GT57,

GT67 y GT69B) no desarrollaron pigmentación, mientras que 3 aislados (GT40, GT45 y GT73) desarrollaron pigmento amarillo-naranja y solo un aislado (GT39) desarrolló pigmento café-rojizo con ramificaciones rojizas (Figura 1). En el medio Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), 17 aislados desarrollaron colonias con superficie plana, de aspecto granular a pulverulento, con borde limitado e irregular, de color blanco, con el centro crateriforme de color blanco a amarillo pálido (excepto GT09, GT36, GT43 y GT51), mientras que 10 aislados (GT16, GT18, GT41, GT42, GT43, GT51, GT54, GT62, GT63 y GT65) presentaron un crecimiento radial; en la morfología del reverso, 7 aislados no presentaron pigmentación, mientras que 9 aislados presentaron pigmento de color ante a café y solo el aislado GT30 desarrolló pigmentación amarillo-naranja; 7 aislados desarrollaron colonias con superficie algodonosas a vellosas, con borde limitado y regular, de color blanco y con centro crateriforme excepto los aislados GT40, GT47 y GT73; el reverso de los 7 aislados no desarrolló pigmento. El aislado GT39, presentó pleomorfismo y se observó una colonia con superficie plana, de aspecto pulverulento, con borde limitado y regular, de color blanco, con el centro cerebriforme; al reverso no presentó pigmentación (Figura 1).



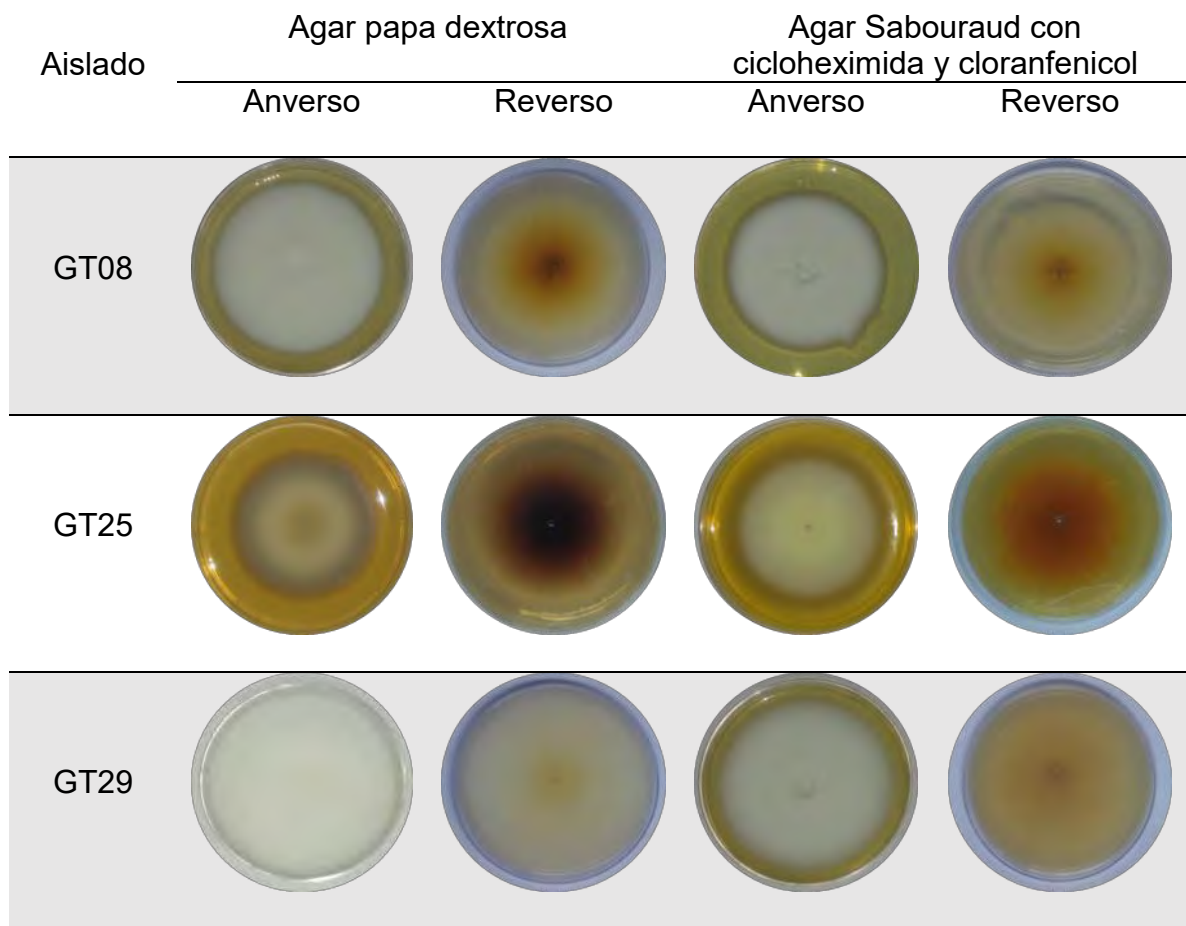
Aislado	Agar papa dextrosa		Agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol	
	Anverso	Reverso	Anverso	Reverso
GT07				
GT18				
GT30				
GT36				
GT39				

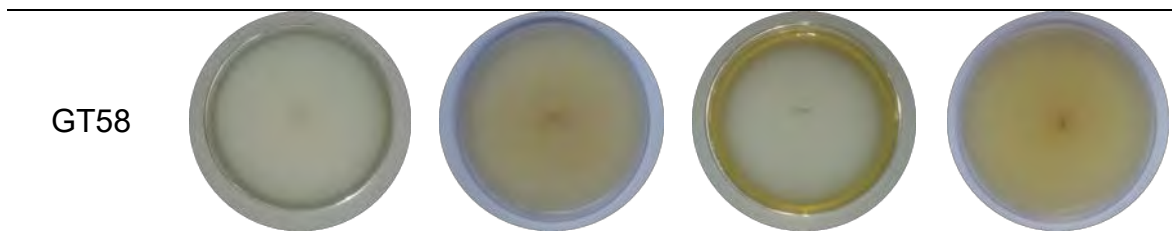


**Figura 1.** Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie *T. mentagrophytes* de aislados procedentes de Guatemala en los medios APD y Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol.

Por otro lado, 4 aislados (GT08, GT25, GT29 y GT58) fueron identificados como *T. rubrum* (Figura 2). En medio APD (Bioxon), presentaron colonias con una superficie algodonosa, con borde limitado y regulares de color blanco, excepto el GT25 que presentó una colonia con superficie vellosa, con crecimiento radial, con borde limitado y regular, de color amarillo pálido en el centro y rosa pálido en la periferia; al revés, el aislado GT08 presentó una pigmentación amarilla-naranja, mientras que el GT25 presentó una pigmentación rojo vino café; el GT29 presentó

una pigmentación amarillo pálido y el GT58 no presentó pigmentación. En medio Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), los 4 aislados presentaron colonias con una superficie vellosa a aterciopelada, con borde limitado y regular, de color blanco y amarillo pálido (GT25); al reverso los aislados GT29 y GT58 no presentaron pigmentación, el aislado GT08 presentó pigmento amarillo y el aislado GT25 presentó pigmento amarillo-naranja (Figura 2).

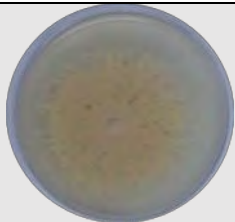
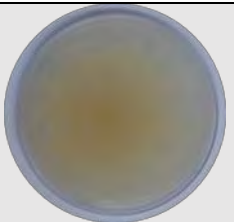

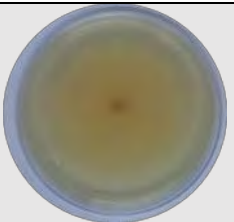

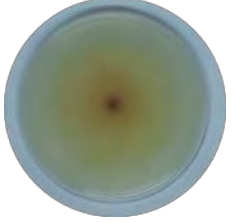

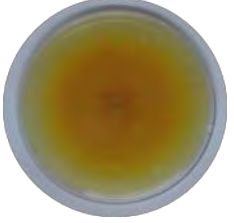






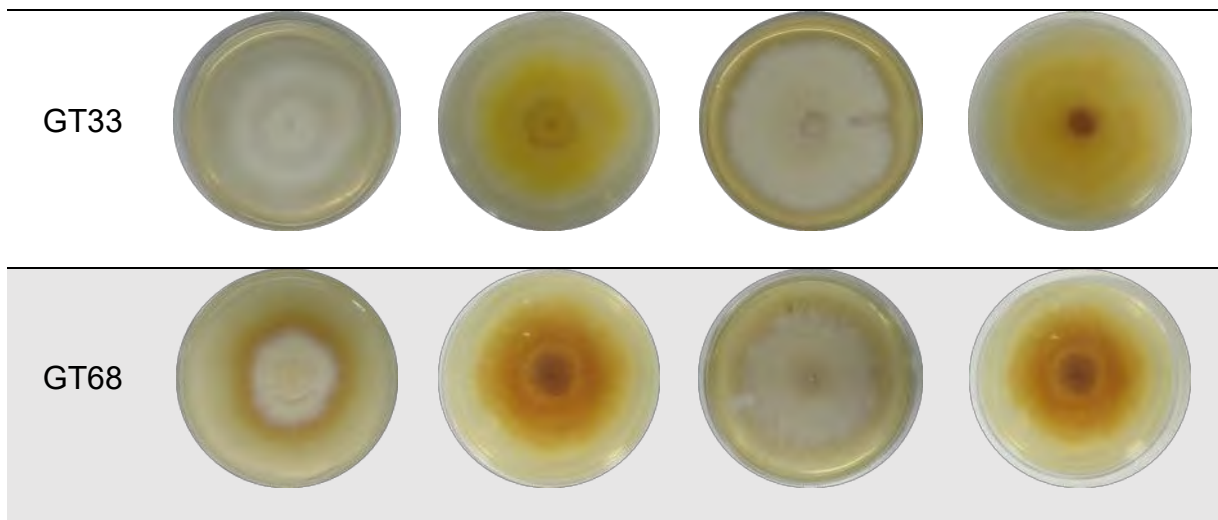


**Figura 2.** Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie de *T. rubrum* de aislados procedentes de Guatemala en los medios APD y Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol.

Asimismo, se identificaron 20 aislados como *M. gypseum* (Figura 3). En medio APD (Bioxon), 17 aislados presentaron colonias con una superficie plana, de aspecto granular a pulverulento, con borde ilimitado e irregular (con flecos), de color ante a canela, con un crecimiento algodonoso de color blanco en el centro, excepto los aislados GT02, GT03, GT11, GT15, GT17, GT55 y GT71; al reverso, 9 aislados presentaron pigmentación amarilla con café, 4 aislados presentaron pigmentación amarilla (GT11, GT17, GT31 y GT75) y 3 aislados no desarrollaron pigmento (GT02, GT13 y GT15). Los aislados GT10, GT24 y GT33 presentaron colonias con una superficie algodonosa a vellosa, con borde limitado y regular, de color blanco; al reverso, presentaron pigmentación amarilla con café. El aislado GT68 presentó una colonia con superficie plana, de aspecto pulverulento, con borde limitado y regular, con centro crateriforme, de color blanco a amarillo pálido, al reverso desarrolló una pigmentación amarillo-café. En medio Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), los 20 aislados presentaron colonias con una superficie plana, de aspecto granular a pulverulento, borde ilimitado e irregular (con flecos), solo los aislados GT10 y GT24 tenían un borde limitado y regular, 5 aislados (GT10, GT24, GT28, GT52 y GT53) presentaron un centro crateriforme,

11 aislados presentaron colonias de color amarillo pálido a ante-café en el centro y blanco en la periferia, 8 aislados presentaron colonias blancas y solo el aislado GT17 presentó una colonia de color ante; al reverso 8 aislados no presentaron pigmentación, 6 aislados (GT03, GT04, GT10, GT28, GT52 y GT55) presentaron una pigmentación amarilla-naranja, 6 aislados (GT24, GT26, GT33, GT49,GT68 y GT75) presentaron una pigmentación amarilla con café (Figura 3).

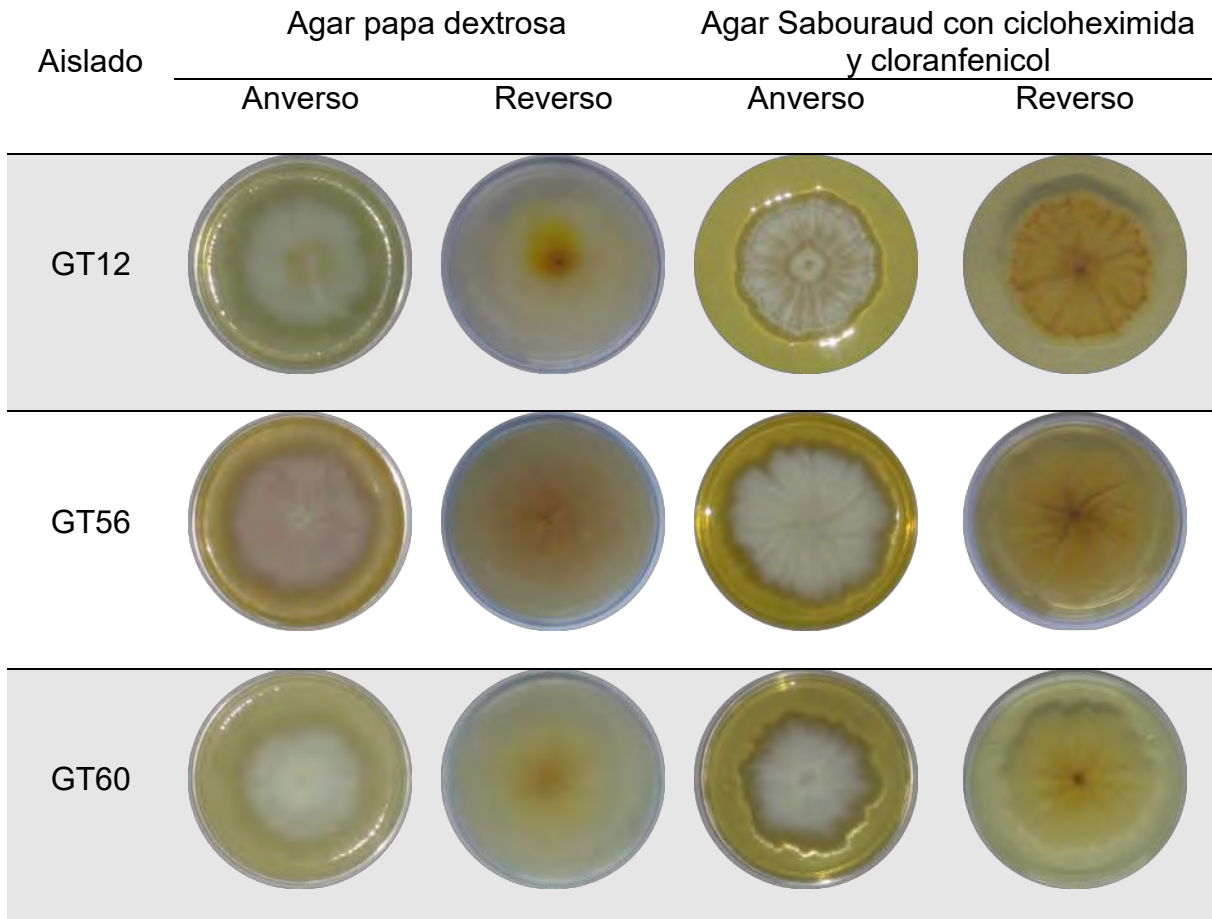
Aislado	Agar papa dextrosa		Agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol	
	Anverso	Reverso	Anverso	Reverso
GT02				
GT04				
GT17				



**Figura 3.** Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie de *M. gypseum* de aislados procedentes de Guatemala en los medios APD y Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol.

Se identificaron también 9 aislados como *M. canis* (Figura 4). En medio APD (Bioxon), los aislados presentaron colonias con una superficie algodonosa a flocosa (peludo), con borde limitado e irregular, de color blanco, excepto el aislado GT56, los aislados GT12 y GT20 presentaron un centro pulverulento de color ante; al reverso, 4 aislados presentaron una pigmentación ante-café (GT14, GT53, GT56 y GT61), 3 aislados presentaron una pigmentación amarilla (GT12, GT20 y GT66) y los aislados GT60 y GT64 no presentaron pigmentación. En medio Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), 7 aislados presentaron colonias con una superficie flocosa, con borde limitado e irregular (en forma de remolino), de color blanco a amarillo pálido; al reverso 4 aislados presentaron una pigmentación amarilla con ramificaciones marrones (GT14, GT60, GT61 y GT66), 3 aislados no presentaron pigmentación (GT53, GT56 y GT64), además 2 aislados (GT12 y GT20) presentaron pleomorfismo observándose colonias con una superficie aterciopelada, con borde limitado y regular, de color blanco y con centro

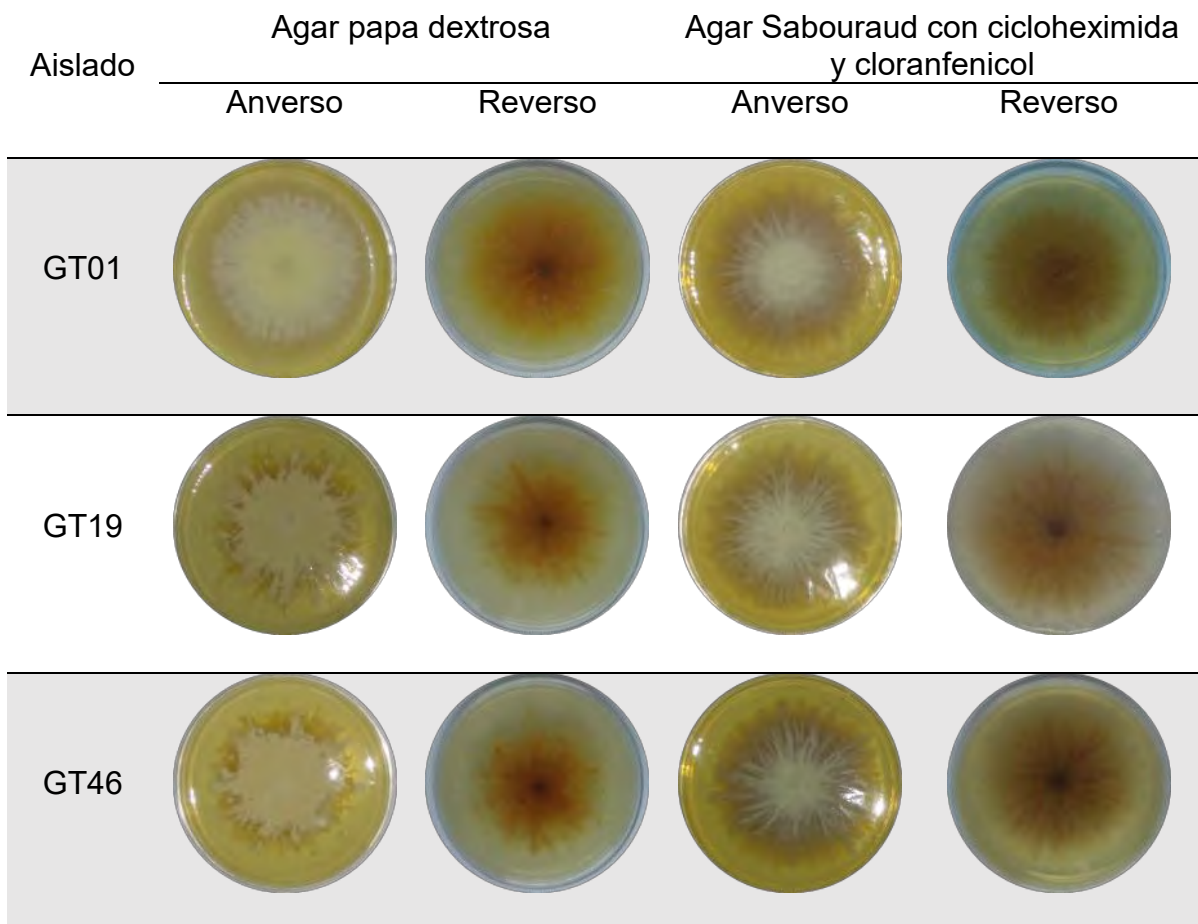
crateriforme; al reverso mostraron una leve pigmentación de color amarillo a café (Figura 4).



**Figura 4.** Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie de *M. canis* de aislados procedentes de Guatemala en los medios APD y Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol.

Por último, se identificaron 3 aislados como *M. nanum* (Figura 5). En medio APD (Bioxon), se observaron colonias con superficie plana, de aspecto granular a pulverulento, con borde ilimitado e irregular, de color ante a marrón, excepto el aislado GT01, que presentó un borde limitado e irregular (con flecos), de color blanco y amarillo pálido; al reverso los aislados presentaron un pigmento de color

amarillo-naranja, con ramificaciones marrones. En medio Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon), los 3 aislados presentaron colonias con superficie plana, de aspecto pulverulento, con borde ilimitado e irregular, de color blanco a amarillo pálido; al reverso los aislados presentaron pigmentación de color ante con ramificaciones marrones (Figura 5).



**Figura 5.** Ejemplos de la morfología macroscópica de las colonias de la especie de *M. nanum* de aislados procedentes de Guatemala en los medios APD y Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol.



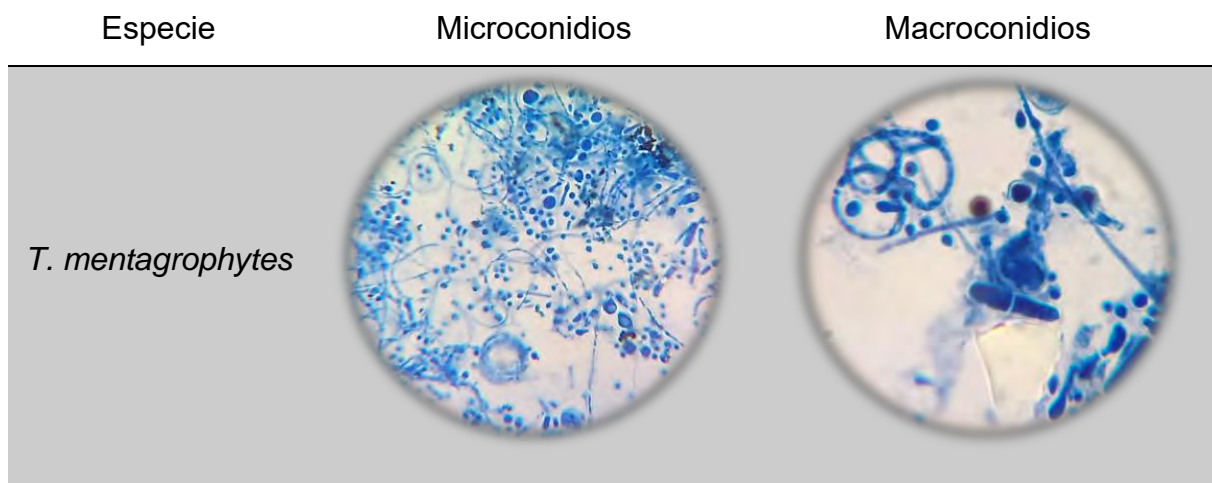
**Micromorfología.** La morfología microscópica observada a partir de microcultivos, los cuales se obtuvieron con los medios Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (Bioxon) y APD (Bioxon) fue muy similar; sin embargo, en este último se observó mayor conidiación.

Los aislados identificados como *T. mentagrophytes* presentaron micelio septado, delgado, en forma de espirales y zarcillos. Además de presentar abundantes microconidios redondos y en menor cantidad con forma piriforme, que se encontraban libres (Figura 6). En los aislados GT22, GT40 y GT63 se observaron escasos macroconidios en forma de puro con paredes lisas con 3 a 5 lóculos transversales. Los aislados identificados como *T. rubrum*, desarrollaron micelio delgado, cenocítico y septado. Presentaron escasos microconidios piriformes, los cuales se encontraban dispuestos de forma alterna a lo largo del micelio y en forma libre. No se observaron macroconidios (Figura 6).

En los aislados identificados como *M. gypseum* (Figura 6), se observó poco micelio delgado y septado. Presentaron abundantes macroconidios en forma de huso, con 4 a 6 lóculos y presentaron una membrana delgada, en algunos casos se observaron espículas y un contorno irregular. Presentaron microconidios piriformes, excepto los aislados GT03, GT10, GT28, GT33, GT55 y GT68.

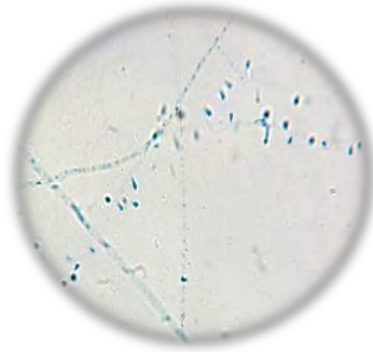
Los aislados identificados como *M. canis* (Figura 6), desarrollaron micelio delgado y septado. En el aislado GT64 se observó en medio Sabouraud con cicloheximida

y cloranfenicol (Bioxon) micelio en forma de raqueta intercalar (con un aspecto de huesos de perro). Presentaron macroconidios en forma de huso con una membrana gruesa y en ocasiones espiculadas, con más de 6 lóculos. En los aislados GT12, GT20, GT56 y GT61 se observaron pocos microconidios piriformes que se encontraban dispuestos a lo largo del micelio en forma alterna. El aislado GT64 no presentó estructuras de reproducción, solo se observó micelio estéril. Finalmente, los aislados identificados como *M. nanum*, presentaron micelio delgado y septado, con abundantes macroconidios piriformes (en forma de “pera”), con una membrana delgada y lisa, con 2 lóculos principalmente. No se observaron microconidios (Figura 6).



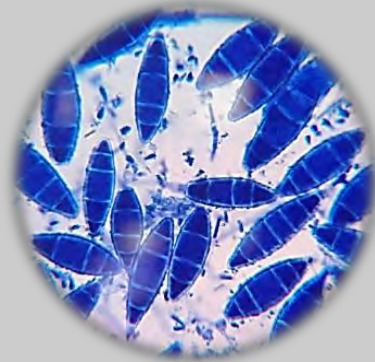
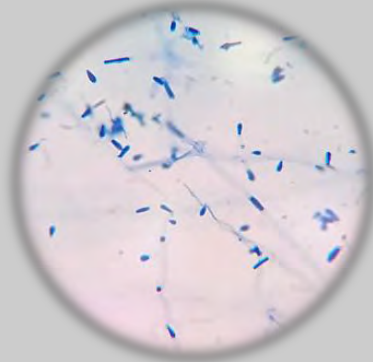
---

*T. rubrum*

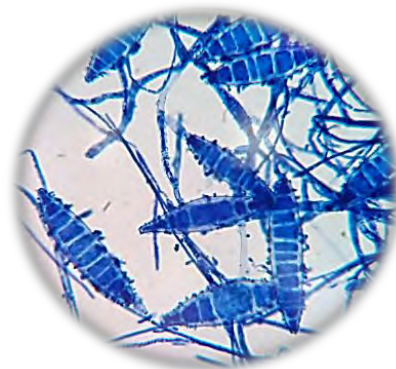


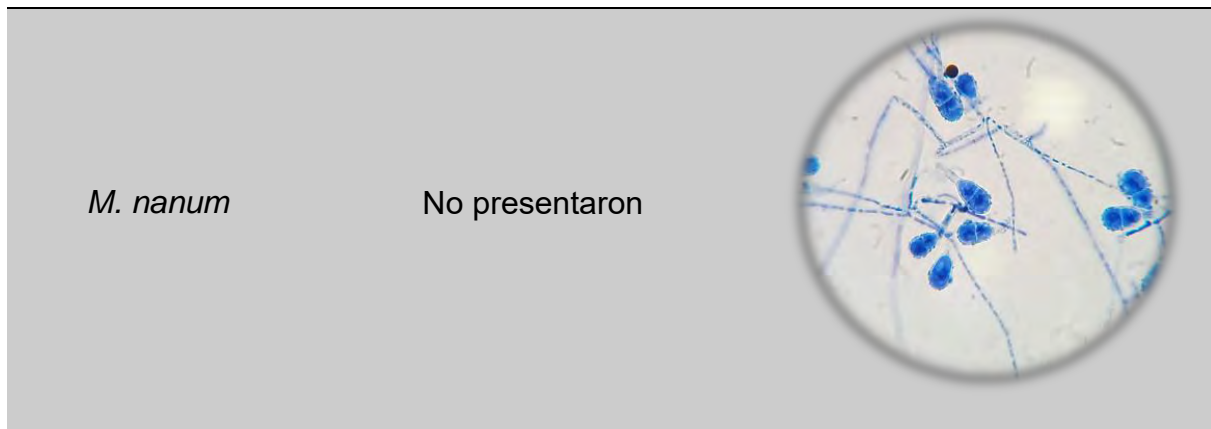
No presentaron

*M. gypseum*



*M. canis*





**Figura 6.** Ejemplos de la morfología microscópica de las especies de dermatofitos de los aislados clínicos procedente de Guatemala.

**Tamaño de conidios.** El diámetro de los microconidios para *T. mentagrophytes* fue de 1.08 a 2.80  $\mu\text{m}$ , algunos aislados presentaron macroconidios cuyos valores fueron de 2.63 a 4.33  $\mu\text{m}$ , desarrollando de 2 a 5 lóculos. Para *T. rubrum*, los valores fueron de 1.31 a 1.87  $\mu\text{m}$ , cabe mencionar que los aislados de esta última especie no presentaron macroconidios (Tabla 2).

Con respecto al género *Microsporum*, los macroconidios son los que predominan en este género y los valores obtenidos para *M. gypseum* fueron de 9.02 a 15.98  $\mu\text{m}$ , desarrollando de 4 a 6 lóculos; además, en algunos aislados se observaron microconidios de 1.60 a 2.65  $\mu\text{m}$ . Para *M. canis*, los valores fueron de 12.58 a 22.06  $\mu\text{m}$ , desarrollando de 6 a 9 lóculos, de igual manera algunos aislados presentaron microconidios de 1.22 a 2.04  $\mu\text{m}$ . Para *M. nanum*, fueron de 8.25 a 8.87  $\mu\text{m}$  y todos los aislados presentaron macroconidios con 2 lóculos, esta especie no presentó microconidios (Tabla 2).

Es importante mencionar que el tamaño de los conidios reportados en el presente trabajo coincide con lo reportado de *M. gypseum*, los microconidios de *T. mentagrophytes* y los macroconidios de *M. canis*, mientras que los microconidios de *T. rubrum* y *M. canis* fueron de menor tamaño y los macroconidios de *M. nanum* fueron de mayor (Kwon-Chung y Bennett, 1992).

La Tabla 2 muestra el tamaño de conidios de las especies de dermatofitos identificadas por métodos fenotípicos; mientras que en la Tabla 3 se muestra el tamaño de conidios de las especies de dermatofitos, identificados por métodos genotípicos, ya que algunas especies fueron reubicadas después de realizar el análisis filogenético.

**Tabla 2.** Tamaño de conidios (identificación fenotípica)

Especie identificada	Número de aislados	Diámetro de conidios (µm)		
		Macroconidios	Lóculos	Microconidios
<i>T. mentagrophytes</i>	25	3.87 ± 0.85	4	2.13 ± 0.33
<i>T. rubrum</i>	4	-	-	1.60 ± 0.23
<i>M. gypseum</i>	20	11.19 ± 2.07	6	1.98 ± 0.28
<i>M. canis</i>	8	17.41 ± 3.59	8	1.56 ± 0.35
<i>M. nanum</i>	3	8.49 ± 0.33	2	-

El promedio de los conidios se obtuvo a partir de la medición de: n=10 macroconidios y n=30 microconidios.

**Tabla 3.** Tamaño de conidios (identificación genotípica)

Especie identificada	Número de aislados	Diámetro de conidios ( $\mu\text{m}$ )		
		Macroconidios	Lóculos	Microconidios
<i>T. interdigitale</i>	26	3.45 $\pm$ 0.85	4	2.08 $\pm$ 0.52
<i>T. rubrum</i>	1	-	-	1.28 $\pm$ ND
<i>A. incurvatum</i>	13	9.15 $\pm$ 0.81	5	1.90 $\pm$ 0.18
<i>M. gypseum</i>	9	11.41 $\pm$ 2.20	5	1.84 $\pm$ 0.30
<i>A. otae</i>	8	17.41 $\pm$ 3.59	8	1.56 $\pm$ 0.35
<i>A. obtusum</i>	3	8.49 $\pm$ 0.33	2	-

El promedio de los conidios se obtuvo a partir de la medición de: n=10 macroconidios y n=30 microconidios; ND: No determinado.

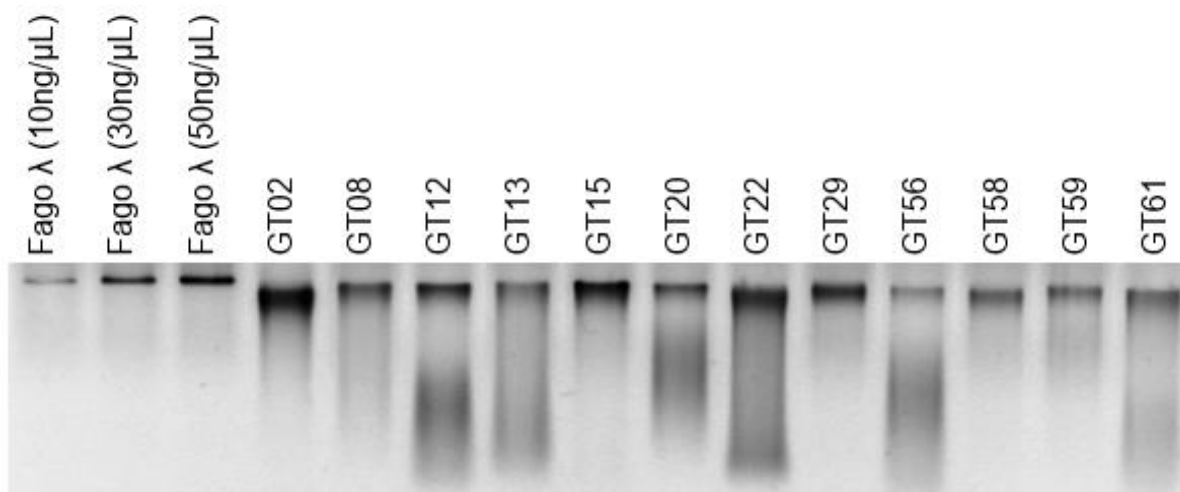
### Caracterización genotípica

**Extracción de DNA genómico.** Se purificó el DNA genómico (gDNA) de los 61 cultivos monospóricos de dermatofitos incluidos en el estudio. La concentración, calidad y pureza del gDNA se analizaron por electroforesis y espectrofotometría. Por espectrofotometría se obtuvieron valores muy variables. En la Tabla 4 se muestran las diferentes concentraciones de gDNA que se obtuvo de cada muestra, la cual osciló entre los 12.99-3546.43 ng/ $\mu\text{L}$ , así como los valores obtenidos de la pureza, que está dada por la relación  $A_{260}/A_{280}$ , que fueron entre 1.01 a 3.13. Además, se midió la concentración de gDNA por electroforesis, donde se compararon las muestras de gDNA problemas con diferentes concentraciones del fago  $\lambda$  (Figura 7) para estimar la concentración del gDNA de cada aislado.

**Tabla 4.** Cuantificación de gDNA por espectrofotometría

Clave interna	Clave Externa	[gDNA] ng/ $\mu$ g	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
GT01	<i>M. nanum</i> (2)	112.93	2.15
GT02	678	92.50	2.21
GT03	2249	1062.33	1.90
GT04	2917	1153.55	1.01
GT07	536	1670.60	1.82
GT08	216	22.85	2.01
GT09	3379	785.50	1.92
GT10	871	128.65	2.64
GT11	1155	441.63	1.99
GT12	<i>M. fulvum</i>	49.00	2.02
GT13	932	22.93	2.00
GT14	3353	263.23	1.76
GT15	407	23.85	1.87
GT16	3359	166.53	2.04
GT17	5-678	504.98	1.71
GT18	3365	73.22	1.64
GT19	<i>M. nanum</i> (2)	124.03	2.58
GT20	<i>M. fulvum</i>	180.43	2.06
GT22	1218	313.35	1.64
GT24	739	300.28	1.88
GT25	1010	1142.80	1.86
GT26	249	2290.73	1.93
GT28	1126	5307.00	1.88
GT29	215	25.95	2.04
GT30	1179	99.98	2.03
GT31	1101	22.76	1.92
GT33	3141	87.93	2.25
GT36	1112	36.98	2.19
GT39	992	382.83	1.35
GT40	3999	221.35	1.80
GT41	219	878.63	1.82
GT42	204x2	101.45	2.17
GT43	204	2434.80	1.71
GT45	819	71.93	1.90
GT46	<i>M. nanum</i> (1)	56.42	2.22
GT47	1075	398.48	1.94
GT48	659	69.28	2.04
GT49	249	3221.35	2.05
GT51	872	3546.43	1.85
GT52	667	3549.28	1.81

GT53	844	265.55	1.90
GT54	12x8	48.45	3.13
GT55	<i>M. nanum</i> (1)	455.45	1.95
GT56	1112	56.63	2.21
GT57	346	91.15	2.15
GT58	176	41.35	2.25
GT59	2396	43.25	2.20
GT60	858	25.53	1.99
GT61	3177	39.95	1.92
GT62	1120	293.55	1.49
GT63	1012	1814.38	2.03
GT64	854	652.53	1.77
GT65	954	64.95	2.11
GT66	885	2053.90	1.93
GT67	3459	428.73	1.98
GT68	2166	640.60	1.91
GT69B	3494	2748.90	2.04
GT71	1082	1672.5	1.78
GT72	1118	23.55	2.12
GT73	615	120.23	2.71
GT75	1039	227.33	1.91

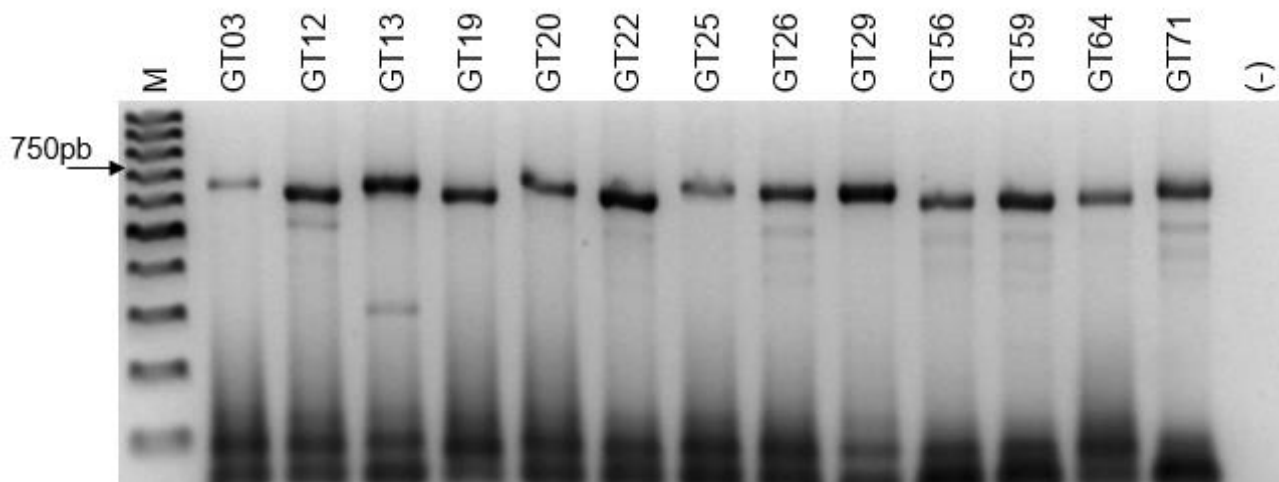


**Figura 7.** Cuantificación de gDNA en aislados de dermatofitos procedentes de Guatemala. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.0 % a 100 V, 60 min, el gDNA se tiñó con GelRed.



**Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR.** Para determinar la concentración óptima de los reactivos para una amplificación por PCR adecuada, se realizaron curvas de concentración de los reactivos. Se inició con las condiciones descritas por los autores O'Donnell y Cogelnik (1997) para cada uno de los oligonucleótidos utilizados. Debido a que la amplificación no se logró bajo estas condiciones, se llevó a cabo una curva de concentración de gDNA, siendo 15 ng/ $\mu$ L la concentración en la que se obtuvo una amplificación adecuada.

**Amplificación de un fragmento del gen de la  $\beta$ -tubulina (BT2).** Una vez optimizadas las condiciones de amplificación, se realizó la PCR para amplificar la región con el gen de  $\beta$ -tubulina. Se llevó a cabo la PCR usando todas las muestras de gDNA. En la Figura 8 se muestra el producto del gen de la  $\beta$ -tubulina de algunas muestras de gDNA como molde, donde el tamaño del amplicón corresponde a 600-750 pb.



**Figura 8.** Amplificación por PCR del fragmento del gen de la  $\beta$ -tubulina a partir de los gDNA de los aislados de dermatofitos de Guatemala. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5 % a 60 V, 90 min, el gDNA se tiñó con GelRed. M: Marcador de peso molecular; (-): Control negativo.

### Identidad de las secuencias de los dermatofitos aislados procedentes de

**Guatemala.** Las secuencias editadas y analizadas de los productos de la amplificación del fragmento del gen *BT2* con el algoritmo Blast presentaron un porcentaje de similitud del 85-100% y un porcentaje de identidad del 92-100%, con respecto al valor de expectación, todos los aislados presentaron un valor de 0.0 (Tabla 5). De los 61 aislados procedentes de Guatemala, 26 correspondieron a *T. interdigitale*, 1 a *T. rubrum*, 9 a *M. gypseum*, 13 a *Microsporum* sp., 9 a *A. otae* y 3 a *A. obtusum* (Tabla 5). Con base en las especies identificadas, se seleccionaron secuencias de referencia depositadas en el GenBank, que fueron identificadas con el gen *BT2*, para llevar a cabo el análisis filogenético.

**Tabla 5.** Identidad de las secuencias de los dermatofitos procedentes de Guatemala

Clave interna	Clave Externa	Identificación fenotípica	Identificación genotípica	% de Similitud	Valor de expectación	% de Identidad
---------------	---------------	---------------------------	---------------------------	----------------	----------------------	----------------

GT01	<i>M. nanum</i> (2)	<i>M. nanum</i>	<i>A. obtusum</i>	100	0.0	98
GT02	678	<b><i>M. gypseum</i></b>	<b><i>M. gypseum</i></b>	100	0.0	99
GT03	2249	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	97	0.0	97
GT04	2917	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	100	0.0	98
GT07	536	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT08	216	<i>T. rubrum</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	99
GT09	3379	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT10	871	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	97	0.0	96
GT11	1155	<b><i>M. gypseum</i></b>	<b><i>M. gypseum</i></b>	100	0.0	99
GT12	<i>M. fulvum</i>	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	100	0.0	100
GT13	932	<b><i>M. gypseum</i></b>	<b><i>M. gypseum</i></b>	100	0.0	99
GT14	3353	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	98	0.0	99
GT15	407	<b><i>M. gypseum</i></b>	<b><i>M. gypseum</i></b>	100	0.0	99
GT16	3359	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	98	0.0	99
GT17	5-678	<b><i>M. gypseum</i></b>	<b><i>M. gypseum</i></b>	100	0.0	100
GT18	3365	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	99
GT19	<i>M. nanum</i> (2)	<i>M. nanum</i>	<i>A. obtusum</i>	99	0.0	99
GT20	<i>M. fulvum</i>	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	100	0.0	99
GT22	1218	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT24	739	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	100	0.0	99
GT25	1010	<b><i>T. rubrum</i></b>	<b><i>T. rubrum</i></b>	100	0.0	100
GT26	249	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	94	0.0	98
GT28	1126	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	100	0.0	98
GT29	215	<i>T. rubrum</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT30	1179	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	99
GT31	1101	<b><i>M. gypseum</i></b>	<b><i>M. gypseum</i></b>	95	0.0	98
GT33	3141	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	100	0.0	99
GT36	1112	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	99
GT39	992	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT40	3999	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT41	219	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	99
GT42	204x2	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT43	204	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT45	819	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT46	<i>M. nanum</i> (1)	<i>M. nanum</i>	<i>A. obtusum</i>	99	0.0	92
GT47	1075	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Microsporium</i> sp.	95	0.0	98
GT48	659	<b><i>M. gypseum</i></b>	<b><i>M. gypseum</i></b>	100	0.0	99
GT49	249	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	98	0.0	96
GT51	872	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
GT52	667	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	100	0.0	99

<b>GT53</b>	844	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	100	0.0	100
<b>GT54</b>	12x8	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
<b>GT55</b>	<i>M. nanum</i> (1)	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	100	0.0	99
<b>GT56</b>	1112	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	99	0.0	99
<b>GT57</b>	346	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	85	0.0	99
<b>GT58</b>	176	<i>T. rubrum</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
<b>GT59</b>	2396	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
<b>GT60</b>	858	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	100	0.0	100
<b>GT61</b>	3177	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	99	0.0	99
<b>GT62</b>	1120	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
<b>GT63</b>	1012	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
<b>GT64</b>	854	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	97	0.0	99
<b>GT65</b>	954	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
<b>GT66</b>	885	<i>M. canis</i>	<i>A. otae</i>	100	0.0	100
<b>GT67</b>	3459	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
<b>GT68</b>	2166	<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	100	0.0	99
<b>GT69B</b>	3494	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Microsporium</i> sp.	100	0.0	93
<b>GT71</b>	1082	<b><i>M. gypseum</i></b>	<b><i>M. gypseum</i></b>	99	0.0	99
<b>GT72</b>	1118	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	100
<b>GT73</b>	615	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	100	0.0	99
<b>GT75</b>	1039	<b><i>M. gypseum</i></b>	<b><i>M. gypseum</i></b>	100	0.0	100

Las especies resaltadas en negritas corresponden a las especies que no fueron reubicadas por métodos genotípicos.

**Selección de modelo evolutivo.** Con base en las secuencias que se obtuvieron, las cuales fueron editadas y alineadas, el mejor modelo evolutivo fue el GTR+G+I.

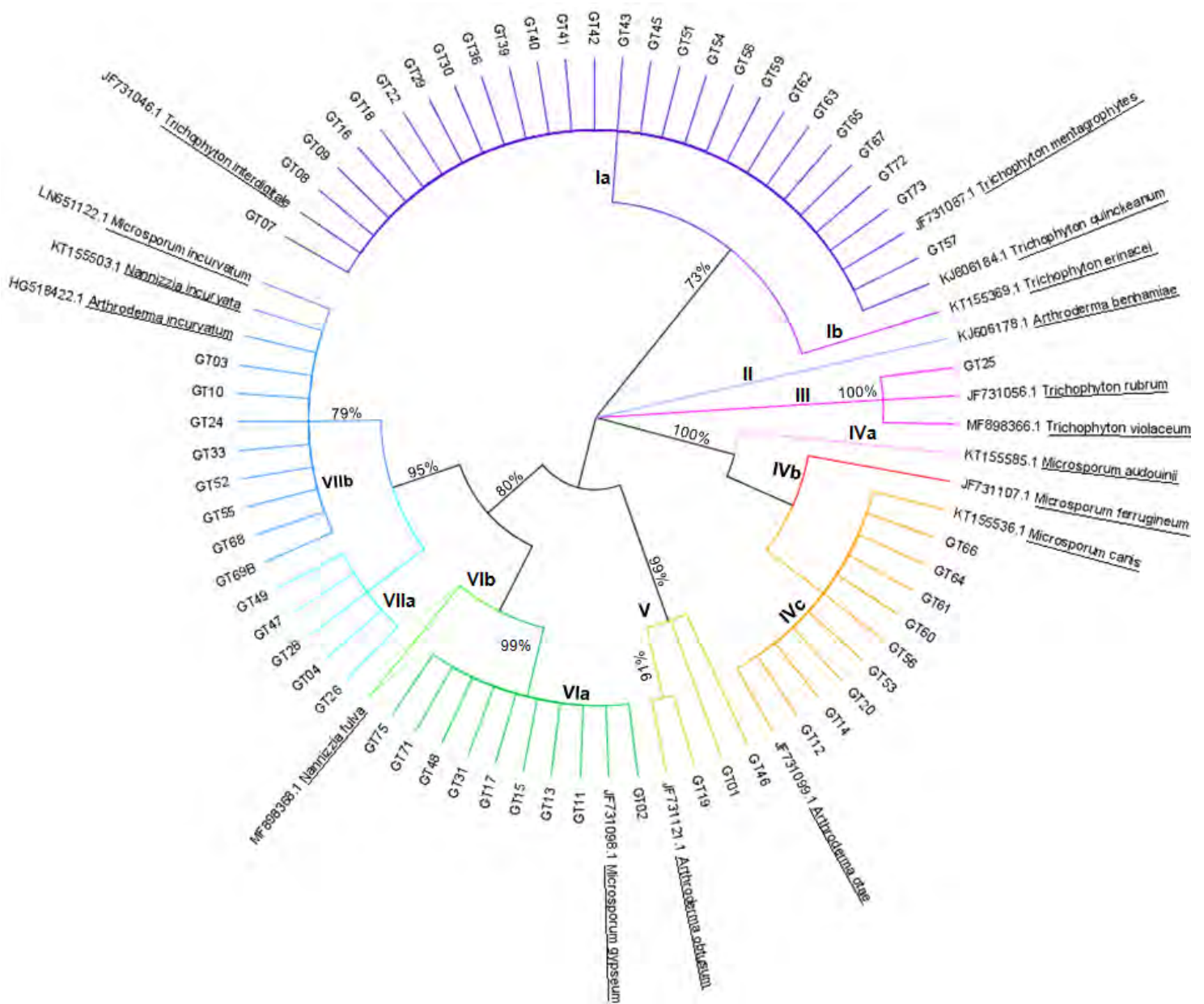
**Análisis filogenético.** Para determinar la posición filogenética de los aislados de las diferentes especies de dermatofitos, se elaboró un árbol filogenético con el método de Máxima Verosimilitud obteniendo 7 grupos principales (Figura 9). El grupo I se dividió en dos subgrupos (**la** y **lb**), el subgrupo **la** se formó con 3 aislados identificados previamente como *T. rubrum* y 23 aislados, identificados previamente como *T. mentagrophytes*, se relacionaron con las secuencias de

referencia de *T. interdigitale* (JF731046.1) y *T. mentagrophytes* (JF731087.1), a excepción del aislado GT57 quien se asoció con la secuencia de referencia de *T. quinckeanum* (KF606184.1). En el subgrupo **Ib** solo se agrupó la secuencia de referencia de *T. erinacei* con número de acceso KT155369.1, el grupo **I** tuvo un valor de bootstrap del 73%. El grupo **II** fue constituido solo por la secuencia de referencia de *A. benhamiae* (número de acceso KJ606178.1) (Figura 9).

El grupo **III** incluyó un aislado previamente identificado como *T. rubrum* y se asoció con las secuencias de referencia de *T. rubrum* (JF731056.1), de *T. violaceum* (MF898366.1), con un valor de bootstrap del 100% (Figura 9). El grupo **IV** se dividió en tres subgrupos (**IVa**, **IVb** y **IVc**), el subgrupo **IVa** se formó solo por la secuencia de referencia de *M. audouinii* (KT1555585.1), el subgrupo **IVb** se formó solo con la secuencia de referencia de *M. ferrugineum* (JF731107.1), en el subgrupo **IVc** se integraron 8 aislados identificados previamente como *M. canis*, los cuales fueron asociados con las secuencias de referencia de *A. otae* (JF731099.1) y *M. canis* (KT555536.1) con un valor de bootstrap del 100% (Figura 9). En el grupo **V** se agruparon 3 aislados identificados previamente como *M. nanum*, quienes fueron asociados con la secuencia de referencia de *A. obtusum* con número de acceso JF731121.1, con un valor de bootstrap del 99%. El grupo **VI** se dividió en dos subgrupos (**VIa** y **VIb**), en el subgrupo **VIa** se integraron 9 aislados identificados previamente como *M. gypseum*, y se relacionaron con la secuencia de referencia de *M. gypseum* con número de acceso JF731096.1, el

subgrupo **Vlb** se formó solo con la secuencia de referencia *N. fulva* con número de acceso MF898368.1, con un bootstrap del 99% (Figura 9).

Finalmente el grupo **VII** se dividió en dos subgrupo (**VIIa** y **VIIb**), el subgrupo **VIIa** se conformó con un aislado identificado previamente como *T. mentagrophytes* y 4 aislados identificados previamente como *M. gypseum*, y en el subgrupo **VIIb** se agruparon 7 aislados identificados previamente como *M. gypseum* y un aislado identificado previamente como *T. mentagrophytes*. Este grupo se asoció con las secuencias de referencia de *A. incurvatum* con número de acceso HG518422.1, seguido de *N. incurvata* (KT55503.1) y *M. incurvatum* (LN651122.1) con un valor de bootstrap del 79%. El soporte de todos los grupos tiene un intervalo de bootstrap del 70–100% (Figura 9).



**Figura 9.** Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud utilizando el software MEGA7. Se incluyeron 61 aislados de distintas especies de dermatofitos con base en el análisis de las secuencias del gen *BT2*. Morado: aislados identificados como *T. interdigitale* & *T. mentagrophytes*; púrpura: cepa de referencia de *T. erinacei*; lila: cepa de referencia de *A. benhamiae*; fucsia: aislado identificado como *T. rubrum*; rosa: cepa de referencia de *M. audouinii*; rojo: cepa de referencia de *M. ferrugineum*; naranja: aislados identificados como *M. canis* & *A. otae*; dorado: aislados identificados como *A. obtusum*; verde: aislados identificados como *M. gypseum*; verde claro: cepa de referencia de *N. fulva*; azul: aislados identificados como *A. incurvatum*.

**Tabla 6.** Reubicación de los aislados por el análisis filogenético

Especie identificada	Número de aislados
<i>T. interdigitale</i>	26 (42.62%)
<i>A. incurvatum</i>	13 (21.31%)
<i>M. gypseum</i>	9 (14.75%)
<i>A. otae</i>	9 (14.75%)
<i>A. obtusum</i>	3 (9.91%)
<i>T. rubrum</i>	1 (1.64%)

## DISCUSIÓN

La dermatofitosis es un importante problema de salud pública en países tropicales y subtropicales, incluyendo México y Guatemala, ya que no es fácil su diagnóstico con base exclusivamente en las manifestaciones clínicas (Hainer, 2003). Además, es más difícil de diagnosticar en pacientes inmunocomprometidos, ya que la presentación clínica a menudo es atípica (Garg *et al.*, 2009). El diagnóstico diferencial de las dermatofitosis incluye dermatitis seborreica, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, psoriasis, intertrigo por *Candida*, eritrasma, eccema, entre otros (Hainer, 2003), por lo que se requiere de buenos métodos de laboratorio para la identificación rápida y precisa de los dermatofitos para iniciar un tratamiento adecuado y aplicar medidas de prevención.

El objetivo de este estudio fue identificar correctamente las especies de dermatofitos pertenecientes a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* a partir de aislados de muestras de pacientes de Guatemala. El género más común detectado por métodos fenotípicos fue *Trichophyton*, seguido



de *Microsporum*, con las siguientes especies: *T. mentagrophytes* fue el aislado más común (25 casos, 40.98%), seguido de *M. gypseum* (20 casos, 32.79%), *M. canis* (9 casos, 14.75%), *T. rubrum* (4 casos, 6.56%) y *M. nanum* (3 casos, 4.92%). Estos resultados no concuerdan con lo previamente reportado, ya que es en un estudio retrospectivo observacional descriptivo, de casos reportados con dermatofitosis en Guatemala. Los dermatofitos más frecuentemente aislados fueron *T. rubrum* (85,0%), *M. canis* (7,0%), *T. mentagrophytes* (5,92%), *E. floccosum* (1,0%), *M. gypseum* (1,0%) y *M. audouinii* (0.08%) (Martínez *et al.*, 2012). Asimismo, en otros trabajos, se han reportado diferencias en la prevalencia de los dermatofitos, como el de Jha *et al.* (2012) quienes encontraron como el género más común a *Trichophyton*, seguido de *Epidermophyton*. Por otro lado, Kannan *et al.* (2006) encontraron que *T. rubrum* (73%) es la especie más común, seguido de *T. mentagrophytes* (17%), *T. violaceum* y, finalmente, *E. floccosum*. Las diferencias entre los diferentes estudios pueden explicarse por varios factores, tales como la migración de personas de una región a otra, el medio y el estilo de vida de los pacientes, así como el cambio climático, entre otros.

La identificación de los aislados a partir de la macromorfología no fue diferente a lo reportado en la literatura para las especies de interés clínico, a pesar de la diversidad morfológica de las colonias, ya que solo se observaron pequeños cambios en el aspecto de la colonia, el tiempo de crecimiento y la variabilidad del pigmento. Además, algunos aislados presentaron una baja esporulación, como el GT25, identificado como *T. rubrum*, o una nula esporulación, como en el caso del

aislado GT64, identificado como *M. canis*, el que después de varias resiembras, perdió su habilidad para esporular, quedando como un hongo estéril, de manera que se hace extremadamente difícil identificar a los dermatofitos por características fenotípicas. Con el propósito de identificar adecuadamente a los dermatofitos, se utilizaron dos medios de cultivo, el APD y Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol. Los resultados mostraron que ambos medios son técnicamente buenos; sin embargo se evidenciaron pequeñas diferencias. En el medio APD, los aislados presentaron mayor crecimiento y esporulación de las colonias, el tiempo de crecimiento fue menor y hubo desarrollo de pigmento. Esto es debido a que el medio APD es muy rico en fuentes de carbono, como dextrosa, lo que conlleva a que el hongo genere un crecimiento puramente vegetativo, no existiendo un estrés fisiológico que induzca la esporulación (Mustafa y Kaur, 2009). Una desventaja que presentó este medio fue la alta contaminación con hongos oportunistas; mientras que en el medio Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol, la contaminación por hongos oportunistas fue muy baja debido a que estos son inhibidos por la cicloheximida. Además, el cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro con efecto inhibitor para una amplia variedad de bacterias Gram positivas y negativas; sin embargo, en este medio se observó el fenómeno de pleomorfismo en el aislado GT39, identificado como *T. mentagrophytes* (Tabla 2) y en los aislados GT12, GT20 y GT64 identificados como *M. canis* (Tabla 5). Una explicación del fenómeno de pleomorfismo es por una mutación que no es autoinducible ni se relaciona con la edad de la célula o colonia precursora (Page y Stock, 1972). Por otro lado, el pleomorfismo es el resultado de mutaciones de un

simple gen cromosómico, dando como resultado una disminución de la conidación, lo que resulta en la incapacidad del hongo para equilibrar el alargamiento de las hifas vegetativas y desarrollo de esporas, posiblemente debido a alteraciones de las vías enzimáticas involucradas en la síntesis de la pared celular o de la membrana (Weitzman, 1964).

Por otro lado, el análisis filogenético, a través del método de Máxima Verosimilitud, permitió reubicar a 52 aislados de dermatofitos (Tabla 6). Los aislados identificados por métodos fenotípicos como *M. canis* (GT12, GT14, GT20, GT53, GT56, GT60, GT61, GT64 y GT66) y *M. nanum* (GT01, GT19 y GT46) en el análisis genotípico, se identificaron como *A. otae* y *A. obtusum* respectivamente. Es interesante mencionar que el método genotípico identificó la fase teleomorfa de los dermatofitos y los métodos fenotípicos no son eficientes para identificar esta fase del hongo. Por otro lado, en el subgrupo **Ia**, el aislado GT57 no se identificó correctamente, ya que se encuentra entre las secuencias de referencia correspondientes a *T. mentagrophytes* y *T. quinckeanum*, también en el subgrupo **VIIa**. Los aislados GT04, GT26, GT28, GT47 y GT49 no fueron identificados con el marcador molecular utilizado, por lo que, para obtener una correcta identificación de las especies, es necesario aumentar el número de marcadores moleculares, entre los que se sugieren las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS), quitina sintasa 1 (*CHS1*), el factor de enlogación de traducción 1 $\alpha$  (*Tef-1 $\alpha$* ), el gen de la calmodulina y el de topoisomerasa II (*TOP-II*).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los métodos fenotípicos presentan limitaciones, ya que la identificación de los dermatofitos, con base en observaciones macro y microscópicas, no permite la identificación a nivel de especie. Sin embargo, la identificación es complicada y laboriosa debido a la similitud morfológica y variabilidad mostrada por estos hongos. Con respecto al cultivo, éste se ha considerado el estándar de oro para el aislamiento e identificación de dermatofitos; sin embargo, la identificación a partir de los cultivos con KOH (hidróxido de potasio) al 10%/DMSO (dimetil sulfóxido) muestran una sensibilidad y especificidad del 88.2% y del 76% para el DMSO al 40% (Girgis *et al.*, 2005; Shalaby *et al.*, 2016), por lo que debido a estas diferencias, en algunas ocasiones no es posible identificar correctamente el agente etiológico, además el cultivo para identificar un patógeno específico, puede llevar un largo período de incubación (Hainer, 2003). Así mismo, la variación en las características microscópicas y del cultivo, por ejemplo entre *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, es considerable y pueden cambiar notablemente en el subcultivo de rutina, por lo que la tasa de falsos negativos del cultivo de hongos es de aproximadamente 30% y la sensibilidad de aproximadamente 60% (Garg *et al.*, 2009). La mayoría de los aislamientos de dermatofitos obtenidos de pacientes con tratamiento antifúngico con corticoesteroides, generalmente no muestran una morfología característica en el cultivo, lo que hace más difícil su identificación (Liu *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 2017). Por estas observaciones, no se puede confiar en los resultados de la identificación fenotípica para establecer el diagnóstico de una dermatofitosis, ya que en ocasiones no se puede detectar la morfología característica de los géneros

y carece de especificidad suficiente, aunque es altamente eficiente como una técnica de detección, antes de iniciar la terapia, debido al gasto, la duración y los posibles efectos adversos del tratamiento (Tampieri, 2004). Finalmente, debido a la variabilidad fenotípica y genotípica de los dermatofitos en diferentes países del mundo, se han observado cambios en los perfiles de las dermatofitosis humanas, que ha llevado al desarrollo de nuevos métodos para un diagnóstico más preciso (Liu *et al.*, 1997; Shiraki *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2003).

Es importante mencionar que para determinar el tamaño correcto de los conidios de las especies identificadas de dermatofitos, sólo se tomó en cuenta el análisis genotípico. El diámetro de los microconidios de los aislados de Guatemala correspondientes a *T. rubrum* (1.28  $\mu\text{m}$ ), *M. gypseum* (1.84  $\mu\text{m}$ ) y *M. canis* (1.56  $\mu\text{m}$ ), mostraron un menor tamaño que lo reportado en la literatura, mientras que *T. interdigitale*, reveló valores dentro de los reportados en la literatura (Kwon-Chung y Bennett, 1992). Por otro lado, en el caso de los macroconidios de *T. interdigitale*, con tamaños de 3.45  $\mu\text{m}$ , se encontraron por debajo de lo reportado en la literatura, mientras que el valor para *A. obtusum* (8.49  $\mu\text{m}$ ) se encuentra por arriba de lo reportado, sin embargo, la cantidad de lóculos presentes en ambos casos corresponde a lo reportado en la literatura (Kwon-Chung y Bennett, 1992). Los macroconidios de las especies *M. canis*, *M. gypseum* y *A. incurvatum* también mostraron valores dentro de lo reportado en la literatura (Kwon-Chung y Bennett, 1992). Las diferencias en el tamaño de los conidios en los aislados de diferentes

regiones geográficas puede explicarse por la geografía, el ambiente, el clima y la ocupación del huésped (Nweze y Okafor, 2005).

## **CONCLUSIONES**

1. Los métodos fenotípicos no permitieron una precisa identificación de las especies de los dermatofitos.
2. Los resultados del estudio filogenético con el gen *BT2* identificó a la mayoría de las especies.
3. El marcador *BT2* identificó la fase teleomórfica de *M. incurvatum*, *M. canis* y *M. nanum*.
4. Los resultados resaltan la importancia de la utilización de métodos tanto convencionales como genotípicos para la identificación certera de las especies de dermatofitos, ya que una incorrecta identificación puede afectar directamente el tratamiento para el paciente y la clasificación taxonómica de los dermatofitos.

## **PERSPECTIVAS**

Elaborar un estudio filogenético con una cantidad mayor de muestras clínicas de dermatofitos procedente de Latinoamérica, utilizando métodos fenotípicos y genotípicos, ya que no se han encontrado trabajos a nivel filogenético, en esta área geográfica.

## REFERENCIAS

1. Ahmadi B, Mirhendi H, Shidfar MR, Nouripour-Sisakht S, Jalalizand N, Geramishoar M, Shokoohi GR. A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophytes isolates. *J Mycol Med.* 2015; 25 (1): 29-35.
2. Ahmadi B, Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Shidfar MR, Nouripour-Sisakht S, Jalalizand N. Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. *Med Mycol.* 2016; 54 (5): 500-514.
3. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25 (17): 3389-3402.
4. Amer M, Taha M, Tosson Z, El-Garf A. The frequency of causative dermatophytes in Egypt. *Int J Dermatol.* 1981; 20 (6): 431-434.
5. Assis-Santos D, Carvalho-Araújo RA, Soares-Hamdan J, Silva-Cisalpino P. *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton. interdigitale*: genetic diversity among species and strains by random amplified polymorphic DNA method. *Mycopathologia.* 2010; 169 (4): 247-255.
6. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Peterson S, Brandt ME, Pappas PG, Chiller T. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol.* 2009; 47 (47): 3138-3141.

7. Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. Dermatophyte fungi: infections, diagnosis and treatment. *SMU Medical Journal*. 2014; 1 (2): 50-62.
8. Caceres A, Lopéz BR, Giron MA, Logemann H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *J Ethnopharmacol*. 1991; 31 (3): 263-276.
9. Cafarchia C, Iatta R, Latrofa MS, Gräser Y, Otranto D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol*. 2013; 20: 336-351.
10. de Bièvre C, Dauguet C, Nguyen VH, Ibrahim-Granet O. Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1987; 138 (6): 719-727.
11. de Hoog GS., Guarro, J, Gene, J, Figueras MJ, 2000. Atlas of Clinical Fungi (2<sup>nd</sup> Edition). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
12. de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, Kupsch C, Stielow JB, Freeke J, Göker M, Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Gräser Y. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017; 182 (1-2): 5-31.
13. Emele FE, Oyeka CA. *Tinea capitis* among primary school children in Anambra state of Nigeria. *Mycoses*. 2008; 51 (6): 536-541.
14. Faggi E, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonzo E, Mancianti F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (9): 3382-3385.



15. Frías-De León MG, Zavala-Ramírez M, Córdoba S, Zúñiga G, Duarte-Escalante E, Pérez-Torres A, Zepeda-Rodríguez A, López-Martínez I, Buitrago MJ, Reyes-Montes MR. Phenotypic characteristics of isolates of *Aspergillus* section *Fumigati* from different geographic origins and their relationships with genotypic characteristics. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 116.
16. Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati AK, Nath G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. *BMC Res Notes.* 2009; 2: 60.
17. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (10): 4930-4942.
18. Girgis SA, Zu El-Fakkar NM, Zu, Badr H, Shaker OA, Metwally FE, Bassim HH. Genotypic identification and antifungal susceptibility pattern of dermatophytes isolated from clinical specimens of dermatophytosis in Egyptian patients. *Egypt Dermatol Online J.* 2006; 2 (2): 1-23.
19. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(4): 1323–1330.
20. Gräser Y, el Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol.* 1998; 138 (4): 576-582.
21. Gräser Y, Kuijper AF, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.* 1999; 37 (5): 315-330.

22. Gräser Y, Fröhlich J, Presber W, de Hoog GS. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. J Mycol Med Microbiol. 2007; 56: 1058-1065.
23. Gräser, Y, Kuijpers AFA, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. J. Clin. Microbiol. 2000; 38 (9): 3329-3336.
24. Gupta AK, Kohli Y, Summerbell R. Variation in restriction fragment length polymorphisms among serial isolates from patients with *Trichophyton rubrum* infection. J Clin Microbiol. 2001; 39 (9): 3260-3266.
25. Hainer BL. Dermatophyte infections. Am Fam Physician. 2003; 67 (1): 101-108.
26. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 1999; 41: 95-98.
27. 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.
28. Jha BK, Murthy SM, Devi NL. Molecular identification of dermatophytosis by polymerase chain reaction (PCR) and detection of source of infection by restricted fragment length polymorphism (RFLP). JCMS Nepal. 2012; 8 (4): 7-15.
29. Kanbe T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. Mycopathologia. 2008; 166 (5-6): 307-317.

30. Kannan P, Janaki C, Selvi GS. Prevalence of dermatophytes and other fungal agents isolated from clinical samples. *Indian J Med Microbiol.* 2006; 24 (3): 212-215.
31. Kaszubiak A, Klein S, de Hoog GS, Gräser Y. Population structure and evolutionary origins of *Microsporium canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. *Infect Genet Evo.* 2004; 4 (3): 179-186.
32. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33 (7): 1870-1874.
33. Kwon-Chung J, Bennett JE. "Dermatophytoses". 1992. In: *Medical Mycology*. Lea, Febiger, Malvern PA, Chapter 6, pp. 105-161.
34. Liu, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Rapid differentiation of *Microsporium* dermatophytes based on arbitrarily primed PCR amplification. *Opportun Pathogens.* 1997; 9 (1): 3-6.
35. Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. Phylogenetic classification of *T. mentagrophytes* complex stains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol.* 1998; 36 (9): 2629-2633.
36. Martínez E, de León S, Pérez E, Pacheco A, Rivas E, Borjas C, Arenas R. *Tinea capitis*. Informe de 60 casos con parasitación pilar y/o agente causal confirmado. *Dermatología CMQ.* 2009; 7 (2): 98-101.

37. Martínez E, Matta V, Carias J, Porras C, Logeman H, Arenas R. Dermatofitos y dermatofitosis: frecuencia en Guatemala durante el periodo de mayo 2008 a junio de 2009. *Revista Científica*. 2012; 22 (1): 19-23.
38. Martínez E, Tejeda D, Bonifaz A. Onicomycosis distrófica total causada por *Microsporium nanum*. *Dermatol Rev Mex*. 2013a; 57: 271-273.
39. Martínez E, Ameen M, Tejeda D, Arenas R. *Microsporium* spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. *Braz J Infect Dis*. 2013b; 18 (2): 181-186.
40. Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Rezaei-Matehkolaei A, Najafzadeh MJ, Umeda Y, Ahmadi B. Translation elongation factor 1- $\alpha$  gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Med Mycol*. 2015; 53 (3): 215-224.
41. Mochinzuki T, Sugie N, Uehara M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses*. 1997; 40 (11-12): 405-409.
42. Mostert L, Groenewald JZ, Summerbell RC Robert V, Sutton DA, Padhye AA, Crous PW. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (4): 1752-1767.
43. Mustafa U, Kaur G. Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *Afr. J. Agric. Res*. 2009; 3 (10): 922-930.

44. Nenoff P, Erhard M, Simon JC, Muylowa GK, Herrmann J, Rataj W, Gräser Y. MALDI-TOF mass spectrometry – a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med. Mycol.* 2013; 51 (1): 17–24.
45. Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia.* 1992; 117 (3): 127-132.
46. Nweze EI, Okafor JI. Prevalence of dermatophytic fungal infections in children: a recent study in Anambra State, Nigeria. *Mycopathologia.* 2005; 160 (3): 239-243.
47. O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol.* 1997; 7 (1): 103–116.
48. Ohst T, de Hoog GS, Presber W, Stavrakieva V, Gräser Y. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*- *Trichophyton violaceum* clade (dermatophytes). *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (10): 4444-4448.
49. Padhye AA, Young CN, Ajello L. 1980. Hair perforation as a diagnostic criterion in the identification of *Epidermophyton*, *Microsporum*, and *Trichophyton* species. In: proceedings of the fifth international conference on the mycoses (Scientific publication no: 396). Washington, DC: Pan American Health Organization. p. 115–20.
50. Page WJ, Stock JJ. Initiation of dermatophyte pleomorphic strain sporulation by increased aeration. *Appl Microbiol.* 1972; 24 (4): 650-657.

51. Pasquetii M, Peano A, Soglia D, Min AR, Pankewitz F, Ohst T, Gräser Y. Development and validation of microsatellite marker-based for tracing infections by *Microsporum canis*. J Dermatol Sci. 2013; 70 (2): 123-129.
52. Posada D, Crandall KA. ModelTest: testing the best-fit model of nucleotide substitution. Bioinformatics. 1998; 14 (9): 817-818.
53. Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetic: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio. Syst Biol. 2004; 53 (5): 793-808.
54. Rebell G, Taplin D. 1978. Dermatophytes: their Recognition and Identification, revised ed. Coral Gables: University of Miami Press.
55. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Shidfar MR, Zaini F, Eshraghian MR, Jalalizand N, Nouripour-Sisakht S, Hosseinpour L, Mirhendi H. Use of single-enzyme PCR-restriction digestion barcode targeting the internal transcribed spacers (ITS rDNA) to identify dermatophyte species. Iran J Public Health. 2012; 41 (3): 82-94.
56. Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Satoh K, Najafzadeh MJ, Shidfar MR. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. Med Mycol. 2014; 52 (7): 674-688.
57. Rezusta A, Rubio MC, Alejandre MC. Differentiation between *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* by sorbitol assimilation. J Clin Microbiol. 1991; 29 (1): 219-220.
58. Ridell R. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycology. 1950; 42 (2): 265-270.

59. Serra R, Peterson SW. *Penicillium astrolabium* and *Penicillium neocrassum*, two new species isolated from grapes and their phylogenetic placement in the *P. olsonii* and *P. brevicompactum* clade. *Mycologia*. 2007; 99 (1): 78-87.
60. Shalaby MF, El-Din AN, El-Hamd MA. Isolation, identification, and *in vitro* antifungal susceptibility testing of dermatophytes from clinical samples at Sohag University Hospital in Egypt. *Electron Physician*. 2016; 8 (6): 2557-2567.
61. Shiraki Y, Soda N, Hirose N, Hiruma M. Screening examination and management of dermatophytosis by *Trichophyton tonsurans* in the judo club of a university. *Jpn J Med Mycol*. 2004; 45 (1): 7-12.
62. Summerbell RC, Rosenthal SA, Kane J. Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species. *J Clin Microbiol*. 1988; 26 (11): 2279-2282.
63. Tampieri MP. Actuality on diagnosis of dermatomycosis. *Parassitologia*. 2004; 46 (1-2): 183-186.
64. Urano S, Shirai S, Suzuki Y, Sugaya K, Takigawa M, Mochizuki T. A case of *Tinea capitis* caused by *Trichophyton tonsurans*. *Jpn J Med Mycol*. 2003; 44 (1): 25-29.
65. Verma S, Madhu R. The great Indian epidemic of superficial dermatophytosis: an appraisal. *Indian J Dermatol*. 2017; 62 (3): 227-236.
66. Weitzman I. Variation in *Microsporum gypseum*. I. A genetic study of pleomorphism. *Sabouraudia*. 1964; 3 (3): 195-204.

67. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8 (2): 240-259.
68. Williams RH, Ward E, McCartney HA. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for the detection of airborne fungal spores. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67 (6): 2453-2459.