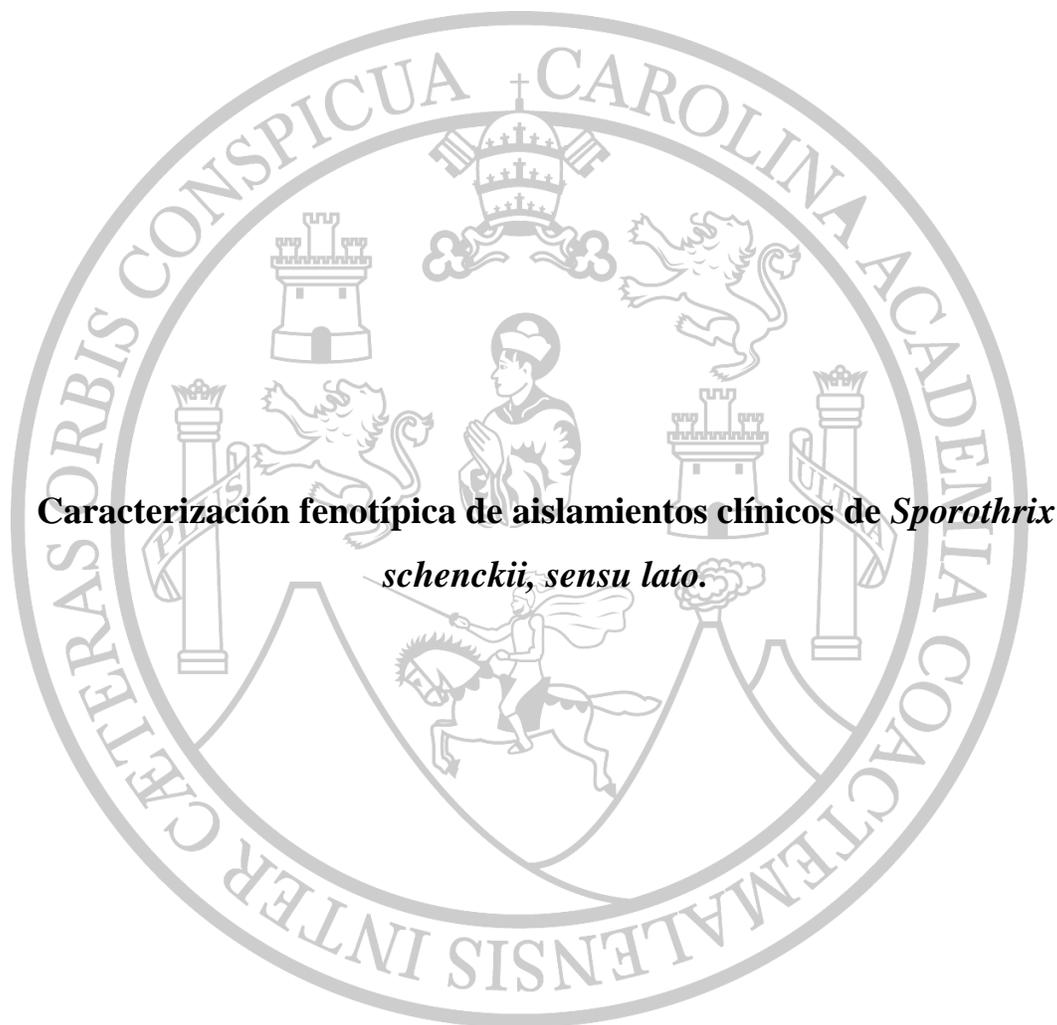


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**Caracterización fenotípica de aislamientos clínicos de *Sporothrix
schenckii, sensu lato.***

Amanda Marisol Vásquez del Cid

Jackeline Julissa Castillo Reyes

QUÍMICAS BIÓLOGAS

Guatemala, Octubre de 2017

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



Caracterización fenotípica de aislamientos clínicos de *Sporothrix schenckii*, sensu lato.

Seminario de Investigación

Presentado por

Amanda Marisol Vásquez del Cid

Jackeline Julissa Castillo Reyes

**Para optar al título de
QUÍMICAS BIÓLOGAS**

Guatemala, Octubre de 2017

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M. A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A Dios por dirigir cada paso de nuestras vidas y darnos la oportunidad de culminar nuestra carrera universitaria, brindándonos siempre su sabiduría y amor.

A nuestros padres por su esfuerzo, cariño y consejos brindados en cada etapa de nuestras vidas e impulsarnos incansablemente en la búsqueda del éxito. A nuestros hermanos por su apoyo incondicional.

A nuestros amigos y todas las personas que nos han brindado su apoyo y motivado durante este proceso.

A nuestros asesores Lic. Osberth Morales Esquivel y Dra. Heidi Logemann, por su tiempo, confianza, paciencia, guiarnos y compartir con nosotras sus conocimientos en el campo de la investigación para la realización de este estudio.

Al laboratorio Clínico Candelaria y Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por abrirnos las puertas a sus instalaciones y brindarnos el apoyo para poder realizar esta investigación.

A nuestra revisora Licda. María Luisa García de López por su paciencia y apoyo en cada revisión.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Química Biológica, por abrirnos sus puertas y darnos el privilegio de ser egresadas de esta gloriosa casa de estudios.

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
III.	ANTECEDENTES	3
A.	Historia	3
B.	Género <i>Sporothrix</i>	3
1.	Características macroscópicas, microscópicas y moleculares de las especies del complejo <i>Sporothrix schenckii</i>	4
2.	Pruebas de laboratorio para la identificación de las especies del complejo <i>Sporothrix schenckii</i>	6
Estructura celular de las especies de <i>Sporothrix</i>		7
3.	Factores de virulencia	9
C.	Esporotricosis	12
1.	La Esporotricosis en Europa	13
2.	La Esporotricosis en América.....	13
3.	Estudios realizados en Guatemala	14
D.	Tratamiento.....	14
IV.	JUSTIFICACIÓN	16
V.	OBJETIVOS	17
VI.	HIPÓTESIS	18
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
VIII.	RESULTADOS	28
IX.	DISCUSIÓN	34
X.	CONCLUSIONES.....	38
XI.	RECOMENDACIONES.....	39
XII.	REFERENCIAS.....	40
XIII.	ANEXOS	45

I. RESUMEN

La esporotricosis es una enfermedad causada por hongos dimórficos que pertenecen al género *Sporothrix* y puede afectar a ambos sexos y a cualquier edad. La distribución de la enfermedad depende de la exposición ocupacional de los afectados (Lyon et al., 2003).

En Guatemala la enfermedad fue diagnosticada por primera vez en el año 1931 y, a partir de eso hasta 1963 se habían descubierto 43 casos en los que la mayoría de pacientes residían en zonas templadas y húmedas (Mayorga, Cáceres, Toriello, Gutiérrez, Ramírez & Mariat, 1978). Posteriormente se informó que hasta el año 1994 el número de casos diagnosticados era 285 (Logemann, 1995). A partir de esa fecha no se tienen datos concretos publicados, sin embargo se han realizado varios aislamientos a partir de muestras clínicas en diversos laboratorios clínicos nacionales y privados del país.

En el presente trabajo se estudiaron 11 cepas de *Sporothrix* spp aisladas a partir de muestras clínicas procedentes de pacientes diagnosticados con esporotricosis y que acudieron al Laboratorio Clínico Micológico Candelaria y al Servicio de Micología de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Las cepas fueron evaluadas por medio de técnicas bioquímicas, así como macro y micromorfológicas.

Seis de las cepas se identificaron como *S. albicans* (55%), tres como *S. globosa* (27%) y dos como *S. schenckii* (18%), lo cual evidenció la presencia de tres de las especies del complejo *S. schenckii* en el país. Lo anterior es de suma importancia debido a que existen tratamientos específicos para la esporotricosis según la especie que la produzca, por lo que se hace de vital importancia la correcta identificación de los aislamientos.

II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La Esporotricosis es una micosis que afecta al tejido cutáneo, subcutáneo y se disemina a través de los vasos linfáticos adyacentes y llega a dañar órganos internos. Los agentes distribuidos en la naturaleza con focos endémicos alrededor del mundo. En Guatemala, esta enfermedad ocupa el primer lugar de las micosis subcutáneas, debido al clima cálido y posiblemente a que uno de los factores predisponentes es de carácter ocupacional (granjeros, agricultores, jardineros, pescadores, entre otros).

Recientemente se ha descubierto que varias especies del género *Sporothrix* son causantes de esporotricosis en el mundo, las cuales se han designado como *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. luriei*, *S. albicans* y *S. mexicana*, quienes presentan características clínicas similares, sin embargo, se pueden diferenciar a través de la evaluación del crecimiento en diferentes temperaturas de incubación y medios de cultivo, observar la morfología microscópica en dichas condiciones, determinar características macroscópicas de las colonias, así como asimilación de azúcares para lograr su identificación a nivel de especie.

Por tal razón, este seminario tuvo como objetivo identificar las cepas clasificadas como *Sporothrix schenckii* que se encuentran depositadas en el cepario del Laboratorio de Micología y del Laboratorio Clínico Micológico Candelaria, para clasificarlas en las distintas especies que conforman el complejo *Sporothrix*. Asimismo, forma parte del proyecto Macro, Micosis endémicas de Guatemala, que se ejecuta en Departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

III. ANTECEDENTES

A. Historia

Sporothrix schenckii fue aislado por primera vez en 1896 por Benjamin Schenck, un estudiante de medicina del Hospital Johns Hopkins de Baltimore, Estados Unidos. La cepa se obtuvo a partir de una lesión localizada en la mano y brazo derecho de un paciente masculino de 36 años y fue estudiado por el micólogo Erwin Smith, quien concluyó que el hongo pertenecía al género *Sporothrix*. Previamente Linck en 1809 y Lutz en 1889 hicieron referencia a casos de esporotricosis por medio de aislamientos que no fueron identificadas con certeza (Bastos, Almeida & Oliveira, 2011). Posteriormente en 1900, Hektoen y Perkins describieron el caso de un niño que sufrió una herida en el dedo, la cual presentó regresión espontánea y concluyeron que fue causada por la especie *S. schenckii* (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

En 1903, Sabouraud sugirió a Beurmann y Gougerot usar yoduro de potasio como tratamiento para la esporotricosis, la cual era una enfermedad común en Francia a principios del siglo 20 y obtuvieron resultados satisfactorios (Sánchez-Saldaña, Galarza y Mantos-Sánchez, 2009).

El primer caso reportado en animales fue descrito en 1907 por Lutz y Splendore en Brasil, al encontrar ratas infectadas, de manera que se consideró la posibilidad de que la micosis fuera contagiada de animales a la población humana. También se detectó cuerpos en forma de asteroide alrededor de células levaduriformes de *Sporothrix*, lo cual constituyó una herramienta útil para el diagnóstico histológico (Lutz & Splendore, 1907).

B. Género *Sporothrix*

Durante muchos años, el género *Sporothrix* fue clasificado en la división Eumycota, subdivisión Deuteromycota, Orden Monilia y familia Moniliaceae. Sin embargo, luego de la revisión taxonómica realizada por de Hoog & Guarro (1995), este hongo fue reclasificado

en el *Phylum* Ascomycota, clase Pyrenomycetes, orden Ophiostomatales y familia Ophiostomataceae, aunque dicha clasificación aún es controversial.

La inclusión de *Sporothrix* en la familia Ophiostomataceae se basó en estudios que indicaron que los hongos *Ceratocystis stenoceras/Ophiostoma stenoceras* presentan una morfología conidial similar a la de *S. schenckii* (Travassos, 1989). Por otra parte, otros investigadores han postulado que *O. stenoceras* puede corresponder al estado teleomorfo de *S. schenckii* (Lacaz, Porto, Martins, Heins-Vacari y Melo, 2002). Recientemente, estudios basados en experimentos de hibridación de ADN, aportaron fuerte evidencia respecto a que *O. stenoceras* no es el teleomorfo de *S. schenckii*. El grado de hibridación observada entre *S. schenckii* y *O. stenoceras* ADN era tan baja como el 30%, mientras que se observó un alto grado de hibridación cruzada entre las cuatro cepas de *S. schenckii* estudiadas (Lopes-Bezerra, Schubach & Costa, 2006).

1. Características macroscópicas, microscópicas y moleculares de las especies del complejo *Sporothrix schenckii* (*Sporothrix* spp)

Sporothrix spp, está integrado por especies de hongos dimórficos con una fase micelial y una fase levaduriforme. *In vitro*, las fases de micelio y levadura pueden ser obtenidas por cultivo a 25°C y 37°C, respectivamente, o mediante la variación del medio de cultivo. Factores tales como la aireación, la tensión de CO₂, el pH, la fuente de carbono y la presencia de cationes divalentes pueden influir en la transición morfológica. Sin embargo, la temperatura es un factor determinante en el dimorfismo (Lòpes-Becerra et al., 2006).

Las cepas aisladas en la naturaleza varían en su capacidad de crecer a 37°C, por lo que la infección podría ser un proceso de selección de aquellas cepas que crecen a mayores temperaturas y adaptarse al tejido animal (Pang, Wu, Huang & Tying, 2004).

La forma filamentosa o micelial es de utilidad para observar las características macroscópicas, en la que presenta colonias de crecimiento lento aproximadamente de 3 a 5 días, inicialmente de color blanco con apariencia húmeda. A medida que envejecen

adquieren apariencia dura y arrugada de color marrón o negro en su totalidad o en zonas, lo que se debe a la producción de conidios pigmentados. Microscópicamente se observan hifas delgadas de 1.0-2.0 μm de diámetro, con conidióforos perpendiculares cuyo extremo distal se dilata formando una vesícula denticulada de la que nacen conidios simpodiales hialinos de 2.0-3.0 x 3.0-6.0 μm , que se agrupan en forma de ramillete o margarita. Algunas cepas forman conidios de mayor tamaño, triangulares, pigmentados y de pared gruesa, más resistentes, llamados raduloconidios. La morfología puede estimularse en los medios de harina de maíz o Czapek (Nicot & Mariat, 1973).

Macroscópicamente las colonias de levaduras presentan color blanco con aspecto cremoso o ligeramente amarillentas, acuminadas, similares a colonias bacterianas en medios de cultivo como infusión de cerebro y corazón. Microscópicamente poseen forma variable: redondas, ovoides, fusiformes, con gemación única o múltiple, con tamaño promedio de 1.0-3.0 x 3.0-10.0 μm (Vásquez-del-Mercado, Arenas & Padilla-Desgarenes, 2012).

En los últimos años se han desarrollado métodos basados en el reconocimiento del ADN para identificar aislamientos fúngicos, lo cual ha reducido el tiempo para realizar el diagnóstico, en comparación con los métodos tradicionales basados en la identificación morfológica y fisiológica. Los diagnósticos se realizan utilizando prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual se basa en la amplificación de secuencias genéticas de *Sporothrix* sp. Los resultados mostraron alta especificidad (Watanabe, Kawasaki, Mochizuki & Ishizaki, 2004).

Estudios sobre cepas de *S. schenckii* de fragmentos de restricción (RFLP) de genes blanco, ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), secuenciación del ADN de transcriptor interna espaciador (ITS), regiones del gen de ARN ribosomal (rRNA), PCR dirigida al gen ADN topoisomerasa II, amplificaciones del fragmento (AFLP), demostraron que dichas cepas poseen diferentes características genéticas y que no pertenecen a la misma especie (Watanabe et al., 2004).

Los hallazgos moleculares en combinación con características fenotípicas permitieron concluir que el complejo *S. schenckii*, estaba constituido por las especies *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* y *S. schenckii*. Se determinó que *S. schenckii* tiene una distribución mundial, *S. mexicana* está restringida a México y *S. brasiliensis* a Brasil (Marimon, Gené, Cano & Guarro, 2008).

2. Pruebas de laboratorio para la identificación de las especies del complejo

Sporothrix schenckii

Actualmente no es indispensable la biología molecular para la diferenciación de las especies que conforman el complejo, ya que se pueden identificar a través de características tanto fisiológicas como morfológicas de las colonias. El protocolo para identificación de especies de *Sporothrix* requiere evaluar la asimilación de sucrosa y rafinosa, medición del diámetro de crecimiento en agar papa dextrosa (PDA), luego de 21 días a 30 y 37°C, la formación de raduloconidios y establecer la coloración de las colonias en agar harina de maíz (CMA) durante 12 días a 30°C (Marimon, Cano, Gené, Sutton, Kawasaki & Guarro, 2007; Bastos et al., 2011; Oliveira, Almeida-Paes, Muniz, Gutierrez-Galhardo & Zancoppe-Oliveira, 2011).

La utilización de sucrosa es la primera prueba a realizarse. Si dicha asimilación es negativa, se evalúa el crecimiento de la cepa en agar PDA a 37°C. Si las colonias tienen un diámetro menor a 30 mm y se encuentran presentes los raduloconidios, la cepa en estudio corresponde a *S. brasiliensis*. Si las colonias presentan un diámetro mayor a 30 mm y no hay raduloconidios, la cepa corresponde a *S. luriei* (Marimon et al., 2007; Bastos et al., 2011; Oliveira et al., 2011).

Si la asimilación de sucrosa es positiva, se evalúa el crecimiento de la cepa en PDA a 30°C. Si las colonias presentan un diámetro menor a 50 mm, se realiza la asimilación de rafinosa. Si el resultado de dicha prueba es positivo, la cepa corresponde a *S. schenckii* y si es negativo, corresponde a *S. globosa*. Por otra parte, si la cepa alcanza un diámetro mayor a 50 mm, de igual forma se realiza la asimilación de rafinosa. Si la prueba es negativa, se

evalúa el crecimiento en CMA a 30°C. Si se producen colonias blancas, la cepa corresponde a *S. albicans*. Si las colonias presentan coloración café, corresponde a *S. mexicana*, según anexo No.1. (Marimon et al., 2007; Bastos et al., 2011; Oliveira et al., 2011).

Las especies incluidas dentro del género *Sporothrix* poseen dos tipos de conidios, los simpoduloconidios crecen en los extremos de los conidióforos y se encuentran dispuestos en forma de flor, pueden ser hialinos o ligeramente pigmentados, miden de 2-8 µm de largo por 1.5-2.5 µm de ancho. Los raduloconidios que crecen directamente de la hifa o del conidióforo, poseen doble pared celular y son de forma triangular, son de color marrón, miden de 2-6 µm por 2-3.5 µm de ancho. La presencia o ausencia de los últimos ayuda a la diferenciación entre especies. (Marimon et al., 2007). La presencia de raduloconidios permite la diferenciación entre dos especies *S. brasiliense* y *S. luriei* (Bastos et al., 2011).

Tabla 1. Clasificación de cepas del complejo *Sporothrix* spp.

Asimilación de sucrosa	≥50mm en PDA	≤50mm en PDA	Rafinosa	Resultados
Si	Si	No	No	<i>S. globosa</i>
Si	Si	No	Si	<i>S. schenckii</i>
Si	No	Si	No	<i>S. albicans</i>
Si	No	Si	Si	<i>S. mexicana</i>
Si	No	Si	Si/No	<i>S. luriei</i>

Fuente: Marimon et al., (2008a).

3. Estructura celular de las especies de *Sporothrix Schenkii*

La pared celular está compuesta por glucanos solubles e insolubles en álcali que se encuentran en ambas fases morfológicas de este hongo. Los glucanos solubles en álcali de la forma de levadura están unidos por enlaces β (1,3), β (1,6) y β (1,4), en 44, 28 y 28%, respectivamente. Los glucanos insolubles con enlaces β (1,3), β (1,6) y β (1,4) contienen 66, 29 y 5%, respectivamente (Previato, Gorin, Haskins & Travassos, 1979).

La presencia de melanina en la pared celular puede proteger al patógeno ya que elimina los radicales libres. Se han identificado componentes proteicos o glicoproteicos en la pared celular de este hongo. La capa más externa de la pared celular de *Sporothrix* spp consiste en un material amorfo microfibrilar, antes llamado material capsular, que se separa de la pared celular media. Estudios recientes han demostrado que dicha capa microfibrilar está implicado en la adhesión de este hongo a las células hospederas (Morris-Jones et al., 2003).

En la pared celular de la fase de levadura del complejo *S. schenckii* fue identificada una fracción glicoproteínica que contiene 33.5% de ramnosa, 57% de manosa y 14,2% ramnomanosa. Asimismo, se detectó un glicoconjugado que contiene ramnosa y manosa en una fracción aislada del filtrado del cultivo. La fracción glicopéptica (ramnomanosa) reacciona con sueros de pacientes con esporotricosis, así como con concanavalina A (ConA). Además, esta fracción inhibe la adhesión del hongo a las proteínas de la matriz extracelular, lo que sugiere la presencia de adhesinas en la superficie de este patógeno (Lima, Bouchara, Renier, Marot-Leblond, Chabasse & Lopes-Bezerra, 2004).

Además de ramnosa y manosa, también se han identificado polisacáridos que contienen galactosa, lo que sugiere la presencia de un galactomanosa. El péptido ramnogalactomanosa se obtuvo por extracción de células levaduriformes con desoxicolato y posterior cromatografía en una columna de dietilaminoetil (DEAE)-Sephadex. Los estudios estructurales sobre la fracción ramnomanosa obtenida por extracción con 2% de KOH a 100°C, mostraron la presencia de cadenas laterales de mono y diramnomanosa unidas a una cadena principal de 1 a 6 residuos de manosilo (Castillo, Tapia & Arciniegas, 1990).

La reactividad de la pared celular del complejo *Sporothrix* con ConA se ha observado por microscopía electrónica en ambas fases (miceliar y levaduriforme). El análisis inmunocitoquímico de antígenos en la capa más externa de células levaduriformes de *S. schenckii* reveló la presencia de antígenos debido a los anticuerpos policlonales localizados en regiones reactivas con ConA (Castillo et al., 1990). Aunque las cadenas ramnomanosa contienen epítomos antigénicos, hasta ahora se ha descrito que poseen ligandos de unión a

ConA en su estructura. Si se considera que la ramnomanosa no muestra reactividad con ConA en pruebas de doble difusión de precipitación, la fracción glicopéptido reacciona con esta lectina. Las cadenas de oligosacáridos O-ligados de ramnomanosa contienen hasta 5 unidades de monosacáridos y se caracterizan por la presencia de residuos D-manosa, D y L-ramnosa y ácido glucurónico (López, Mendoza-Previato, Fournet, Degand & Previato, 1992).

4. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son las características de un microorganismo que le permiten crecer dentro del hospedero. Para estudiar y caracterizar estos factores, se comparan las interacciones microorganismo-hospedero que expresan la sospecha de dichos factores y un aislado mutante que ha perdido la capacidad para expresarlo, lo cual se alcanza mediante mutagénesis inducida a través de estrategias moleculares (Hogan, Klein & Levitz, 1996).

El descubrimiento del origen de la virulencia microbiana ha sido el principal objetivo de varios estudios. La teoría más aceptada en la actualidad consiste en que las interacciones microbianas con otros organismos presentes en el hábitat natural del patógeno, ocasionan que este cree estrategias de supervivencia que tiendan a una mayor virulencia. Respecto a esta teoría, se sugiere que el origen de la virulencia en de las especies de *Sporothrix schenckii* debe estar relacionada con las interacciones intermicrobianas en su entorno. *Sporothrix* spp, al ser un hongo dimórfico que habita el suelo, es capaz de infectar protozoos como *Acanthamoeba castellanii*, utilizándolo como nutriente hasta matarlo. El ser humano al ingerir el protozoo también se infecta con dicho hongo (Casadevall, 2006).

Este comportamiento no se comparte con otros hongos patógenos que no tienen el suelo como hábitat, como por ejemplo *Candida albicans* y otros que no son patógenos como *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, los hongos dimórficos como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* y *Cryptococcus gattii*, si evidencian el mismo comportamiento que el *S. schenckii* cuando entran en contacto con *A. castellanii* (Steenbergen, Nosanchuk, Malliaris & Casadevall, 2004).

Dentro de los factores de virulencia del complejo *S. schenckii* que se conocen hasta el momento se encuentran la termotolerancia, la producción de melanina, la adhesión, la producción de peróxido de ergosterol y proteínas (Sandoval, Barbosa y Sabanero, 2009).

a. Termotolerancia

Las cepas de *Sporothrix* spp que son capaces de crecer a 35°C pero no a 37°C son incapaces de causar esporotricosis linfagítica pero pueden producir lesiones cutáneas, a diferencia de los hongos aislados del sistema linfático, lesiones diseminadas y extracutáneas que si se desarrollan a 37°C (Miller & Keeling, 2002). Resultados de estudios recientes demuestran que cepas de *Sporothrix* spp aisladas en Colombia, donde la mayoría de los pacientes afectados sufrían de lesión de tipo cutánea, mostraron alto crecimiento a 35°C e inhibición del mismo a 37°C (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

b. Melanina

Tanto la fase levaduriforme como la fase saprofitica de *Sporothrix* spp tienen la capacidad de sintetizar melanina, un compuesto insoluble altamente relacionado con la virulencia de varios hongos. La síntesis de melanina en los conidios de *Sporothrix* spp se produce a partir de la 1,8-dihidroxi-naftaleno. Macroscópicamente, solo la fase micelial produce melanina, sin embargo, se ha demostrado la producción de melanina en células levaduriformes *in vitro* durante la infección (Morris-Jones et al., 2003).

Recientemente, se ha demostrado *Sporothrix* spp también puede producir melanina utilizando compuestos fenólicos tales como 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) como sustrato, tanto en las formas filamentosas y levaduriformes. La síntesis de este compuesto está controlada por varios factores, tales como la temperatura, pH y condiciones nutricionales. Se ha demostrado que los conidios melanizados crean resistencia a la fagocitosis por macrófagos lo que permite que los primeros pasos de la infección se lleven a cabo (Romero-Martinez, Wheeler, Guerrero-Plata, Rico & Torres-Guerrero, 2000).

c. Adherencia

La adherencia primaria a las células endoteliales y epiteliales, así como a los componentes de la matriz extracelular es esencial para una efectiva invasión de los tejidos del hospedero. Tanto los conidios como las células levaduriformes de *Sporothrix* spp son capaces de reconocer tres glicoproteínas importantes de la matriz extracelular: fibronectina, laminina y colágeno tipo II (Lima, Figueredo, Previato, Mendonça-Previato, Morandi & Lopes, 2001). Algunos estudios han demostrado que el hongo tiene integrinas o adhesinas que reconocen la fibronectina humana. También se sabe que los receptores de fibronectina son diferentes de los receptores de laminina. Estos receptores están presentes en ambas fases, aunque la levaduriforme tiene una mayor capacidad para unirse a la matriz extracelular. La existencia de adhesinas favorece la adherencia a los tejidos del hospedero y la difusión del hongo (Ruiz-Baca, Toriello, Pérez-Torres, Sabanero-López, Villagomez-Castro & López-Romero, 2009).

d. Peróxido de ergosterol

Estudios sobre el análisis de lípidos de *Sporothrix* spp a través de métodos espectroscópicos, han identificado el peróxido de ergosterol proveniente de células de la fase de levadura y han determinado que dicho compuesto puede ser convertido en ergosterol. El peróxido de ergosterol actúa como mecanismo de protección para evadir especies reactivas de oxígeno durante la fagocitosis (Sgarbi, Ribeiro, Zeppone, Lopes, Angluster & Sales, 1997).

e. Proteínas

La función de las diferentes proteínas de *Sporothrix* spp en la virulencia aún no es clara, se cree que las fosfatasas ácidas actúan en la interacción hongo-macrófago, la ramnomanosa presente en la pared celular causa la depresión de la respuesta inmune. Una preparación antigénica de la fase levaduriforme de *S. schenckii* mostró la actividad

proteolítica contra diferentes subclases de IgG humanas, lo que sugiere que algunas proteínas secretadas pueden interferir con la respuesta inmune del huésped (Woods, 2003).

C. Esporotricosis

Es una enfermedad causada por el hongo dimorfo *Sporothrix* spp, ocasionada por inoculación traumática con material infectado. La forma más común de adquirir la enfermedad es por heridas provocadas por astillas, espinas, cortaduras, etc. En menor proporción se han reportado casos por manipulación de pescado, rasguños de gato, mordeduras de loros, perros o picaduras de insecto. Dentro de la población con mayor exposición ocupacional se encuentran los jardineros, trabajadores de la salud y mineros. La esporotricosis es de curso subagudo o crónico que provoca lesiones en el tejido cutáneo o subcutáneo formando nódulos ulcerados, eritematosos y/o verrucosos. Puede haber diseminación hematológica con posterior localización osteoarticular, en el sistema nervioso central, aparato genitourinario y ojos en el huésped inmunocompetente o enfermedad multifocal en el hospedero inmunodeprimido (Bastos et al., 2011).

La esporotricosis puede afectar a todas las edades y el número de casos de hombres y mujeres varía de una región a otra. La diferencia en la distribución de los casos según la edad y el sexo podría explicarse por el tipo de exposición a hongos (Lyon et al., 2003).

Por lo general se reportan casos aislados en familias pequeñas así como brotes profesionales. Las epidemias son raras y si están presentes se han relacionado con una única fuente de infección (Bustamante & Campos, 2001). La epidemia más grande documentada hasta el momento ocurrió en Sudáfrica, con cerca de 3,000 mineros de oro infectados con este hongo (Quintal, 2000).

El Instituto Evandro Chagas de Investigación Clínica (Brasil), en los años comprendidos entre 1998 hasta el 2004 diagnosticó 1,503 gatos, 64 perros y 756 humanos con esporotricosis (Schubach et al., 2006). Como regla general, la enfermedad felina ha precedido a enfermedades humanas y caninas, los individuos más afectados son los que tienen

contacto domiciliario o profesional con gatos con esporotricosis. En Río de Janeiro se reportó esporotricosis en 84.7% de humanos, de los cuales el 57.1% informó sobre arañazos o mordidas por parte de felinos infectados. En los gatos enfermos se aisló *Sporothrix* del 100 % de las lesiones cutáneas, 66.2 % de hisopados nasales, 41.8 % de hisopados orales y 39.5 % de las muestras de las uñas (Lopes-Becerra et al., 2006).

Los casos de esporotricosis a partir de enero de 2001 hasta noviembre de 2010 se reportaron en 407 artículos, de los cuales 83 se excluyen porque también presentaron información de otras enfermedades. De los 324 artículos restantes, 142 hacen referencias a humanos, 22 a animales y 119 a estudios de laboratorio. Las 324 publicaciones fueron realizadas por autores de 27 países y proporcionaron solamente información científica, por lo que no es posible correlacionar estos datos para establecer la prevalencia puntual de la enfermedad (Barros et al., 2004).

1. La Esporotricosis en Europa

El primer caso fue descrito en 1903 y más de 200 casos fueron reportados en los 10 años siguientes. Durante el siglo pasado fue una enfermedad común en Francia que posteriormente disminuyó su incidencia. En el 2009 se reportó nuevamente un caso en Francia y en el 2008 se encontró un caso en la región sur de Italia (Schubach et al., 2006).

2. La Esporotricosis en América

La esporotricosis es una enfermedad cosmopolita que predomina en áreas tropicales y subtropicales. En países como México es la causa más frecuente de micosis subcutáneas y profundas, en Uruguay, la mayoría de los casos están relacionados con la caza del armadillo, en cuyas madrigueras se aisló el hongo. En Brasil es una enfermedad frecuente entre manipuladores de la paja y a diferencia de otras zonas, se da principalmente en mujeres. En 1907 Lutz y Splendore reportaron el primer caso, además encontraron que era posible cultivar la forma de levadura *in vitro*. La mayor epidemia de esporotricosis debido a la transmisión zoonótica fue descrita en Río de Janeiro, Brasil. Otras áreas como Perú,

Estados Unidos especialmente en el Valle de Mississippi también se encuentran afectadas por dicha enfermedad (Mesa, 2001).

3. Estudios realizados en Guatemala

En el país, la enfermedad fue diagnosticada por primera vez por Morales en 1931. Posteriormente en 1937 Wiss encontró 9 casos más, de los cuales 4 residían en la parte norte del departamento de Santa Rosa, cerca del lago de Ayarza. En 1963, Solorzano reportó 34 nuevos casos donde ocho fueron observados en pacientes residentes del mismo departamento. Mayorga en 1978, reportó 80 casos de esporotricosis incluyendo los 34 anteriores y estableció que la mayoría de ellos fue de pacientes originarios principalmente de zonas templadas y húmedas (Mayorga, Cáceres, Toriello, Gutiérrez, Ramírez & Mariat, 1978).

S. schenckii fue aislado a partir de 27 de los 30 casos presentados en la epidemia de 1971-1972. El aislamiento se realizó en agar Sabouraud con antibióticos (Micosel). El diagnóstico de los 3 casos restantes se basó en el aspecto clínico de las lesiones. Se describió que en cada uno de los casos se observó una lesión papulosa sobre el dorso de la mano derecha, lugar donde el paciente sufrió una inoculación traumática (Logemann, 1995).

D. Tratamiento

En la mayoría de los casos en los que la infección es localizada, es efectiva la administración de solución saturada de yoduro de potasio e hipertermia local. Para el manejo de las formas extracutáneas y diseminadas se recurre a los azoles, polienos y alilaminas, aunque en pacientes con inmunodeficiencia el pronóstico no es bueno, pese al tratamiento antifúngico. (Arrillaga, Capilla, Fernández, Fariñas y Mayayo, 2010).

Los estudios *in vitro* han demostrado que las diferentes especies del complejo *Sporothrix* poseen distinta sensibilidad a los antifúngicos; por lo que la adecuada

identificación de la especie permitiría elegir la antimicoterapia idónea. (Arrillaga et al., 2010).

Según Marimon, Serena, Gené, Cano & Guarro (2008), en el estudio *in vitro* de susceptibilidad a antifúngicos de las cinco especies de *Sporothrix spp*, existe diferencia en el tratamiento de cada una de ellas. *S. mexicana* es sensible a todos los antifúngicos probados en el estudio los cuales son Anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC), voriconazol (VRC), posoconazol (PSC), eberconazol (EBC), micafungin (MFG), terbinafina (TRB), ketoconazol (KTC), flucytosin (5FC) y albaconazol (ABC). *S. albicans* es sensible a AMB, FLC, ITC, VRC, PSC, EBC, MFG, TRB, KTC y 5FC; *S. brasiliensis* es sensible a AMB, FLC, ABC, MFG, TRB, KTC y 5FC, mientras que *S. schenckii* es sensible a AMB, FLC, ITC, VRC, PSC, ABC, EBC, MFG, TRB y 5FC, en tanto que *S. globosa* es sensible a AMB, FLC, ITC, VRC, RVC, ABC, EBC, MFG, TRB y 5FC.

Tabla 2. Sensibilidad de antifúngicos para esporotricosis

		Especie				
Antifúngico		<i>S. mexicana</i>	<i>S. albicans</i>	<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	<i>S. globosa</i>
AMB	Anfotericina B	S	S	S	S	S
FLC	Fluconazol	S	S	S	S	S
ITC	Itraconazol	S	S	R	S	S
VRC	Voriconazol	S	S	R	S	S
PSC	Posoconazol	S	S	R	S	R
EBC	Eberconazol	S	S	R	S	S
MFG	Micafungin	S	S	S	S	S
TRB	Terbinafina	S	S	S	S	S
KTC	Ketoconazol	S	S	S	R	R
5FC	Flucytosin	S	R	S	S	S
ABC	Albaconazol	S	R	S	S	S

. **Fuente:** Marimon et al. (2008b). *S: sensible; R: resistente.

IV. JUSTIFICACIÓN

En el Departamento de Micología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y en el Laboratorio Clínico Micológico Candelaria, se conservan cepas provenientes de aislamientos clínicos identificadas como *S. schenckii*, sin embargo se desconoce si en realidad corresponden a la especie mencionada, o se trata de alguna de las que recientemente han sido comunicadas en otros países.

La identificación se realiza en base a la historia clínica, morfología de la lesión, características macro y microscópicas del agente causal. Debido a la similitud que existe entre las especies que conforman el complejo *Sporothrix* se dificulta su diferenciación. Por tal razón, este seminario estudió las cepas anteriormente mencionadas, con el fin de corroborar si corresponden a *S. schenckii* o a otra especie del complejo *Sporothrix*, por medio de técnicas morfológicas y bioquímicas. Lo anterior es consecuencia de que se ha demostrado que existe diferencia entre especies en cuanto al tratamiento de acuerdo al estudio realizado por Marimon y colaboradores en el 2008, por lo que al identificar correctamente cada una de ellas, se podrá dar el seguimiento adecuado a los pacientes.

V. OBJETIVOS

A. General

Caracterizar fenotípicamente los aislamientos clínicos de *Sporothrix* spp, para corroborar la identidad taxonómica de cada uno de ellos.

B. Específico

1. Describir las características fenotípicas de los aislamientos de *Sporothrix* a través del crecimiento en agar papa dextrosa (PDA) y agar harina de maíz (CMA).
2. Identificar las cepas de *Sporothrix* a través de la asimilación de rafinosa y sucrosa.
3. Establecer la especie de cada cepa de *Sporothrix* spp a través de las características fenotípicas.

VI. HIPÓTESIS

Por ser un estudio descriptivo no se plantean hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Aislamientos de *Sporothrix* spp obtenidos del cepario del Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y el Laboratorio Clínico Micológico Candelaria.

B. Muestra

Cepas de *Sporothrix* spp existentes en el cepario del Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y por el Laboratorio Clínico Micológico Candelaria para un total de once cepas.

C. Recursos

1. Recursos humanos

- a. Seminaristas: Amanda Marisol Vásquez del Cid y Jackeline Julissa Castillo Reyes.
- b. Asesores: Licenciado Osberth Morales Esquivel y Licenciada Heidi Logemann Lima.

2. Recursos institucionales

Servicio de Micología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
Laboratorio Clínico Micológico Candelaria.

3. Recursos Físicos

a. Equipo

- Autoclave
- Incubadora a 30 y 37°C
- Cabina de seguridad biológica Tipo II A2
- Incinerador
- Estereoscopio
- Microscopio calibrado marca Zeiss

- Microscopio calibrado marca Leica
- Balanza Analítica marca Discovery
- Estufa eléctrica con agitador magnético
- Pipeta automática de 100-1000 μL

b. Reactivos

- Azul de lactofenol
- Aceite de inmersión
- NaCl al 85%
- API 20C[®]

c. Medios de cultivo

- Agar Sabouraud (SAB)
- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Agar Harina de Maíz (CMA)
- Agar Infusión de Cerebro y Corazón (BHI)

d. Cristalería

- Cajas de Petri
- Soportes para cultivo en lámina
- Erlenmeyer 500 y 2000 ml
- Pipetas 10 ml
- Probeta de 1000 ml
- Pipetas Pasteur
- Jarra con candela para microaerofilia
- Tubos de vidrio con tapadera de baquelita.

e. Materiales

- Esmalte de uñas (Sellador)
- Masking tape
- Papel kraft
- Papel limpiacentes
- Papel parafilm
- Papel aluminio
- Papel esmaltado
- Lysol
- Marcador permanente
- Regla
- Guantes de látex
- Algodón
- Alcohol al 70%
- Asas en espátula
- Asas en “L”
- Asas en argolla
- Pinzas
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Gradilla para tubos de ensayo
- Soporte para asas
- Agua desmineralizada
- Pipeteadores
- Tips azules
- Sangre de Carnero
- Cajas de Petri desechables estériles

D. Procedimiento

1. Preparación de los medios de cultivo: CMA, Sabouraud, PDA y BHI con sangre de carnero

- Se prepararon los medios de cultivo según las instrucciones de la casa comercial.
- Para preparar BHI con sangre de carnero se enfrió el medio a 45-50°C y adicióno 5% de sangre de carnero desfibrinada estéril y se homogenizo.
- Una vez solidificado el medio se almacenó a 4-8°C hasta su uso.

2. Revitalización de los cultivos almacenados en el cepario

Se realizó de acuerdo a lo recomendado por Logemann (1995).

- Se seleccionó un tubo de cada cepa de *Sporothrix* spp.
- Los tubos se colocaron en posición invertida por 24 horas para extraer el aceite mineral que recubrió el cultivo.
- Se cortó un fragmento de micelio y se sembró en agar Sabouraud en cajas de Petri (por triplicado).
- El tiempo de incubación fue por 14 días a 25-26°C.

3. Medición del diámetro de crecimiento en PDA a 30 y 37°C

Se realizó de acuerdo a lo recomendado por Logemann (1995), Marimon et al., (2007).

- Se rotularon las cajas con medio de cultivo con el tipo de medio, fecha de inoculación y el código de la cepa.
- Se cortó un fragmento de micelio de 0.5 cm de diámetro y se colocó en el centro de la caja.
- Por cada cepa y temperatura se realizaron 5 cultivos.

- Cada caja de cultivo se selló con parafilm e incubó durante 21 días a 30 y 37°C.
- Al final del período de incubación con una regla se midió el diámetro de crecimiento de las colonias tomando como referencia vector X y Y que incluye la caja de Petri.
- Se tomaron fotografías de cada una de las colonias a 30 y 37° después de 21 días de incubación.

4. Cultivo en lámina

Se realizó de acuerdo a lo recomendado por Logemann, (1995).

- Dentro de una caja de Petri de vidrio se colocó un soporte para cultivo en lámina, un porta objetos, dos cubre objetos y luego se envolvió la caja en papel kraft. Se prepararon dos paquetes por cepa.
- Se prepararon 22 tubos de ensayo con tapón de rosca de bakelita con 10 ml de agua desmineralizada para utilizar posteriormente dos por cepa.
- Se autoclaveó a 121°C por 15 minutos los materiales descritos anteriormente.
- Con pinzas estériles se colocó adecuadamente el soporte y sobre éste el porta objetos.
- Con el reverso de una pipeta Pasteur estéril se cortaron círculos de 0.5 cm de diámetro en el medio de cultivo CMA y se colocó uno de ellos sobre el porta objetos.
- Con asa en “L” se tomaron fragmentos de micelio y se realizaron cuatro cortes en forma de “cruz” en el medio de cultivo CMA y colocaron el cubre objetos con pinzas estériles sobre el círculo de agar donde se inculó el hongo.
- Para mantener la humedad se agregó el agua estéril de uno de los tubos en el fondo de la caja
- Se realizaron dos cultivos en lámina por cada cepa.
- Se sellaron las cajas con papel parafilm.
- El período de incubación fue 12 días a 30 y 37°C.
- Luego del tiempo de incubación, se retiró el parafilm para abrir las cajas.
- Cuidadosamente se separó porta y cubre objeto y así se obtuvo dos preparaciones por cada siembra.

- Se agregó una gota de azul de lactofenol en el porta objeto con fragmentos de micelio y colocar un cubre objeto limpio.
- Se agregó una gota de azul de lactofenol en un porta objeto limpio y se cubrió con el cubre objeto con fragmentos de micelio.
- Cada lámina se selló con esmalte de uñas para su conservación y se almacenó en porta láminas en un lugar fresco y seco.
- Se tomaron fotografías de los cultivos en lámina realizados de cada una de las cepas.

5. Identificación de raduloconidos y otras estructuras

Se realizó de acuerdo a lo recomendado por Logemann, (1995).

- Se tomó porta y cubre objetos de cada cepa obtenidos de los cultivos en lámina y se observó en objetivo de inmersión (100X)
- Se identificó la presencia de raduloconidios, los cuales se encuentran dispuestos en los laterales de las hifas y poseen forma de “trapecio” con doble pared.
- Se observaron otras estructuras características de aislamientos de *Sporothrix* spp. (conidóforos, simpoduloconidios).
- Se realizó este procedimiento en los cuatro porta objetos preparados por cada cepa.
- Se tomaron fotografías de cada una de las estructuras a 30 y 37° después de 12 días de incubación.

6. Conversión de fase miceliar a fase levaduriforme

Se realizó de acuerdo a lo recomendado por Logeman, (1995).

- Se inoculó en el agar infusión de cerebro y corazón (BHI) con sangre de carnero al 5% fragmentos de micelio de *Sporothrix* spp (por duplicado).
- El período de incubación fue de 72 horas a 35-37°C.

- Al finalizar la incubación se tomó una pequeña porción de las colonias que se encontró en la periferia donde hubo crecimiento y se preparó un porta objetos con el colorante azul de lactofenol, de esta manera se confirmó la presencia de levaduras.

7. Elaboración de Estándar de McFarland 2.0

Se realizó de acuerdo a lo recomendado por Pasterán y Galas (2008).

- Se agregó 2 ml de BaCl₂ 0.048M y 98 ml de ácido sulfúrico 0.18M y se mezcló.
- Se distribuyeron de 4 a 6 ml dentro de tubos de vidrio con tapón de baquelita y selló con papel parafilm.
- Se almacenó a temperatura ambiente y protegido de la luz.

8. Prueba de asimilación de azúcares para levaduras por el método API 20C[®]

Se realizó de acuerdo con Buesching, Kurek & Roberts (1979).

- Se reunieron fondo y tapa de una cámara de incubación y se repartió en ella aproximadamente 5ml de agua destilada o desmineralizada.
- En la lengüeta lateral de la cámara de incubación se colocó la referencia de la cepa.
- Se retiró la galería de su envase individual y se depositó en la cámara de incubación.
- Se abrió una ampolla API Suspensión Medium (2ml) o una ampolla de API NaCl 0.85% Medium (2ml).
- Con una pipeta se extrajo del medio de cultivo BHI con sangre de carnero al 5% una fracción de la colonia por toques sucesivos.
- Se realizó una suspensión de levaduras de turbidez patrón 2 de McFarland en la ampolla de API Suspensión Medium. La suspensión se utilizó inmediatamente luego de la preparación.
- De una ampolla API C Medium se transfirió 100 µL de la suspensión anterior. Se homogenizó con la pipeta evitando la formación de burbujas.

- Con la suspensión obtenida se llenaron las cúpulas de sucrosa y rafinosa, se tuvo el cuidado de evitar la formación de burbujas colocando la punta de la pipeta sobre la zona lateral de la cúpula. Se creó un nivel horizontal o ligeramente convexo.
- Se incubó durante 48 o 72 horas a 37°C.
- Interpretación: Se observó el crecimiento de las levaduras comparativamente con la cúpula 0, testigo negativo. Una cúpula con mayor turbidez que la de control nos indicó una reacción positiva y se anotó en la hoja de resultados.
- Para evitar contaminación, se levantó la tapa exclusivamente durante el período de lectura.
- Los resultados se informaron como asimiló/no asimiló.

9. Restauración del cepario

Se realizó de acuerdo a lo recomendado por Mier, Toriello y Ulloa (2002).

- Se preparó agar Sabouraud.
- En tubos de vidrio de 9 cm con tapa de baquelita se agregaron 4 ml de medio de cultivo Sabouraud y se autoclavearon a 121°C por 15 minutos.
- Se colocaron los tubos con una inclinación de 1.5 cm y se dejaron solidificar.
- Se rotularon los tubos con el código de la cepa correspondiente (4 repeticiones por cepa).
- A cada tubo se le agregó un trozo de micelio según el código anterior y se incubó a 26°C.
- Hubo crecimiento aproximadamente en 3 tubos por cepa.
- Periódicamente se revisó el cultivo hasta observar crecimiento suficiente de micelio
- Se agregó aceite mineral estéril hasta cubrir la inclinación.

10. Elaboración y análisis de base de datos

Luego de realizar cada uno de los procedimientos de identificación (medición del diámetro de crecimiento en el medio de cultivo PDA a 30 y 37°C, determinación de

presencia/ausencia de raduloconidios en el medio de cultivo CMA, identificación de simpoduloconidios, raduloconidos y conidióforos en CMA a 30 y 37°C, asimilación de sucrosa y rafinosa por el método API 20 C[®]). Se elaboró una base de datos en el programa Excel[®].

11. Diseño de investigación

Estudio descriptivo en el que la muestra estuvo constituida por cepas de *Sporothrix* spp existentes en el cepario del Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y por el Laboratorio Clínico Micológico Candelaria para un total de once cepas.

12. Análisis de Datos

Se realizaron gráficos de interacción en el caso de crecimiento miceliar. En el programa PSS[®]. La asimilación de azúcares se informó como asimiló o no asimiló. La presencia de estructuras se informó como presencia/ausencia.

Los resultados se presentaron de acuerdo a las especies identificadas. Para cada una de ellas se incluyó datos bioquímicos, macro y micromorfológicos, además de fotografías de las colonias y de los microcultivos.

VIII. RESULTADOS

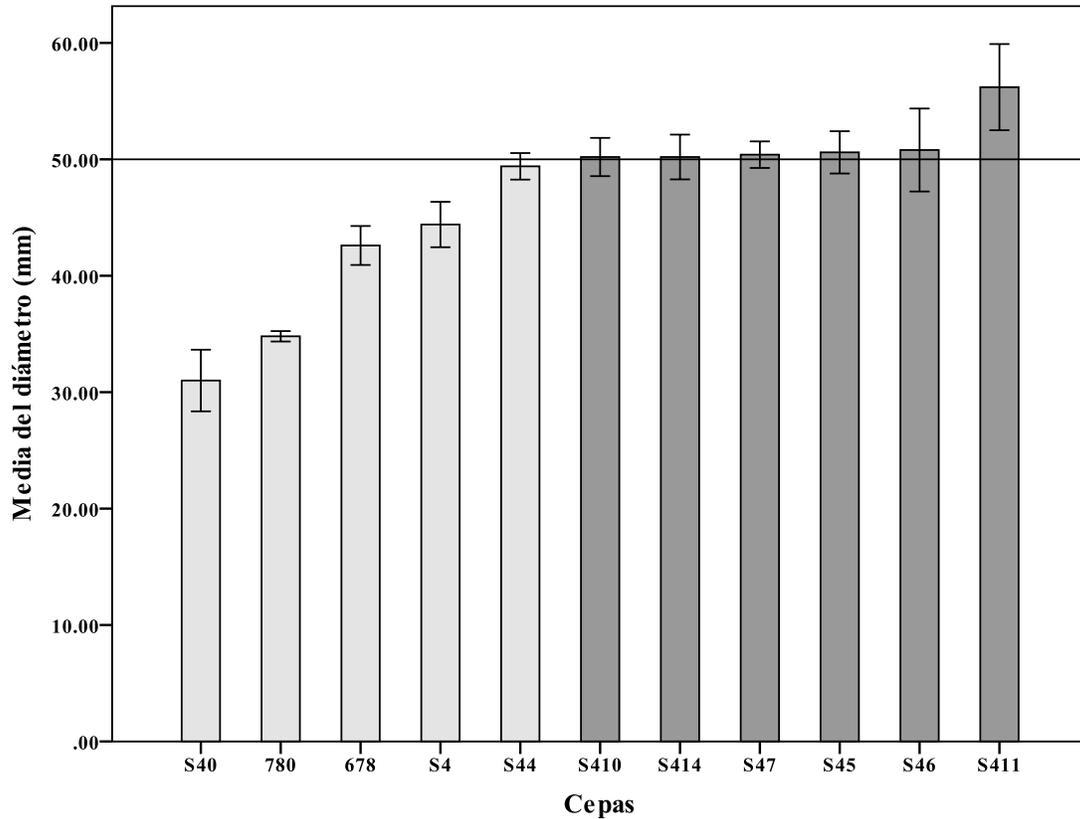
A continuación se presentan los resultados a partir de los cuales se identificó tres especies del complejo *S. schenckii*: *S. albicans*, *S. globosa* y *S. schenckii*. No se encontraron en los aislamientos analizados las especies *S. brasiliensis*, *S. luriei* y *S. mexicana*.

Se observó que todas las cepas evaluadas asimilaron la sucrosa. Posteriormente al evaluar el crecimiento en PDA a 30°C solamente las cepas S44, S4, 678, 780 y S40 presentaron colonias con diámetros menores a 50 mm a los 21 días de incubación, en tanto que los aislamientos S46, S47, S411, S414, S45 y S410 alcanzaron crecimientos mayores a 50 mm (Tabla 1).

Tabla 3. Diámetros de las colonias de *Sporothrix* spp estudiadas.

Cepa	Diámetro en PDA a 30°C (mm)					Media (mm)*
	1	2	3	4	5	
S40	32	34	27	32	30	31.00 ± 2.65
780	35	35	34	35	35	34.80 ± 0.45
678	41	43	43	45	41	42.60 ± 1.67
S4	41	45	45	45	46	44.40 ± 1.95
S410	48	49	51	52	51	50.20 ± 1.64
S45	53	51	50	51	48	50.60 ± 1.82
S414	49	51	48	53	50	50.20 ± 1.92
S44	50	51	49	48	49	49.40 ± 1.14
S46	56	48	49	48	53	50.80 ± 3.56
S47	49	50	50	51	52	50.40 ± 1.14
S411	55	57	62	52	55	56.20 ± 3.70

* media ± la desviación estándar.



Gráfica 1. Crecimiento micelial de cepas de *Sporothrix* spp, en el medio PDA después de 21 días de incubación a 30°C. Las barras de error indican la media del diámetro de crecimiento \pm la desviación estándar. Las barras gris claro representan las cepas con crecimiento menor a 50mm de diámetro y las gris oscuro las que obtuvieron colonias mayores a 50 mm. La línea horizontal dentro de la gráfica indica el punto de referencia (50 mm).

En cuanto a las cepas que obtuvieron colonias menores a 50 mm de diámetro, solo los aislamientos S4 y S44 presentaron asimilación del azúcar rafinosa, por lo que se identificaron como *S. schenckii*. Por el contrario, las que no asimilaron dicho azúcar en la prueba antes mencionada (cepas S40, 780 y 678) se identificaron como *S. globosa* (Figuras 1 y 2).

De los cultivos con crecimiento mayor a 50 mm, todas las cepas (S410, S414, S47, S45, S46 y S411) no asimilaron el azúcar rafinosa y además presentaron colonias blancas en el medio CMA, por lo que fueron identificadas como *S. albicans* (Figura 3 y 4).

A continuación se describen las características macro y microscópicas de las especies de *Sporothrix* identificadas:

A. *Sporothrix albicans* S.B. Saksena, (Figuras 1A-F, 2A-F)

Características macroscópicas: Colonias beige, planas, con margen irregular, centro radiado, a veces zonadas hacia el borde, con reverso beige en agar PDA luego de 21 días de incubación a 30⁰C.

Características microscópicas: Simpoduloconidios de 2.20 x 1.65 µm, elongados, hialinos, de pared lisa en agar CMA luego de 12 días a 30⁰C.

Cepas estudiadas: S45, S46, S47, S410, S411 y S414 provenientes del cepario del Servicio de Micología.

B. *Sporothrix globosa* Marimon, Cano, Gené, Deanna A. Sutton, H. Kawas. & Guarro (Figuras 3C-E, 4C-E)

Características macroscópicas: Colonias de superficie rugosa, beige en el centro y borde café oscuro, reverso café oscuro en agar PDA luego de 21 días de incubación a 30⁰C.

Características microscópicas: Simpoduloconidios de 2.60 x 1.30 µm, hialinos, globosos, de pared lisa. Raduloconidios de 2.90 x 2.20 µm, globosos, de pared doble, dispuestos a lo largo de la hifa, en agar CMA luego de 12 días a 30⁰C.

Cepas estudiadas: S40 del cepario del Servicio de Micología. 780 y 678 del Laboratorio Clínico Candelaria.

C. *Sporothrix schenckii* Hektoen & C.F. Perkins, (Figuras 3A, B y 4A, B).

Características macroscópicas: Colonias con centro de color café y borde café oscuro, planas, reverso café oscuro en agar PDA luego de 21 días de incubación a 30⁰C.

Características microscópicas: Simpoduloconidios de 2.80 x 2.10 µm, elongados, hialinos, de pared delgada y lisa. Raduloconidios de 2.80 x 2.30 µm, de pared doble, lisa, dispuestos a lo largo de la hifa, en agar CMA luego de 12 días a 30⁰C.

Cepas estudiadas: S4 y S44 del cepario del Servicio de Micología.

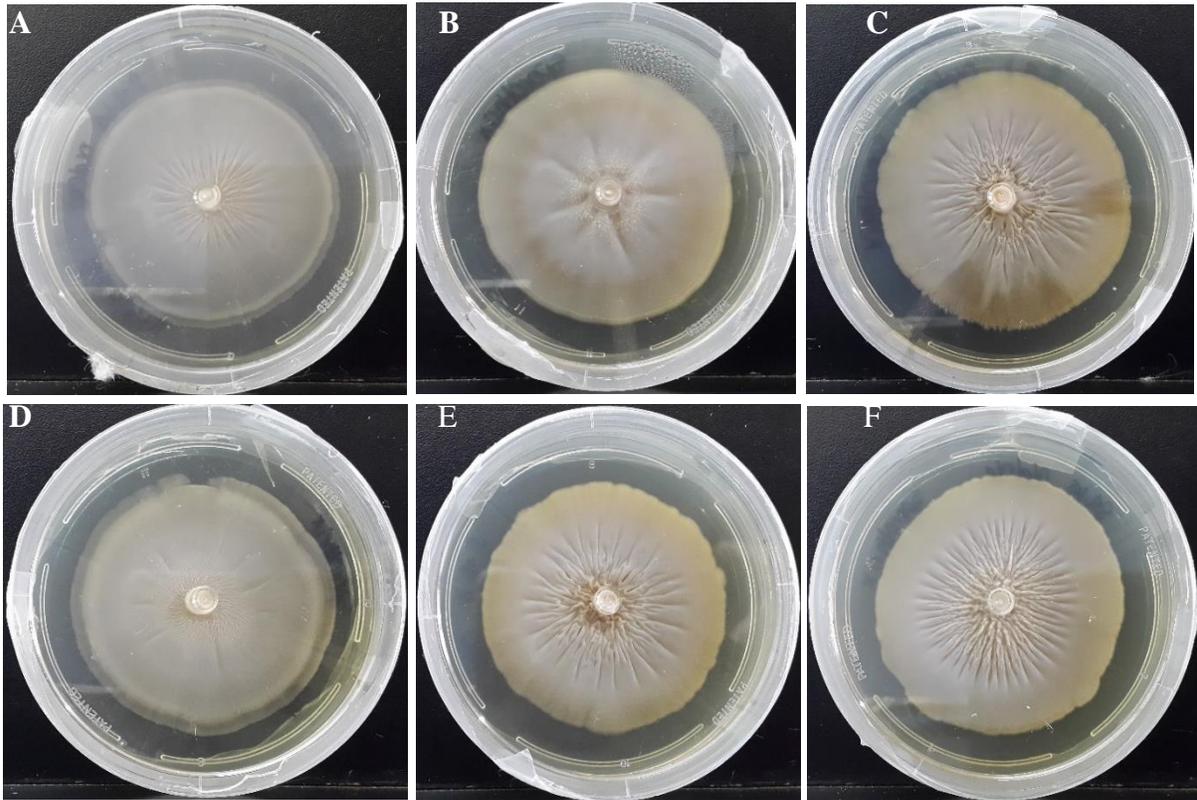


Figura 1. Características macroscópicas de colonias de cepas de S. albicans. A. Cepa S410. B. Cepa S414. C. Cepa S47. D. Cepa S45. E. Cepa 46. F. Cepa S411.

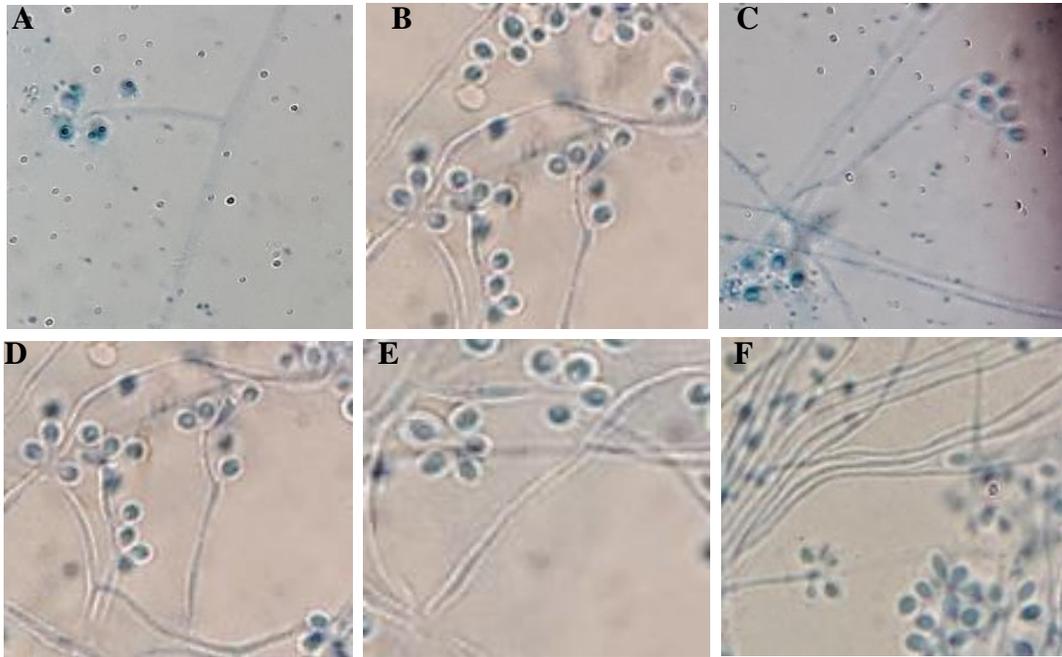


Figura 2. *Simpoduloconidios* de *S. albicans* (Tincion con azul de lactofenol, x1000). A. Cepa S410. B. Cepa S414. C. Cepa S47. D. Cepa S45. E. S46. F. Cepa S411.

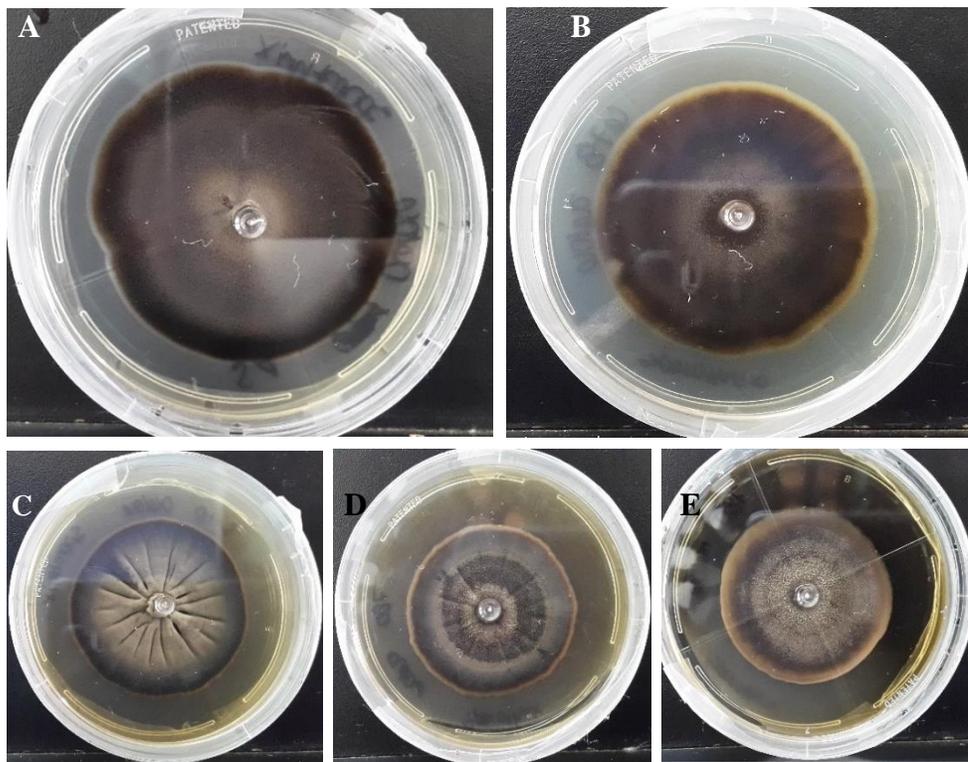


Figura 3. Características macroscópicas de colonias de cepas de *Spothrix schenkii*: A. Cepa S4. B. S44. Y *Sporothrix globosa*: C. Cepa S40. D. 780. E. 678.

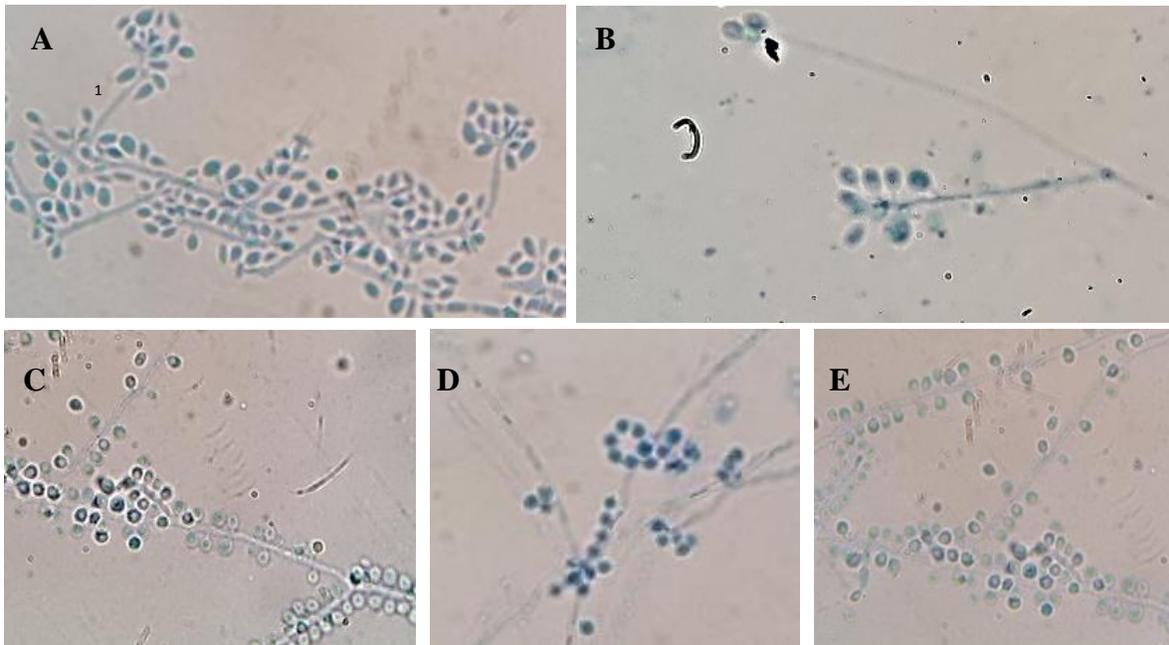


Figura 4. Características microscópicas de colonias de cepas de Spothrix schenkii (Tinción con azul de lactofenol, x1000). A. simpoduloconidios y raduloconidios, cepa S4. B. Simpoduloconidios, cepa S44. C. Raduloconidios, cepa S40. D. Simpoduloconidios y raduloconidios, cepa 780. E. Raduloconidios, cepa 678.

IX. DISCUSIÓN

La esporotricosis es una enfermedad infecciosa crónica que involucra la piel y el tejido subcutáneo así como otras formas menos frecuentes tales como artritis y meningitis. La infección se adquiere a través de la inoculación traumática o menos frecuentemente por inhalación de conidios de los agentes etiológicos, los cuales habitan en el suelo, materia vegetal y otros sustratos. La esporotricosis se distribuye en todo el mundo, pero la mayoría de los casos ocurren en países templados, cálidos y tropicales. El mayor número de infectados proviene de América del Norte, pero también es común en áreas de América central y del Sur, Asia y Sur África (Madrid, Cano, Gene, Bonifaz, Toriello & Guarro, 2009).

Los agentes causales de la esporotricosis pertenecen al complejo *S. schenckii*, el cual comprende cinco especies y está constituido por hongos dimórficos que causan patologías en el ser humano y animales como perros y gatos. Las diferencias entre las especies no solamente se dan a nivel genético, sino que también existe variación en características de crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo así como en asimilación de carbohidratos (Marimon et al., 2007). También existen diferencias en cuanto al tratamiento de la enfermedad, el cual debe administrarse de acuerdo a la localización y a la especie, por lo que la identificación exacta del patógeno es de vital importancia (Marimon et al., 2008b).

En Guatemala, todas las especies del complejo se identifican como *Sporothrix schenckii*, lo cual ocurre desde su primo aislamiento en el año 1978 realizado por Mayorga y colaboradores. Sin embargo, con los datos aportados por Marimon y otros en el año 2007 y 2008a, quienes descubrieron que *S. schenckii* estaba constituido por un complejo de cinco especies, se hizo necesario corroborar cuáles están presentes en el país. Al respecto, el primer trabajo realizado fue en el año 2009 por Madrid y otros, quienes identificaron tres aislamientos guatemaltecos, los cuales correspondieron a *S. globosa* y *S. schenckii*.

En este sentido, sobre las especies identificadas en este estudio se puede mencionar que las seis cepas que se identificaron como *S. albicans* se caracterizaron por producir colonias sin pigmentos en ninguna de las etapas de crecimiento, sino que mostraron un persistente color blanco. Además obtuvieron más de 50 mm de diámetro en agar PDA a 30°C y luego de 12 días de incubación, formó simpoduloconidos hialinos. Por otra parte asimilación de sucrosa pero no de rafinosa, lo cual coincide con lo indicado por Marimon et al., (2008a).

S. albicans se considera un hongo cosmopolita que se encuentra principalmente en Europa y Asia. En Sudamérica se aisló por primera vez en Chile en el año 2014 y se reportó como agente causal de infecciones en humanos, a la vez que también se aisló del ambiente. Posteriormente se comunicó un caso en Brasil proveniente de un felino (Cruz, Vieille y Carvajal, 2014). Con respecto a la susceptibilidad antifúngica de *S. albicans*, se ha comprobado que la actividad al KTC es variable en comparación con la TRB y el efecto del mismo depende de la cepa de dicha especie la cual este ocasionando la infección. Sin embargo el mejor tratamiento para micosis sistémica ocasionada por esta especie es PSC. (Oliveira et al., 2011).

Los tres aislamientos identificados en este estudio como *S. globosa* se caracterizaron por producir raduloconidios pigmentados luego de doce días de incubación en agar CMA a 30°C (Madrid et al., 2009; Cruz, Vieille y Oschilewski, 2012). Además los cultivos no presentaron crecimiento mayor a 50 mm en 21 días de incubación a 30°C, las colonias fueron de color crema al inicio y posteriormente se tornaron oscuras y con abundante micelio. Lo anterior conjuntamente con la no asimilación de la rafinosa, se consideran características fenotípicas importantes para la diferenciación con *S. mexicana* (Marimon et al., 2008a; Marimon et al., 2007).

El primer caso de esporotricosis por *S. globosa* fue descrito en Brasil (Cruz et al., 2012) y posteriormente se han realizado aislamientos en España, Reino Unido, Estados Unidos, India, Colombia, Guatemala y México (Madrid et al., 2009). Con respecto a la susceptibilidad antifúngica, *S. globosa* es sensible a AMB, FLC, ITC, VRC, RVC, ABC, EBC, MFG, TRB y 5FC (Marimon et al., 2008b). Se desconoce la procedencia de la cepa

que fue identificada en el país, sin embargo es de utilidad como antecedente para este estudio.

Dos de las cepas en investigadas coincidieron con las características de *S. schenckii* y presentaron colonias con crecimiento menor a 50 mm de diámetro luego de 21 días de incubación en agar PDA a 30°C, colonias filamentosas, planas, color blanco a beige al principio y luego se tornan marrón a negro después de 13 días de incubación, aunque algunas cepas formaron colonias oscuras desde el comienzo del crecimiento. Microscópicamente presentaron simpoduloconios y raduloconidios, estos últimos con doble pared. También asimilaron los azúcares sucrosa y rafinosa. La asimilación de este último carbohidrato se considera una característica fenotípica importante ya que lo diferencia de *S. globosa* (Lopes-Becerra et al., 2006; Marimon et al., 2008a; Marimon et al., 2007).

S. schenckii se aisló por primera vez en 1896 y a partir de este momento, se ha informado en Estados Unidos, Brasil, Perú, Argentina, Venezuela, Colombia, Bolivia, Guatemala, México, Francia, Italia, Reino Unido, Sudáfrica y Japón, que presenta alta virulencia en humanos (Lopez-Becerra et al., 2006). Con respecto a la susceptibilidad Marimon y colaboradores en el año 2008 reportaron que *S. schenckii* es sensible a AMB, FLC, ITC, VRC, PSC, ABC, EBC, MFG, TRB y 5FC.

Finalmente se recalca que este es el primer estudio de características fenotípicas para identificar cepas adscritas al complejo *S. schenckii* aisladas en el país y que demostró que la esporotricosis en el país puede ser ocasionada por tres de las especies del complejo *S. schenckii*. Lo anterior presenta una ventaja para el diagnóstico clínico, ya que dichas especies pueden ser identificadas a través de características macro y microscópicas así como también bioquímicas, sin embargo, esto conlleva un trabajo riguroso que requiere mucho tiempo, dedicación y esfuerzo.

Debido a que Guatemala es un país en desarrollo y alto porcentaje de población que desempeña trabajos relacionados con la agricultura y manejo de restos vegetales, existe el riesgo de que puedan infectarse y posteriormente desarrollar esporotricosis, por lo que al detectarse un caso de dicha enfermedad y al requerir el diagnóstico en el laboratorio

clínico, se debe tener en cuenta que es posible identificar la especie de *Sporothrix* a través de características macro, microscópicas y bioquímicas, lo cual se traducirá en que el paciente recibirá el tratamiento más adecuado y oportuno para su recuperación.

X. CONCLUSIONES

1. Las cepas S45, S46, S47, S410, S411 y S414 identificadas como *S. albicans*, presentaron colonias beige, planas, con margen irregular, centro radiado, a veces zonadas hacia el borde, con reverso beige en agar PDA luego de 21 días de incubación a 30⁰C, así como simpoduloconidios, elongados, hialinos, de pared lisa en agar CMA luego de 12 días a 30⁰C. También asimilaron la sucrosa pero no la rafinosa.
2. Las cepas S40, 780 y 678 identificadas como *S. globosa*, exhibieron colonias de superficie rugosa, beige en el centro y borde café oscuro, reverso café oscuro en agar PDA luego de 21 días de incubación a 30⁰C, así como simpoduloconidios, hialinos, globosos, de pared lisa y raduloconidios, globosos, de pared doble, dispuestos a lo largo de la hifa, en agar CMA luego de 12 días a 30⁰C. También asimilaron la sucrosa pero no la rafinosa.
3. Las cepas S4 y S44 identificadas como *S. schenckii*, mostraron colonias con centro de color café y borde café oscuro, apariencia polvosa, plana, reverso café oscuro en agar PDA luego de 21 días de incubación a 30⁰C, así como simpoduloconidios, elongados, hialinos, de pared delgada lisa y raduloconidios, de pared doble, lisa, dispuestos a lo largo de la hifa, en agar CMA luego de 12 días a 30⁰C. También asimilaron la sucrosa y la rafinosa.

XI. RECOMENDACIONES

- Confirmar por técnicas de biología molecular la entidad de las cepas identificadas, por medio de la secuenciación de los genes de calmodulina y β -tubulina.
- Realizar susceptibilidad antifúngica a las cepas analizadas así como a futuros aislamientos.
- En futuros estudios realizar aislamientos en diferentes sustratos vegetales, con el fin de evidenciar la colonización de estos hongos en diversos ambientes del país.

XII. REFERENCIAS

- Arrillaga, I., Capilla, J., Fernández, M., Fariñas, F. y Mayayo, E. (2010). Diferencias en la patogenicidad del complejo de especies *Sporothrix* en un modelo animal. *Patologia*, 48(2), 82-87.
- Barros, M., Schubach, A., do valle, A., Gutierrez, M., Conceição-Silva, F., Schubach, T... Confceição, M. (2004). Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clinical Infectious Diseases*, 38(4), 529–535.
- Bastos, M., Almeida, R. & Oliveira, A. (2011). *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Cinical Microbiology Reviews*, 24(4), 633-654.
- Buesching, W., Kurek, K. & Roberts, G. (1979). Evaluation of the modified API 20 C system for identification of clinically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 9(5), 565-569.
- Bustamante, B. & Campos, P. (2001). Endemic sporotrichosis. *Current Opinion Infectious Diseases*, 14(2), 145-149.
- Casadevall, A. (2006). Cards of virulence and the global virulome for humans. *Microbe*, 1(8), 359–364.
- Castillo, M., Tapia, F. & Arciniegas, E. (1990). Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 28(1), 91-94.
- Cruz, R., Vieille, P. y Carvajal, L. (2014). Aislamientos de *Sporothrix pallida complex* en muestras clínicas y ambientes de Chile. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 311-314.
- Cruz, R., Vieille, P. y Oschilewski, D. (2012). Aislamiento ambiental de *Sporothrix globosa* en relación a un caso de esporotricosis linfo–cutánea. *Revista Chilena de Infectología*, 29(4), 401 – 405.
- de Hoog, G. & Guarro, J. (1995). *Atlas of clinical Microbiology*. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili.
- Hernández, F. (2007). Esporotricosis. Unidad de Micología, Micología Médica Molecular. Universidad Autónoma de México. UNAM. Recuperado de:

[http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/esporotricosis.html](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/ esporotricosis.html)

fecha de revisión: 03/02/2015.

- Hogan, L., Klein B. & Levitz, S. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), 469–488.
- Kwon-Chung, K. & Bennett, J. (1992). *Medical Mycology*. Philadelphia: Medicine & Health Science Books.
- Lacaz, C., Porto, E., Martins, J., Heins-Vaccari, E. y Melo, N. (2002). *Tratado de Micología Médica*. (9ª Ed.). Sao Paulo: Sarvier.
- Lima, O., Bouchara, J., Renier, G., Marot-Leblond, A., Chabasse, D. & Lopes-Bezerra, L. (2004). Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. *Microbial Pathogenesis*, 37(3), 131-140.
- Lima, O., Figueredo, C., Previato, J., Mendonça-Previato, L., Morandi, V. & Lopes, L. (2001). Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infection and Immunity*, 69(11), 6874-6880.
- Logemann, H. (1995). Manual práctico de Micología Médica. Guatemala: Bayer.
- Lopes-Bezerra, M., Schubach, A. & Costa, R. (2006). *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais de Academia Brasileira de Ciências*, 78(2), 293-308.
- López, L., Mendonza-Previato, L., Fournet, B., Degand, P. & Previato, J. (1992). O-glycosidically linked oligosaccharides from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. *Glycoconjugate Journal*, 9(2), 75-81.
- Lutz, A. & Splendore, A. (1907). Sobre umamycose observada emhomens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. *Trabalhos Sobre Dermatologia e Micologia*, 21, 433–450.
- Lyon, G., Zurita, S., Casquero, J., Holgado, W., Guevara, J. Brandt, M... Hajjeh, R. (2003). Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 36(1), 34-39.
- Madrid, H., Cano, J., Gene, J., Bonifaz, A., Toriello, C. & Guarro, J. (2009). *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(3), 218 – 222.

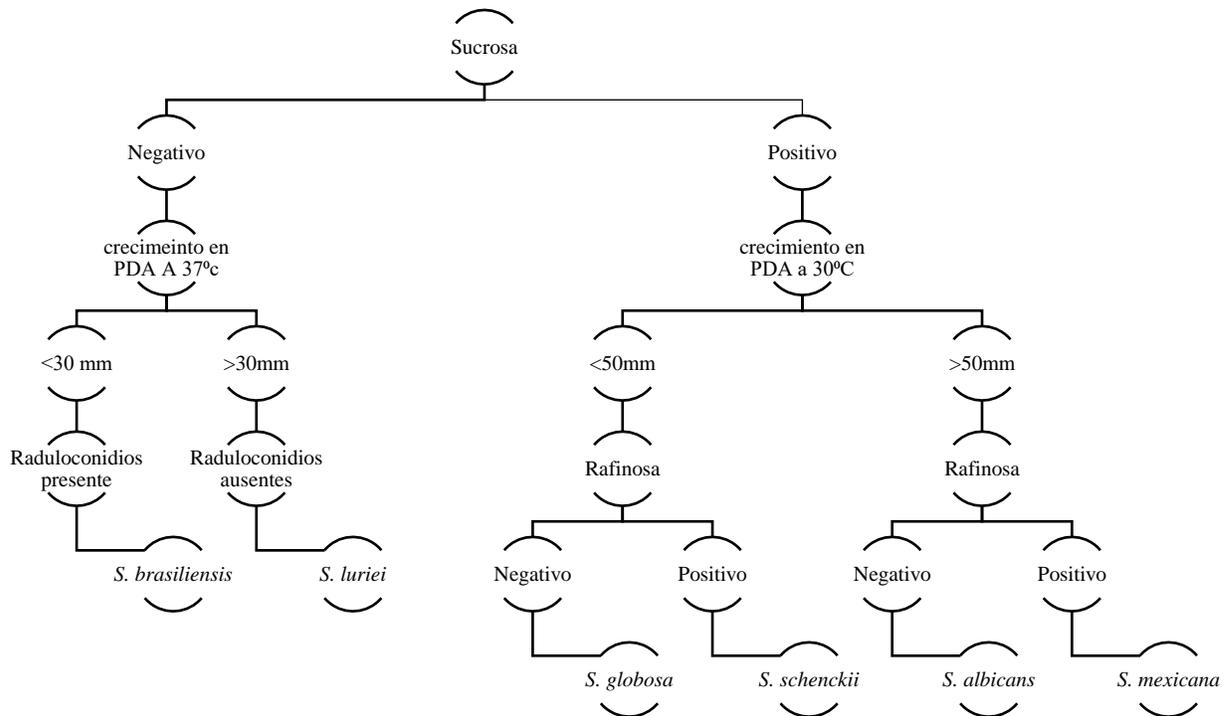
- Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D., Kawasaki, M. & Guarro, J. (2007). *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10), 3198-3206.
- Marimon, R., Gene, J., Cano, J. & Guarro, J. (2008a). *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Medical Mycology*, 46(6), 621-625.
- Marimon, R., Serena, C., Gené, J., Cano, J. & Guarro, J. (2008b). In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 732-734.
- Mayorga, R., Cáceres, A., Toriello, C., Gutiérrez, O., Ramírez, M. & Mariat, F. (1978). Etude d'une zone d'endemie sporotrichosique au Guatemala. *Sabouraudia*, 16, 185-198.
- Mesa, A. (2001). Tipificación de aislamientos clínicos de *Sporothrix schenckii* de diferentes orígenes geográficos. IV Congreso Nacional de Micología: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México (UNAM). México D.F.
- Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio*. México, D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Miller, S. & Keeling, H. (2002). Ant sting sporotrichosis. *Cutis*, 69(6), 439-442.
- Morris-Jones, R., Youngchim, S., Gomez, B., Aisen, P., Hay, R., Nosanchuk, J., Casadevall, A. & Hamilton, A. (2003). Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infection and Immunity*, 71(7), 4026-4033.
- Nicot, J. & Mariat, F. (1973). Caracteres morphologiques et position systématique de *Sporothrix shcenkii*, agent de la sporotrichose humaine. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 49(1), 53-65.
- Oliveira, M., Almeida-Paes, R., Muniz, M., Gutierrez-Galhardo, M. & Zancope-Oliveira, R. (2011). Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area or sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*, 172(4), 257-267.
- Pang, K., Wu, J., Huang, D. & Tying, S. (2004). Subcutaneous fungal infections. *Dermatologic Therapy*, 17, 523-531.

- Pasterán, F. y Galas, M. (2008). Manual de procedimientos. Sensibilidad a los antimicrobianos en *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*. Argentina. Departamento de Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A. N. L. I. S. “Dr. Carlos G. Malbrán”.
- Previato, J., Gorin, P., Haskins, R. & Travassos, L. (1979). Soluble and insoluble glucans from different cell types of *Sporothrix schenckii*. *Experimental Mycology*, 3(1), 92-105.
- Quintal, D. (2000). Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. *Journal of Cutaneous Medicine Surgery*, 4(1), 51-54.
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G. & Torres-Guerrero, H. (2000). Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity*, 68(6), 3696–3703.
- Ruiz-Baca, E., Toriello, C., Pérez-Torres, A., Sabanero-López, M., Villagomez-Castro, J. & López-Romero, E. (2009). Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. *Medical Mycology*, 47(2), 185–196.
- Sánchez-Saldaña, L., Galarza, C. y Matos-Sánchez, R. (2009). Infecciones micóticas subcutáneas. *Dermatología Peruana*, 19(4), 362-387.
- Sandoval, G., Barbosa, G. y Sabanero, M. (2009). Biología del proceso de adhesión de *Sporothrix schenckii* y otros micopatógenos de humanos hacia los tejidos hospederos. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguas Calientes*, 43, 21-25.
- Schubach, T., Schubach, A., Okamoto, T., Barros, M., Figueiredo, F., Cuzzi, T... Wanke, B. (2006). Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Medical Mycology*, 44(1), 87-92.
- Sgarbi, D., Ribeiro, A., Zeppone, I., Lopes, C., Angluster, J. & Sales, C. (1997). Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, 139(1), 9–14.
- Steenbergen, J., Nosanchuk, J., Malliaris, S. & Casadevall, A. (2004). Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infection and Immunity*, 72(6), 3478–3488.

- Travassos, L. (1989). Antigenic structures of *Sporothrix schenckii*. In E. Kurstak (Ed), *Immunology of fungal diseases*. (Pp. 193-221). New York: Marcel Dekker.
- Vásquez-del-Mercado, E., Arenas, R. & Padilla-Desgarenes, C. (2012). Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*, 30(4), 437-443.
- Watanabe, S., Kawasaki, M., Mochizuki, T. & Ishizaki, H. (2004). RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 45(3), 165–175.
- Woods, J. (2003). Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 327–331.

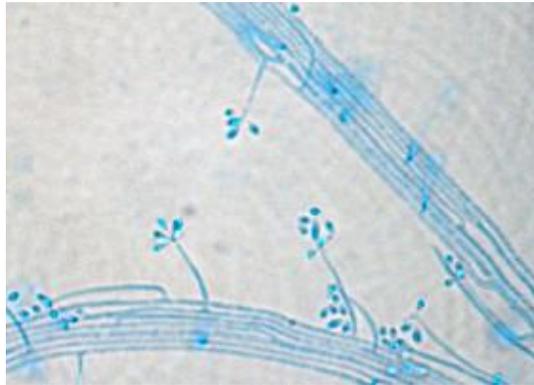
XIII. ANEXOS

Anexo No. 1: Esquema de clasificación de cepas pertenecientes al complejo *Sporothrix* basado en características morfológicas y fisiológicas.

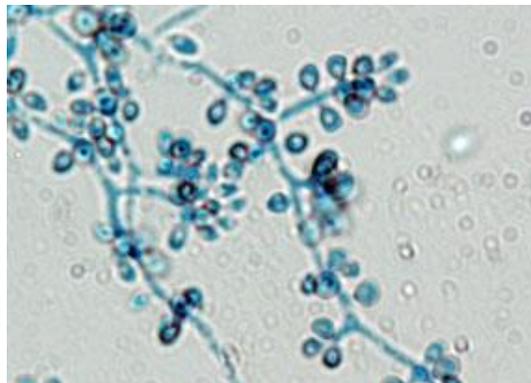


Fuente: Marimon, R., Gene, J., Cano, J. & Guarro, J. (2008). *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Medical Mycology*, 46(6), 621-625.

Anexo No. 2: Diferenciación entre simpoduloconidios y raduloconidios.



Examen microscópico de *Sporothrix schenckii*. Hifas finas, conidióforos largos y conidios simpodiales organizados en forma de flor de margarita (40X). Imagen: Dra. Francisca Hernández, Facultad de Medicina, UNAM.



Examen microscópico de *Sporothrix schenckii*. Conidios triangulares hialinos - pigmentación, naciendo directamente de la hifa o de conidióforos (100X). Imagen: Dra. Francisca Hernández, Facultad de Medicina, UNAM

Fuente: Hernández, F. (2007). Esporotricosis. Unidad de Micología, Micología Médica Molecular. Universidad Autónoma de México. UNAM.