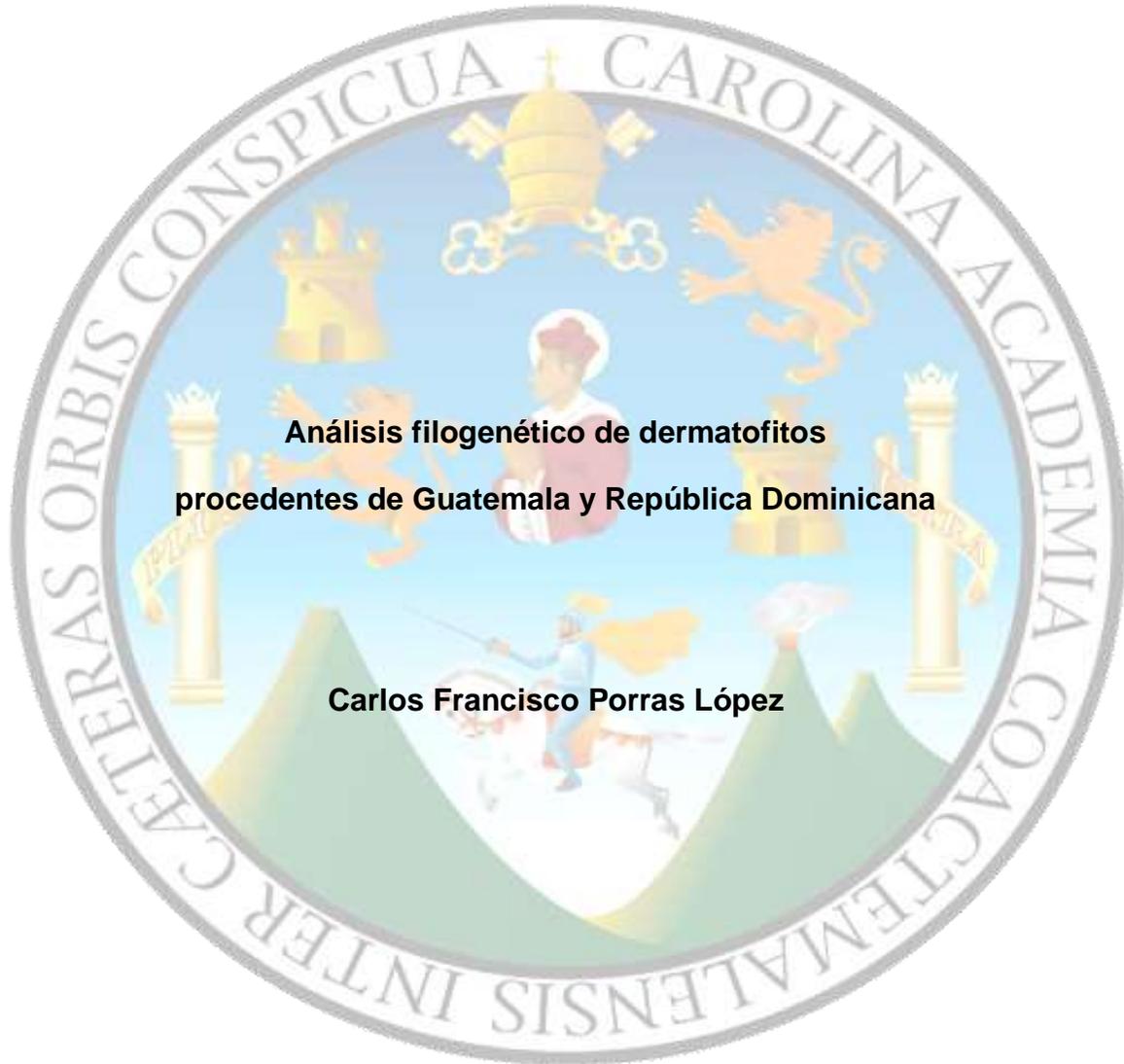


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Análisis filogenético de dermatofitos  
procedentes de Guatemala y República Dominicana**

**Carlos Francisco Porras López**

Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas

Guatemala, octubre de 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Análisis filogenético de dermatofitos  
procedentes de Guatemala y República Dominicana**

**Trabajo de tesis presentado por  
Carlos Francisco Porras López**

Para optar al grado de Maestro en Ciencias  
Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas

Guatemala, octubre de 2018

## **JUNTA DIRECTIVA**

### **FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	DECANO
MA. Elsa Julieta Salazar de Ariza	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

## **CONSEJO ACADÉMICO**

### **ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

Rubén Dariel Velásquez Miranda, Ph.D

María Ernestina Ardón Quezada, MSc.

Jorge Mario Gómez Castillo, MA.

Clara Aurora García González, MA.

Silvia María Morales Cabrera, MSc.

## **DEDICATORIA**

**A Dios**, por permitirme culminar con dicha mis estudios

**A mi familia**, quien siempre me ha apoyado en mi desarrollo personal

**A mi esposa**, por ser un complemento perfecto en mis estudios

**A quienes siempre han sido un gran ejemplo** en mi desarrollo académico: MSc. Murphy Paiz, PhD. Oscar Cobar, PhD. Erick Martinez, MSc. Ely Ocaña, PhD. Sergio Melgar, Arq. Carlos Valladarez

**A mis compañeros y profesores** de la maestría, con quienes compartimos gratos momentos

## **AGRADECIMIENTO**

Al personal del departamento de micología molecular de la UNAM, quienes me apoyaron en el desarrollo de este proyecto

Al Dr. Sergio Melgar, quien fue un gran respaldo

## RESUMEN

Los hongos dermatofitos se caracterizan por invadir los tejidos queratinizados, pueden llegar a ser patógenos del ser humano y animales, constituyen un problema de relevancia a nivel mundial y su distribución depende del área geográfica, factores migratorios, ocupacionales, entre otros. En esencia, la clasificación de los dermatofitos se ha realizado de una forma micro/macroscópica, comparando estructuras, conidios, así como características de las colonias. Esta identificación es complicada, requiere práctica y existen especies con igual o similar estructura. En la actualidad, su clasificación se basa en estudios polifásicos, los cuales incluyen varios tipos de pruebas entre las que destaca la biología molecular, la cual ha evolucionado desde la época de los 80's.

En el presente estudio se tuvo como objetivo analizar las relaciones filogenéticas entre las especies de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* aislados de muestras clínicas procedentes de Guatemala y República Dominicana. Se caracterizaron las muestras respecto a las variantes epidemiológicas: sexo, edad, origen, sitio anatómico, clasificación micológica y hallazgo microscópico y se utilizaron métodos fenotípicos: caracterización microscópica y macroscópica; métodos genotípicos: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como marcador la región ITS1-5.8s-ITS2, secuenciación de esta región; métodos bioinformáticos: edición de electroferogramas (Bioedit ver 7.2.5), comparación genómica con uso del algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI, elaboración de árboles filogenéticos mediante uso de Jmodeltest (ver 2.1.10 para determinar el mejor modelo evolutivo), MEGA 7.0 en el caso de Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia, MrBayes v3.2.6 en el caso de Inferencia Bayesiana y FigTree ver 1.4.1 para la edición de los árboles obtenidos. Este estudio fue de tipo retrospectivo, transversal y descriptivo. Se utilizó la totalidad de las cepas obtenidas.

Se analizaron 61 cepas, 42 procedentes de Guatemala y 19 de República Dominicana, estas fueron identificadas por métodos fenotípicos además, se obtuvo el DNA genómico de éstos y posteriormente se amplificó con la región ITS del rDNA. Las secuencias obtenidas, se compararon con todas las secuencias depositadas en el GenBank, a través del algoritmo BLASTn. Los alineamientos de las secuencias se analizaron tomando en cuenta los porcentajes de similitud, identidad y valores de expectación. Se identificaron para Guatemala nueve cepas de *N. gypsea*, nueve de *N. incurvata*, 15 de *T. interdigitale*, dos de *M. canis*, una de *N. nana*, una de *T. rubrum*, y cinco de *T. mentagrophytes* cinco cepas. En cuanto a República Dominicana, se identificaron siete cepas de *T. rubrum*, tres de *M. canis*, tres de *T. interdigitale*, una de *T. mentagrophytes*, una de *M. audouinii*, dos de *T. equinum* y una de *M. ferrugineum*.

Se estableció la filogenia de las especies de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*, y se determinó que, en el caso de Guatemala, el mejor método fue el de Inferencia Bayesiana; no se logró una buena resolución del complejo *T. mentagrophytes*. Respecto a República Dominicana, se obtuvo concordancia de los tres métodos y no se logró buena resolución en el caso de *M. audouinii* ni en el caso del complejo *T. mentagrophytes*. Así mismo, no existió mayor diferencia filogenética inter-especie y se observó una agrupación intra-especie en el caso de *N. incurvata* respecto a una cepa Asiática y una cepa Europea. El presente estudio es el primero en establecer una clasificación molecular y filogenia de los hongos dermatofitos de Guatemala y República Dominicana; en él se evidencian algunas especies no reportadas con anterioridad y se establecen las relaciones filogenéticas de las mismas. Sin embargo, dada la resolución de los árboles, se recomienda utilizar otros marcadores moleculares como proteína ribosomal 60S,  $\beta$ -tubulina, y el factor de elongación 1- $\alpha$  (*tef-1 $\alpha$* ), concatenarlos y obtener árboles más robustos. Se abre el espacio para otros estudios moleculares comparativos como: estudios de genomas completos, proteómica o metabolómica de estos microorganismos con el fin de profundizar en su estudio.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES .....	3
A.	Aspectos históricos de la dermatomicosis .....	3
B.	Generalidades de las dermatofitosis .....	7
D.	Características microscópicas de los hongos dermatofitos.....	14
1.	Impacto en la caracterización de las especies de dermatofitos.....	14
E.	Género <i>Trichophyton</i> .....	14
1.	Complejo <i>Trichophyton rubrum</i> (Castellani) Sabouraud, 1911.....	15
2.	<i>Trichophyton tonsurans</i> (Malmsten, 1845).....	16
3.	Complejo <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Robin) Blanchard, 1896.....	17
4.	<i>Trichophyton verrucosum</i> (Bodin, 1902).....	18
5.	<i>Trichophyton violaceum</i> (Bodin, 1902).....	19
6.	<i>Trichophyton concentricum</i> (Blanchard, 1895).....	19
F.	Género <i>Microsporum</i> .....	20
1.	<i>Microsporum canis</i> (Bodin, 1902).....	20
2.	<i>Microsporum audouinii</i> (Gruby 1843).....	21
3.	<i>Microsporum nanum</i> (Fuentes, 1956).....	22
G.	Género <i>Epidermophyton</i> .....	23
1.	<i>E. floccosum</i> (Harz, 1870).....	23
H.	Análisis molecular de los dermatofitos .....	24
1.	Taxonomía Clásica.....	24
2.	Filogenia de los Dermatofitos.....	25
2.1	<i>Internal transcribed spacer (ITS)</i> .....	27
2.1.1	Filogenia por ITS.....	28
I.	Estudios en Guatemala y República Dominicana .....	28
III.	JUSTIFICACIÓN.....	30
IV.	OBJETIVOS.....	31
A.	Objetivo General.....	31
B.	Objetivos Específicos .....	31

<b>VI. METODOLOGÍA</b> .....	<b>32</b>
<b>A. Diseño de la investigación</b> .....	<b>32</b>
<b>B. Universo</b> .....	<b>32</b>
1. Población .....	<b>32</b>
2. Muestra.....	<b>32</b>
<b>C. Recursos</b> .....	<b>34</b>
1. Humanos .....	<b>34</b>
2. Institucionales.....	<b>34</b>
3. Materiales .....	<b>34</b>
3.1 Equipo.....	<b>34</b>
3.2 Reactivos .....	<b>35</b>
3.3 De Oficina .....	<b>36</b>
3.4 Otros .....	<b>36</b>
<b>D. Método</b> .....	<b>37</b>
1. Procedimientos.....	<b>37</b>
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>65</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	<b>76</b>
<b>X. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>77</b>
<b>XI. REFERENCIAS</b> .....	<b>78</b>
<b>XII. ANEXOS</b> .....	<b>96</b>

## INDICE DE TABLAS

### Tabla

Tabla 1. Dermatofitosis superficiales, generalidades .....	9
Tabla 2. Dermatofitosis subcutánea, generalidades .....	12
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la identificación genotípica de aislados clínicos de dermatofitos.....	41
Tabla 4. Caracterización epidemiológica de los ejemplares de Guatemala.....	44
Tabla 5. Caracterización epidemiológica de los ejemplares de República Dominicana.....	45
Tabla 6. Identificación morfológica y molecular de los ejemplares estudiados de Guatemala.....	46
Tabla 7. Identificación morfológica y molecular de los ejemplares estudiados de República Dominicana.....	47

## INDICE FIGURAS

### Figuras

Figura 1. <i>Tinea capitis</i> .....	9
Figura 2. <i>Tinea corporis</i> .....	10
Figura 3. <i>Tinea imbricata</i> .....	10
Figura 4. <i>Tinea cruris</i> .....	10
Figura 5. <i>Tinea barbae</i> .....	11
Figura 6. <i>Tinea mannum</i> .....	11
Figura 7. <i>Tinea pedis</i> .....	11
Figura 8. Presentación clínica de las onicomicosis .....	12
Figura 9. Granuloma tricofítico .....	12
Figura 10. Pseudomicetoma en gato.....	13
Figura 11. Enfermedad de Hadida .....	13
Figura 12. <i>Trichophyton rubrum</i> .....	16
Figura 13. <i>Trichophyton tonsurans</i> .....	17
Figura 14. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	18
Figura 15. <i>Trichophyton verrucosum</i> .....	18
Figura 16. <i>Trichophyton violaceum</i> .....	19
Figura 17. <i>Trichophyton concentricum</i> .....	20
Figura 18. <i>Microsporum canis</i> .....	21
Figura 19. <i>Microsporum audouinii</i> .....	22
Figura 20. <i>Microsporum nanum</i> .....	22
Figura 21. <i>Epidermophyton floccosum</i> .....	23
Figura 22. Cuantificación del DNA.....	46
Figura 23. Árbol filogenético República Dominicana, Máxima Verosimilitud.....	56
Figura 24. Árbol filogenético Guatemala, Máxima Verosimilitud.....	57
Figura 25. Árbol filogenético Unificado, Máxima Verosimilitud.....	58

<i>Figura 26.</i> Árbol filogenético República Dominicana, Inferencia Bayesiana.....	59
<i>Figura 27.</i> Árbol filogenético Guatemala, Inferencia Bayesiana.....	60
<i>Figura 28.</i> Árbol filogenético Unificado, Inferencia Bayesiana .....	61
<i>Figura 29.</i> Árbol filogenético República Dominicana, Máxima Parsimonia.....	62
<i>Figura 30.</i> Árbol filogenético Guatemala, Máxima Parsimonia.....	63
<i>Figura 31.</i> Árbol filogenético Unificado, Máxima Parsimonia.....	64

## I. INTRODUCCIÓN

Los dermatofitos son hongos que invaden y se propagan en la piel queratinizada de los mamíferos, incluidos los seres humanos y causan a menudo infecciones contagiosas (Weitzman y Summerbell, 1995). La enfermedad causada por estos hongos (dermatofitosis) es común en todo el mundo (Outerbridge, 2006) y tiene relevancia en el área veterinaria y de salud pública (Weitzman y Summerbell, 1995; Cafarchia et al., 2009, 2012). La distribución de estos hongos varía considerablemente, de acuerdo al área geográfica de procedencia y otros factores epidemiológicos como la edad, el sexo o las estaciones (Weitzman y Summerbell, 1995; Cafarchia et al., 2004, 2006; Lorio et al., 2007; Mirzahoseini et al., 2009; Bassiri-Jahromi et al., 2009; Rezaei-Matehkolaei et al., 2013).

Los dermatofitos pertenecen a los géneros *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Arthroderma*, *Paraphyton*, *Lophophyton* y *Ctenomyces*; ellos incluyen cerca de 30 de las 40 especies conocidas como posibles agentes patógenos de los seres humanos y otros mamíferos (Kanbe, 2008; De Hoog et al, 2017). Los hongos *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, complejo *T. mentagrophytes*, así como *Microsporum canis*, *M. gypseum* y *E. floccosum* son considerados como los principales agentes etiológicos de las dermatofitosis en los seres humanos (Weitzman y Summerbell, 1995; Das et al., 2007). Con base en su ecología, los dermatofitos se han dividido en tres grupos: antropofílicos, zoofílicos, y geofílicos (Weitzman y Summerbell, 1995; Cafarchia et al., 2006; Graser et al., 2008).

La identificación de un dermatofito a nivel de especie es epidemiológica, ecológica y terapéuticamente significativa (Panasiti et al., 2007). Durante la última década, se han realizado progresos en la sistemática moderna de los dermatofitos; sin embargo, aún existen problemas en su caracterización, que es de gran relevancia para el análisis filogenético e identidad taxonómica, así como para la práctica clínica y epidemiología (Ameen, 2010; Vena et al., 2012). Durante

las dos últimas décadas, la secuenciación del DNA y la sistemática molecular han generado nuevos conceptos de especie en dermatofitos. Esto causó una reducción en el número de taxa reconocidas (Graser et al., 2008) y, por otro lado, condujo al descubrimiento de algunas especies crípticas nuevas (Choi et al., 2012; Hubka et al., 2014a, 2014b). En la última década, se han realizado estudios de sistemática moderna, por medio de marcadores moleculares como las regiones del espaciador interno transcrito 1 (ITS1) y 2(ITS2) del rDNA (Gräser et al., 2008). Estos marcadores han demostrado ser útiles en resolver las relaciones entre organismos taxonómicamente relacionados (Carbone et al., 1993; Lobuglio et al., 1993; Berbee et al., 1995). En el campo de la micología médica, los marcadores ITS y el sistema de oligonucleótidos diseñados por Makimura et al. (1998) y White et al. (1990), han sido ampliamente utilizados en estudios filogenéticos.

En Guatemala y República Dominicana no existen estudios moleculares sobre los hongos dermatofitos, y la información a nivel latinoamericano no ha sido del todo esclarecida, por lo que el presente estudio brinda información molecular sobre estos hongos procedentes de Guatemala y República Dominicana, con el fin de identificarlos, establecer relaciones inter/intra-especies y establecer relaciones evolutivas por medio del uso del espaciador interno transcrito 1 (ITS1), región 5.8s y 2(ITS2) del rDNA (Gräser et al., 2008). Así mismo, se contempló el uso de secuenciación para dicha región y un análisis filogénico por medio de los métodos de Máxima Verosimilitud, Maxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana.

Dada la barrera geográfica, el distinto origen de las poblaciones humanas y al considerar la posible migración de los dermatofitos, se pretendió establecer si existen diferencias o similitudes en su agrupación según el análisis filogenético. Este estudio constituye la base para utilizar herramientas moleculares para identificar correctamente a las especies de dermatofitos, ya que en Guatemala y República Dominicana la identificación de estos organismos, solo se lleva a cabo utilizando los métodos convencionales, así como análisis de otras características.

## II. ANTECEDENTES

### A. Aspectos históricos de la dermatomicosis

Las dermatomicosis son conocidas desde la antigüedad y se definen como infecciones de origen fúngico que afectan el estrato córneo de la piel y apéndices tales como uñas, pelo y superficie de las membranas mucosas. Estas ocurren alrededor del mundo, pero son más predominantes y endémicas en algunas regiones. Las infecciones fúngicas son consideradas como menos frecuentes respecto a las bacterias o parásitos. Durante los últimos veinte y cinco años se ha incrementado su frecuencia debido al aumento de casos VIH, tratamientos de inmunosupresión, cáncer y trasplantes (Arenas, 2011).

Las micosis superficiales fueron descritas por Hipócrates (460-377 AC), así como también describe las lesiones provocadas por *Candida albicans* denominándolas “*aphtae albae*”, fue Galeno (130-200 AC) quien corroboró dicho hallazgo (Arenas, 2011). Celsus describe la tiña inflamatoria o querion, así como el favus. Entre los primeros usos de los términos micológicos se encuentra el de la palabra “*tinea*” por médicos en la escuela de Galeno, para referirse a lesiones de piel cabelluda (Arenas, 2011). Durante un viaje de William Dampier a Filipinas, este describe lesiones características provocadas por la *tinea imbricata*, conocida por los lugareños de las islas como “Tokelau”. En 1798 William y Bateman cambian el término de tiña por “*herpes circinado*” o *tinea corporis* (Arenas, 2011).

Los orígenes de la micología médica se remontan a 1835 donde se obtuvieron grandes logros gracias a los estudios de Agostino Bassi, alumno de Volta, Scarpa y Lazzaro Spallanzani (fundador de la biología moderna). Bassi descubre que la muscardina del gusano de seda era producto del hongo *Beauveria bassiana* que, posteriormente, es clasificado como *Botrytris bassiana* por Giuseppe Balsamo-Crivelli (Bonifaz, 2012). En 1845 Per Hendrik Malmsten descubre el género *Trichophyton*.

En 1850 J.B. Georg W. Fresenius utiliza el término aspergilosis, la cual fue una de las primeras patologías descritas en seres humanos y animales. En 1827 se sospecha la existencia de un hongo asociado al favus, el cual es estudiado, descrito y publicado por Johann Lukas Schönlein en 1839, aunque la primera observación de este hongo y de la primera dermatofitosis (favus) fue hecha por Roberth Remark, quien encuentra hifas y arthroconidios en las lesiones provocadas por este hongo (Bonifaz, 2012). En 1840 Remark publica la existencia de un vegetal en el aire circundante de los pacientes que presentaban favus y comprueba la naturaleza de la enfermedad provocándose autoinoculación nombra 1845 *Achorion schoenleinii* en honor a su maestro; esta publicación es considerada como el primer tratado de micología (Bonifaz, 2012).

David Gruby fue el primero en descubrir la tiña microspórica y cultivó *Microsporum audouinii* por vez primera; este dermatofito fue denominado así debido al tamaño de las esporas y en honor a Victor Audouin. Sus descubrimientos fueron publicados en el libro “*Memorie sur une végétation qui constitue la vraie teigne*” (Arenas, 2011). En 1842 Gruby presenta el hongo del agodoncillo ante la *Academie de Sciences* de París; en 1844, publica un estudio sobre *Trichophyton tonsurans* como agente etiológico de tiñas con parasitación endothrix (Bonifaz, 2012). A mediados del siglo XIX Malmsten descubre y crea el género *Trichophyton* en 1845 (Arenas, 2011).

En 1847 Charles Robin descubre a *T. mentagrophytes*, publica en 1853 su libro titulado *Histoire Naturelle des végétaux parasites*. Robin propone la clasificación de *Oidium albicans* (Arenas, 2011). En 1853 también se descubre que las onicomycosis son causadas por dermatofitos; dicho descubrimiento, fue realizado por Baun y Meissner. En 1870 se asocia a *Epidermophyton floccosum* con *tinea cruris* gracias a los estudios de Ferdinand von Hebra y, en el mismo año, William Tilbury Fox identifica la *tinea manuum*, En 1883 Majocchi describe el granuloma tricofítico (Arenas, 2011).

Es importante destacar que durante el siglo XIX uno de los micólogos más destacados es el dermatólogo francés Raymond Jacques Adrien Sabouraud, quien fue alumno de Emili Roux en el curso de microbiología del Instituto Pasteur, para posteriormente convertirse en dermatólogo y estudiante de Emilie Vidal y Ernest Besnier. Sabouraud publica en 1892 su primer trabajo, titulado: “*Etude clinique, histologique et bacteriologique sur la pluralité des Trichophytions de l’homme*”. Dos años más tarde en 1894 escribe los resultados de sus primeros tres años de investigación en el libro “*Les Trichophyties humaines*”. Sabouraud clasifica los agentes etiológicos de las dermatomicosis en cuatro grupos: *Achorion*, *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*. En 1890 publica su libro “*Les teines*”, el cual es considerado una obra maestra de la literatura médica. Sabouraud estudia, cultiva (utiliza su propio medio) e identifica muchas especies de hongos (Bonifaz, 2012).

Posterior a las clasificaciones hechas, en 1934, Emmons propone la taxonomía actual para los dermatofitos reagrupándolos en tres géneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*. En el siglo XX fueron descubiertas gran cantidad de especies: *T. violaceum*, *T. verrucosum*, *M. canis*, y *M. gypseum* por Bodin. *E. floccosum* por Sabouraud, *T. rubrum* por Castellani y Sabouraud (Bonifaz, 2012).

Raymond Vanbreuseghem, descubre *Keratinomyces (Trichophyton) allejoi*, el cual fue aislado del medio ambiente al utilizar la técnica de anzuelo, la cual consiste en colocar pelo estéril proveniente de caballos para capturar hongos keratinofílicos; dicha técnica ayudó a investigar sobre el ambiente de los dermatofitos. En 1954 Connant agrupa varias especies en el género *Trichophyton* en base a las similitudes macro y microscópicas (Bonifaz, 2012). Dada la similitud en la morfología, en 1958 Lucile George introdujo una técnica que se basa en requerimientos nutricionales, la cual ayudó a separar hongos tales como: *T. equinum*, *T. megninii*, *T. verrucosum* y *T. tonsurans* (Bonifaz, 2012).

En el siglo XX, Bruno Bloch estudia algunos aspectos inmunológicos de las dermatofitosis humanas y utiliza para ello modelos animales (cerdos de guinea); también estudia la intradermorreacción utiliza tricofitina, antígeno obtenido por medio de filtración del crecimiento líquido de algunos dermatofitos (Bonifaz, 2012). En 1961, dados los estudios de Dawson, Gentles y Stockdale se retoma la importancia al reconocimiento de la forma teleomorfa de los dermatofitos. Es Stockdale quien descubre que algunos de los dermatofitos que aparentemente no presentaban una forma teleomorfa podían ser inducidos a través del apareamiento con *Arthroderma simi*, demostró de esta manera que varios dermatofitos podían tener un ancestro común (Dawson & Gentles, 1961; Stockdale, 1961). Luego de establecer las características microscópicas y los aspectos de apareamiento se compilaron manuales de identificación (Estados Unidos/Inglaterra) por Rebell, Taplin y Kane (Makimura et al, 1999). Davison et al, comienzan la era de estudios sobre la biología molecular de los dermatofitos. Dada la similitud en la secuenciación de los fragmentos de restricción se logra establecer la cercanía que existe entre los dermatofitos intra e inter especies y géneros (Dawson & Gentles, 1961; Stockdale, 1961).

El primer árbol filogenético con base en características moleculares se logra desarrollar gracias a Gräser et al., para posteriormente llevar a cabo diversos estudios moleculares (Summerbell, Haugland, Gupta, 1999; Gräser, Kuijpers, El Fari, Presber, Hoog, 2000; Gräser, Hoog, Kuijper, 2000; Probst, Hoog, Gräser, 2003). Estos estudios filogenéticos fueron fuertemente influenciados por la cercanía evolutiva de los dermatofitos, la cual es reciente respecto a sus huéspedes humanos y animales. Dada esa cercanía, la gran cantidad de especies de dermatofitos disminuyó, ya que se encontró que algunos eran demasiado similares para ser considerados especies distintas (Dawson & Gentles, 1961; Stockdale, 1961).

## B. Generalidades de las dermatofitosis

Las dermatofitosis son un conjunto de patologías producidas por un conjunto de hongos denominados dermatofitos, los cuales pertenecen a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* en orden de frecuencia (Sandoval et al., 2012) . Los dermatofitos son hongos que invaden y se propagan en la piel queratinizada de los mamíferos, incluidos los seres humanos, causan infecciones contagiosas (Weitzman y Summerbell, 1995). La enfermedad causada por estos hongos (dermatofitosis) es común en todo el mundo (Outerbridge, 2006) y tiene relevancia en el área de salud pública y veterinaria (Weitzman y Summerbell, 1995; Cafarchia et al., 2009, 2012).

La distribución de estos hongos varía considerablemente, según el área geográfica de procedencia y otros factores epidemiológicos como la edad, el sexo y las estaciones (Weitzman y Summerbell, 1995; Cafarchia et al., 2004, 2006). Los dermatofitos pertenecen principalmente a los géneros *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* (en su estado anamórfico) y *Arthroderma* (en su estado teleomórfico) y ellos incluyen cerca de 30 de las 40 especies conocidas como posibles agentes patógenos de los seres humanos y otros mamíferos (Kanbe, 2008). Los hongos *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, “complejo” *T. mentagrophytes*, así como *Microsporum canis*, *M. gypseum* y *E. floccosum* son considerados como los principales agentes etiológicos de las dermatofitosis en los seres humanos (Weitzman y Summerbell, 1995; Das, Goyal, & Bhattacharya, 2007). Con base en su ecología, los dermatofitos se han dividido en tres grupos: antropofílicos, zoofílicos y geofílicos (Véase Anexo 1). Los dermatofitos antropofílicos son principalmente asociados con los humanos, causantes de micosis como *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea pedis*, *tinea unguium*, y rara vez infectan animales (Weitzman y Summerbell, 1995; Cafarchia et al., 2006; Graser, Scott & Summerbell, 2008). Las especies zoofílicas son patógenos comunes de los animales y ocasionalmente infectan a los humanos, mientras que los dermatofitos geofílicos están asociados principalmente con materiales

queratinizados (pelo, plumas, uñas y cuernos) presentes en el ambiente y pueden ser transmitidos a los seres humanos y animales a través del contacto con el suelo (Weitzman y Summerbell, 1995). Estos hongos tienen la habilidad de degradar la queratina del pelo, las uñas y plumas; pueden producir infecciones superficiales (dermatofitosis) en la piel de huéspedes humanos y pueden penetrar en los tejidos más profundos en huéspedes inmunocomprometidos (Squeo, Beer, Silvers, Weitzman & Grossman, 1998). Las micosis superficiales se encuentran entre las formas más frecuentes de infecciones en los humanos. Se estima que afectan un 20-25 % de la población mundial y su incidencia está en constante incremento (Das et al., 2007; Havlickova et al., 2008; Vena et al., 2012). La distribución de las infecciones dermatofíticas y sus agentes causales varía según la región geográfica y está influenciada por varios factores, como el tipo de población, clima, estilo de vida, migración, prácticas culturales, condiciones socioeconómicas, entre otras (Schwartz, 2004; Havlickova, Czaika, & Friedrich, 2008; Ameen, 2010).

Particularmente, las onicomicosis pueden representar hasta el 90 % de las afecciones en uñas de los pies, mientras que las onicomicosis del lecho ungueal son responsables hasta del 50 % de las patologías ungueales (Ghannoum et al., 2000). Además, dentro de las micosis, éstas corresponden al 30 % de los casos de micosis superficiales (Faergemann y Baran, 2003). La incidencia aumenta con la edad, alcanza hasta el 60 % de personas mayores de 60 años (Anane et al., 2007). Así mismo, se considera una de las micosis superficiales con mayor dificultad en el diagnóstico y el tratamiento (Mendoza, Palacios, Cardona y Gomez, 2012).

En los países industrializados, alrededor de 20 % de la población con edad >60 años y 50 % de la población con edad >70 años tienen una infección por hongos en los pies (Loo, 2007; Gräser, Czaika & Ohst, 2012). Para el tratamiento de la onicomicosis, el sistema de salud de Estados Unidos, asigna \$ 43 millones de dólares al año (Elewski, 2000).

### C. Dermatofitosis superficiales.

**Tabla 1. Dermatofitosis superficiales, generalidades**

Patología	Generalidades	Clínica
Tiña de la cabeza ( <i>Tinea capitis</i> )	<p>Esta patología es propia de los niños y se puede resolver espontáneamente durante la pubertad. Los agentes etiológicos pueden variar respecto al área geográfica, pueden ser <i>M. canis</i>, <i>T. tonsurans</i> y en algunos casos otras especies del género <i>Trichophyton</i> como <i>T. rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i>. Esta puede ser seca o inflamatoria (Querion de Celso). La variedad seca se manifiesta en forma de pelos quebradizos, deformes, gruesos, con una vaina blanquecina. En cuanto a la tinea inflamatoria, esta es causada principalmente por <i>M. canis</i> y <i>T. mentagrophytes</i>. Se manifiesta por un plastrón inflamatorio el cual está constituido por pústulas y abscesos múltiples, puede haber adenopatías satélites y, en algunos casos, puede presentarse en forma de granuloma de Majocchi el cual no se resuelve espontáneamente (Arenas, 2011). En el caso de adultos la tinea capitis es excepcional y se ha informado que es causada por <i>T. tonsurans</i>, <i>M. canis</i> y <i>T. rubrum</i>. En algunos casos puede haber presencia de alopecia cicatrizal caracterizada por mucho prurito y pérdida de cabello. Generalmente se ha informado que esta es causada por <i>T. tonsurans</i>, el cual es un agente etiológico considerado emergente en Latinoamérica (Benavides y Villanueva, 2010; Arenas, 2011).</p>	

Figura 1. *Tinea capitis*. Se observa en las imágenes A y B la lesión característica de esta patología. Adaptado de: Torres-Guerrero, E., Martínez-Herrera, E., Arroyo-Camarena, S., Porras, C., & Arenas, R. (2015). Kerion Celsi: A report of two cases due to *Microsporum gypseum* and *Trichophyton tonsurans*. *Our Dermatology Online/Nasza Dermatologia Online*, 6(4). Faltan páginas

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 1. Dermatofitosis superficiales, generalidades (continuación)**

Patología	Generalidades	Clínica
Tiña del cuerpo ( <i>Tinea corpori</i> )	Se caracteriza por placas redondas las cuales presentan bordes activos; en general se presenta de forma crónica y puede curar sola. Existen dos variedades; microspórica, la que origina placas pequeñas (0.5 a 2 cm de diámetro) y tricofítica, la que genera placas grandes en menor número. En México se ha observado un predominio de <i>T. tonsurans</i> y en niños y en adultos <i>T. rubrum</i> . Existe otra variedad, denominada dermatosis glútea dermatofítica o epidemofitosis, la cual se encuentra limitada a la zona del pañal y se origina por <i>E. floccosum</i> (Arenas, 2011).	 <p data-bbox="1304 597 1885 675"><i>Figura 2. Tinea corporis.</i> Se observa una lesión a nivel de pecho en paciente femenina. Adaptado de: Documento inédito.</p>
Tiña imbricata (Tokelau)	Es una micosis superficial crónica la cual tiene por agente etiológico a <i>Trichophyton concentricum</i> . Esta patología es endémica del Pacífico e incluye las islas Solomon donde es conocida como “bakua”. Esta enfermedad es predominante en individuos que viven en hacinamiento y puede afectar todo el cuerpo pero generalmente se presenta en rodillas y abdomen. Las lesiones inician como una placa anular con o sin eritema (Mason & Marks, 2015). La tinea imbricata también es conocida como Tokelau y se ha observado también en Polinesia; sus lesiones presentan forma de encaje o arabesco. Esta no altera pliegues ni piel cabelluda y afecta de forma infrecuente a las palmas y plantas (Arenas, 2011).	 <p data-bbox="1304 911 1885 1016"><i>Figura 3. Tinea imbricata.</i> Se observa lesión en forma de encaje patognomónica del tokealu. Adaptada de: Bonifaz, A., Archer-Dubon, C., &amp; Saúl, A, 2004.</p>
Tiña de la Ingle ( <i>Tinea cruris</i> )	Esta predomina en hombres adultos generalmente. Puede afectar una o ambas regiones inguinales, puede extenderse a periné, la región púbica, abdomen y en pocos casos a escroto y el pene. Esta se caracteriza por presentar placas eritemoescamosas de bordes vesiculosos. Su evolución puede ser crónica y pruriginosa. Entre los agentes etiológicos se ha descrito a <i>E. floccosum</i> , <i>T. rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i> (Arenas, 2011)	 <p data-bbox="1304 1260 1885 1286"><i>Figura 4. Tinea cruris.</i> (Bonifaz 2012).</p>

**Fuente Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 1. Dermatofitosis superficiales, generalidades (continuación)**

Patología	Generalidades	Clínica
Tiña de la barba ( <i>Tinea barbae</i> )	Esta tiene como agentes etiológicos a <i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> y en algunos casos a <i>T. verrucosum</i> , el cual no ha sido reportado aun en Guatemala (Martínez, Porras, Logeman, y Arenas, 2012). Esta es exclusiva de varones adultos y se caracteriza por pústulas foliculares aisladas, de evolución crónica; la diferencia de esta respecto a <i>tinea faciei</i> es que no forma placas anulares (Arenas, 2011).	 <p data-bbox="1352 516 1864 591">Figura 5. <i>Tinea barbae</i>. Se observa lesión característica a nivel de la mejilla izquierda. Adaptado de: documento inédito. Foto: propia.</p>
Tiña de las manos ( <i>Tinea mannum</i> )	Esta tiña predomina en hombres adultos y con menor frecuencia en niños. Esta es ocasionada principalmente por <i>T. rubrum</i> , afecta una o ambas palmas, es córnica y entre sus características clínicas se encuentran la anhidrosis, la hiperqueratosis, descamación y presencia de placas (Arenas, 2011)	 <p data-bbox="1352 786 1864 948">Figura 6. <i>Tinea mannum</i>. Se observa lesión caracterizada por una placa hipocromica a nivel de la mano. Adaptada de: <a href="http://www.healthhype.com/tinea-manuum-hand-fungus-causes-symptoms-pictures-treatment.html">http://www.healthhype.com/tinea-manuum-hand-fungus-causes-symptoms-pictures-treatment.html</a></p>
Tiña de los pies ( <i>Tinea pedis</i> )	Causada por <i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> o <i>interdigitale</i> , los hombres son afectados con mayor frecuencia seguidos por mujeres y niños. Se pueden observar vesículas, ampollas o ulceraciones y costras melecéricas; esta puede extenderse a los bordes del pie. Generalmente esta se acompaña de olor fétido y prurito, denominado "pie de atleta". En algunos casos puede haber una coloración verdosa relacionada con <i>Pseudomona</i> spp. (Arenas, 2011).	 <p data-bbox="1352 1205 1864 1312">Figura 7 <i>Tinea pedis</i>. Se observa una lesión caracterizada por descamación fina a nivel de la planta del pie derecho. Adaptado de: Documento inédito.</p>

**Fuente Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 1. Dermatofitosis superficiales, generalidades (continuación)**

Patología	Generalidades	Clínica
<p>Onicomicosis (<i>Tinea ungueum</i>)</p>	<p>Es la dermatosis más frecuente en Guatemala (57.85%) respecto a las otras dermatofitosis (Martínez et al., 2012). Tiene un predominio en las uñas de los pies, especialmente en los primeros ortijos. La clasificación según Bonifaz (2012) para las onicomicosis es: 1) subungueales: OSD (Onicomicosis subungueal distal), OSL (Onicomicosis subungueal lateral), OSP (Onicomicosis subungueal proximal), 2) Onicomicosis blanca superficial, 3) Endonix y 4) ODT (Onicomicosis distrófica total), la cual es la más agresiva, afecta a más del 50% de la uña, y se caracteriza por onicolisis, hiperqueratosis y cambio de coloración.</p>	 <p>Figura 8. Presentación clínica de las onicomicosis. Se observa A, Onicomicosis distrófica total (ODT); B, Onicomicosis Subungueal Distal (OSD) y C, Onicomicosis Subungueal Proximal (OSP).</p>

Fuente: Fuente: Elaboración propia

**Tabla 2. Dermatofitosis subcutánea, generalidades**

Patología	Generalidades	Clínica
<p>Granuloma tricofítico o de Majocchi</p>	<p>Es una dermatofitosis profunda provocada generalmente por el género <i>Trichophyton</i> y se caracteriza por su inicio a nivel de la dermis y posteriormente invasión profunda. Esta se presenta en todas las edades y lugares, es más frecuente en mujeres asociada a rasurarse las piernas lo cual provoca la penetración de las esporas al folículo piloso. Entre los factores de riesgo está la presencia de tiñas previas, especialmente en pacientes con tiña crónica en los pies. Los granulomas se presentan a nivel de piel lampiña en miembros inferiores (60%), superiores (tronco y cara) y de manera excepcional en la cabeza (Bonifaz, 2012).</p>	 <p>Figura 9. Granuloma tricofítico. Se observa un granuloma tricofítico en mejilla derecha de paciente pediátrico. Foto: propia.</p>

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 2. Dermatofitosis subcutánea, generalidades (continuación)**

Patología	Generalidades	Clínica
Pseudomicetoma	<p>Esta una dermatofitosis profunda e infrecuente, no forma granos verdaderos y no es exógena, se encuentra limitada. A nivel de biopsia se pueden observar hifas sueltas o compactas con fenómeno de Splendore-Hoeppli. Tiene como agentes etiológicos a <i>M. canis</i>, <i>T. rubrum</i>, <i>M. audouinii</i> y <i>M. ferrugineum</i> (Arenas, 2011).</p>	
Enfermedad de Hadida	<p>Es un padecimiento excepcional descrito en 1940 por Hadida y Schousboe; los reportes de casos se han realizado en África, en Argelia, Marruecos y Túnez. Se considera que hay una influencia genética, probablemente autosómica-recesiva; es más frecuente en hombres. Tiene un predominio en pacientes con daño inmunológico celular, asociado a linfomas y leucémicas. Entre los datos patognomónicos se observa presencia de adenopatías axilares e inguinales. Los principales agentes etiológicos pertenecen al género <i>Trichophyton</i>: <i>T. violaceum</i>, <i>T. rubrum</i>, <i>T. schoeneinii</i>, <i>T. mentagropytes</i> y <i>T. verrucosum</i> (Bonifaz, 2012).</p>	

Figura 10. Pseudomicetoma en gato. Adaptado de: Pereira A. et al, 2006. Pseudomicetoma dermatofítico causado por *Microsporum canis* en gato da raza Persa. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34(2), 193-196.

Figura 11 Enfermedad de Hadida. Se observan lesiones hiperqueratósicas características de la patología. Adaptado de: Bonifaz, A., 2012.

**Fuente:** Elaboración propia

## **D. Características microscópicas de los hongos dermatofitos**

### **1. Impacto en la caracterización de las especies de dermatofitos.**

La identificación de un dermatofito a nivel de especie es epidemiológica, ecológica y terapéuticamente significativa, debido a su ruta de infección (por ejemplo, la infección por *M. canis* se origina a partir de gatos y perros, mientras que *M. audouinii* se transmite entre seres humanos) y diferentes esquemas de tratamiento (por ejemplo, *tinea capitis* causada por *T. tonsurans* requiere un tratamiento más corto que la causada por *M. canis*, porque este último evade la exposición al fármaco mediante la producción de arthroconidios fuera del eje del pelo (Gräser and Scott, 2008). Además, existe un perfil variable de sensibilidad antifúngica *in vitro* de los microconidios y arthroconidios de aislados de *T. rubrum*, *T. tonsurans* y *T. equinum* (Coelho et al., 2008; Bao et al., 2013; Nyilasi et al., 2014). Durante la última década, se han realizado progresos en la sistemática moderna de los dermatofitos; sin embargo, aún existen problemas en su caracterización, que es relevante para el análisis filogenético e identidad taxonómica, así como para la práctica clínica y epidemiología; un ejemplo es la definición de las especies que pertenecen al complejo *T. mentagrophytes* (Kac, 2000). Diferentes conceptos de especie, con base en la caracterización fenotípica (morfológica), datos ecológicos, y biológicos se han comparado con la filogenia (Guarro et al., 1999). Las características fenotípicas tradicionales pueden ser no sólo inestables y/o imprecisas, así como las características genéticas relacionadas con aspectos fenotípicos pueden ser poco claras (Guarro et al., 1999; Gräser and Scott, 2008; Gräser et al., 2006).

## **E. Género *Trichophyton*.**

El género *Trichophyton* se caracteriza por estar conformado por hongos antropofílicos, geofílicos y zoofílicos. Algunas de las especies de este género son cosmopolitas y otras poseen una distribución geográfica específica. Existen 22 especies de hongos bajo el género *Trichophyton*, entre las que se encuentran más

comúnmente: *T. mentagrophytes*, *T. concentricum*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum* y *T. violaceum*. Estos hongos poseen la capacidad de invadir tejidos queratinizados de la piel, pelo y uñas.

Este género posee enzimas como: proteasas, elastasas y queratinasas, las cuales juegan un rol como factores de virulencia. Existen 5 especies asociadas a *T. mentagrophytes* (*T. nodulare*, *T. interdigitale*, *T. quinckeanum*, *T. mentagrophytes* sensu estricto y *T. erinacei*), las cuales no pueden ser identificadas en un solo medio de cultivo (Mihali, Buruiana, Turcus, Covaci, & Ardelean, 2012).

Las especies del género *Trichophyton* están asociadas al teleomorfo *Arthroderma* (fase sexual). Se han descrito dos estados sexuales de *T. mentagrophytes*: *Arthroderma benhamiae* y *Arthroderma vanbreuseghemii*. Takashio (1972) divide a *A. benhamiae*, en 2 especies con base en el mating type (Europea-Americana y Africana).

Las especies del género *Trichophyton* en general se caracterizan por presentar abundantes microconidios o microaleuroconidios de 2-4 µm, que pueden variar su forma de esférica, piriforme o clafiforme. En algunos casos presentan macroconidios en forma de clava o “puro” de hasta 50 µm de largo (Falta referencia).

### **1. Complejo *Trichophyton rubrum* (Castellani) Sabouraud, 1911.**

Mediante el uso de técnicas moleculares se determinó relación entre distintas especies del género *Trichophyton*, creándose el complejo *T. rubrum*, en el cual se encuentran agrupados. *T. rubrum sensu estricto*, *T. megninii*, *T. violaceum*, *T. circonvolutum*, *T. fischeri*, *T. fluviumuniense*, *T. glabrum*, *T. gourvillii*, *kanei*, *T. kuryangei*, *T. pedis*, *T. raubitschekii*, *T. rodhainii*, *T. soudanense*, y *T. yaoundei* (Refai, Heidy, & Mahmoud, 2013).

*T. rubrum* crece entre 25-28°C, puede presentar formas vellosas y granuladas. Las cepas vellosas pueden presentar un color rojo vino; no todas las

cepas llegan a presentar un cambio de color por lo que se requiere medios como papa-zanahoria +1% de dextrosa. En cuanto a las variedades granulosas, las colonias tienen un aspecto pulverulento, blanco-amarillo, planas e indistinguibles de *T. mentagrophytes* (Hernandez, 2007; Bonifaz, 2012).

*T. rubrum* posee abundantes hifas delgadas, tabicadas de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, sus conidios presentan una forma piriforme o “en gota” y se disponen de manera alterna en la hifa. No todas las cepas presentan macroconidios, los cuales miden entre 15-20  $\mu\text{m}$  de largo por 4-6  $\mu\text{m}$  de ancho y son más frecuentes en la forma granulosa. Para algunos autores existen diversas variedades; la forma granulosa se divide en: variedad *rhodainii* y africana; la vellosa o aterciopelada en: “Y”, flava, “P”, melanoide, hiperpigmentada, incolora y disgónica (de escaso crecimiento) (Hernandez, 2007; Bonifaz, 2012).



Figura 12. *Trichophyton rubrum*. Se observan conidios característicos de *T. rubrum*. Fotografía: Porras C.

## **2. *Trichophyton tonsurans* (Malmsten, 1845).**

La morfología de la colonia de *T. tonsurans* es beige o beige-café y puede ser acuminada, cerebriforme o crateriforme. En el reverso se observa un pigmento café-oscuro difuso y en algunos casos es ocre (var. *sulfureum*).

La microscopia muestra hifas delgadas y tabicadas más gruesas que las de *T. rubrum*; una de las características de este hongo es la presencia de clamidosporas terminales o intecalares. Este presenta microconidios piriformes o

en lágrima y miden entre 3-6  $\mu\text{m}$  de largo, se disponen en forma de “cruces de Lorena” (un microconid terminal a la fija), son paralelos y no alternos como en el caso de *T. rubrum*. Puede poseer macroconidios de 15-20  $\mu\text{m}$  de tamaño con tres a cuatro septos (Bonifaz, 2012).

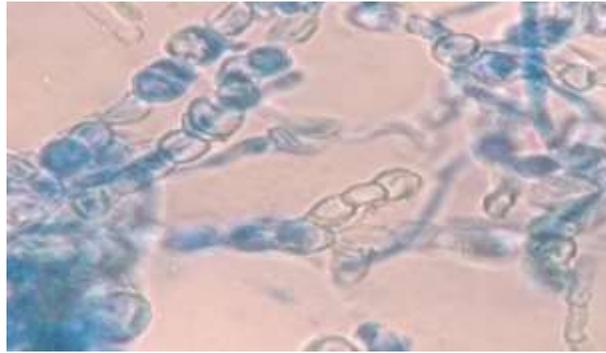


Figura 13. *Trichophyton tonsurans*. Se observan clamidoconidios características de *T. tonsurans*.  
Fotografía: Porras C

### **3. Complejo *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) Blanchard, 1896.**

Se han utilizado exámenes de mating y observaciones microscópicas respecto a *T. mentagrophytes*, las cuales han demostrado que es un complejo de especies, identificándose 3 estados telomorfos *Arthroderma vanbreuseghemii*, *Arthroderma simii*, y *Arthroderma benhamiae*, en general se considera un grupo que es antropofílico y un grupo zoofílico, considerándose a *T. interdigitale* y *T. mentagrophytes sensu stricto* como representantes de estos respectivamente (Makimura, 1998).

Sus colonias pueden ser: *asterorides*, *granulosum*, *lacticolor* y *radians*, posee dos variedades *T. mentagrophytes* y *T. interdigitale*. La variedad *interdigitale* se aísla con mayor frecuencia de tiña de los pies. *T. mentagrophytes*, es una especie zoofílica, mientras *T. interdigitale* es antropofílico. Una de las características bioquímicas que lo distinguen de *T. rubrum* es la presencia de la enzima ureasa.

Crecen en promedio a los 12 días de 25-28°C. En el caso de *T. interdigitale* (vellosa) la colonia es algodonosa, no forma pigmentos. En el caso de *T. mentagrophytes* (granulosa) la colonia es de aspecto pulverulento o polvoso,

plana, seca, ilimitada. En cuanto a la microscopía, se puede evidenciar abundante micelio delgado, en algunas cepas se observa gran cantidad de hifas en espiral o zarcillos. En la forma granulosa se observan muchos conidios libres, redondos o piriformes. Se pueden presentar escasos macroconidios en forma de puros (Bonifaz, 2012).



Figura 14. *Trichophyton mentagrophytes*. Se observa hifa en espiral característica de *T. mentagrophytes*. Fotografía: Porras C

#### 4. *Trichophyton verrucosum* (Bodin, 1902).

Este hongo crece entre 10-15 días a una temperatura de 25-28°C y tiene un crecimiento óptimo a 37°C, la colonia es limitada, vellosa, ligeramente plegada o con surcos, blanca o blanco-grisácea; existe dos variantes: colonias planas amarillas y poco vellosas y otras blancas grises no vellosas, variedad *ochraceum* y *discoides* respectivamente. En cuanto a su microscopía es un hongo de hifas delgadas, deformadas y tabicadas con candelabros, muy similar a *T. schoenleinii*. Una de las imágenes características es la producción de clamidoconidios en cadenas.



Figura 15. *Trichophyton verrucosum*. Se observan cadenas de clamidoconidios, representativo de *T. verrucosum*. Adaptado de: Bonifaz, 2012.

### **5. *Trichophyton violaceum* (Bodin, 1902).**

Este crece en un promedio de 20 días de 25-28°C. Sus colonias son de un aspecto liso o plegado color violeta oscuro y de aspecto ceroso con pigmento que no se difunde al medio. Puede ser bastante pleomórfico, cambia a una colonia blanca o crema. En cuanto a su microscopía es un hongo con abundante micelio tabicado, distorsionado y con ramificaciones; se puede observar presencia de abundantes clamidosporas intercalares.



*Figura 16. Trichophyton violaceum* Se observan conidios e hifas irregulares característicos de *T. violaceum*. Adaptado de: Bonifaz, 2012.

### **6. *Trichophyton concentricum* (Blanchard, 1895).**

Algunas cepas son tiamina dependientes, en México se han aislado cepas que no dependen de este factor pero si estimula su crecimiento. *T. concentricum* es una cepa de crecimiento lento, de 20 a 25 días a 25-28°C. Las colonias son limitadas, de color blanco-crema, cerebriformes y con aspecto de cera, sin pigmentos al reverso. En cuanto a su microscopía este posee abundante micelio tabicado con una gran cantidad de clamidoconidios intercalares y terminales. En algunas cepas se puede observar la presencia de candelabros fávicos. En los medios de tiamina se pueden encontrar microconidios piriformes de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo.



Figura 17. *Trichophyton concentricum*. Se observa una colonia crateriforme e hifas pectinadas características de *T. concentricum*. Adaptado de: Bonifaz, 2012.

#### **F. Género *Microsporium*.**

Este género está conformado por especies como *M. aenigmaticum*, *M. audouinii*, *M. boullardii*, *M. canis*, *M. cookei*, *M. equinum*, *M. ferrugineum*, *M. fulvum*, *M. gallinae*, *M. gypseum*, *M. langeroni*, *M. nanum*, *M. persicolor*, *M. praecox*, *M. racemosum*, *M. ripariae*, *M. rivalieri* y *M. vanbreuseghemii*, de los cuales se han aislado en Guatemala y República dominicana: *M. canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii* (exclusivamente en Rep. Dom.) y *M. nanum* (Martínez et al, 2012; Bonifaz, 2012; Martínez, Ameen, Tejada & Arenas 2014; Gugnani, & Denning, 2016).

Las características que distinguen a este género son: la presencia de macroconidios loculados, cuya cantidad de lóculos puede variar y depende ello de la especie; en general, los microconidios poseen un largo de 2-3 $\mu$ m (Mihali, Buruiana, Turcus, Covaci, & Ardelean, 2012).

##### **1. *Microsporium canis* (Bodin, 1902).**

Es el dermatofito que se aísla con mayor frecuencia en la tiña de la piel cabelluda, su estado teleomorfo es *Arthroderma otae*. Entre las especies que se encuentran relacionadas filogenéticamente están *M. ferrugineum* y *M. audouinii*,

pero estas varían en cuanto a su nicho ecológico, la primera es antropofílica mientras la última es zoofílica. Estas pueden causar manifestaciones clínicas muy similares. Una de las formas de diferenciar estas especies es por medio de la secuenciación de la región ITS2 (Refai, Heidy, & Mahmoud, 2013).

Las colonias de *M. canis* se desarrollan entre 6 y 8 días, a 25-28°C, son de aspecto veloso, plano, radiales, de color amarillo con micelio blanco. En cuanto a la microscopía estas poseen hifas delgadas, tabicadas y ramificadas con aspecto “de árbol” y poseen una gran cantidad de macroconidios de 10-50 µm de largo por 10-20 µm de ancho. En ocasiones son espiculados o equinulados con lóculos en forma de recuadros. Posee pocos microconidios piriformes de 3-5 µm de largo en promedio (Bonifaz, 2012).

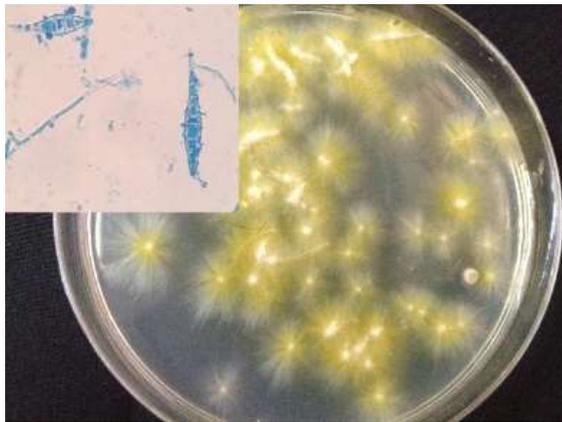


Figura 18. *Microsporium canis*. Se observa colonia y macroconidios con más de siete lóculos, características de *M. canis*.

## **2. *Microsporium audouinii* (Gruby 1843).**

Este hongo se aísla de manera frecuente en República Dominicana, se desarrolla entre 8 y 10 días, a 25-28°C. La colonia de manera inicial es de aspecto plano veloso, al inicio es blanca y posteriormente se torna amarillenta y en ocasiones grisácea; al reverso, posee colores rosa-salmón o rosa-café. En cuanto a su microscopía este hongo posee hifas pectinadas y tabicadas con poca cantidad de macroaleurioconidios de alrededor de 30-80 µm de largo por 8-15 µm

de ancho en forma de huso o de “hojas irregulares de árbol”, que pueden presentar pequeñas espículas o equinulas. Lo más característico de este hongo es lo irregular de los conidios (Bonifaz, 2012).



*Figura 19. Microsporium audouinii.* Se observan hifas pectinadas características de *M. audouinii*. Adaptado de: Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica*.

### **3. *Microsporium nanum* (Fuentes, 1956).**

Este hongo se desarrolla aproximadamente a los 10 días entre 25-28°. En cuanto al aspecto macroscópico de su colonia ésta es de aspecto pulverulento fino, al inicio es de color blanco y luego se torna beige; al reverso presenta pigmento color café ocre y en ocasiones rojo-marrón.

En cuanto a su microscopía este hongo posee micelio delgado con una gran cantidad de macroaleurioconidios de unos 12-20  $\mu\text{m}$  de largo por 5-8  $\mu\text{m}$  de ancho en forma de pera o piriformes. Se pueden presentar pequeñas espículas o equínulas; estas, se caracterizan por la presencia de 2 a 3 loculos con terminación redondeada (Bonifaz, 2012).



*Figura 20. Microsporium nanum.* Se observan macroconidios de 2-3 loculos, características de *M. nanum*. Adaptado de: Bonifaz, 2012.

## G. Género *Epidermophyton*.

Existen dos especies incluidas en este género. *E. floccosum* es un hongo antropofílico que es responsable de algunas dermatofitosis en los seres humanos y, de forma rara, en animales. *E. stokdaleae* es un hongo dermatofito de tipo geofílico que no ha sido reportado como agente etiológico de dermatofitosis (Cabañes, 2000).

### 1. *E. floccosum* (Harz, 1870).

Este hongo posee una distribución cosmopolita, en cuanto a la morfología de su colonia, la cual se desarrolla entre 10-15 días a temperatura ambiente; las colonias pueden ser aterciopeladas de color blanco-beige y en ocasiones pueden adquirir un aspecto crateriforme o cerebriforme. Al reverso presentan un pigmento difuso amarillo-verdoso.

En cuanto a su microscopía, este posee micelio delgado y tabicado, se presentan macroconidios o macroaleurioconidios en forma de clavos o mazos; miden aproximadamente entre 20-40  $\mu\text{m}$  de largo por 8-10  $\mu\text{m}$  de ancho. Generalmente, a estos se les denomina macroconidios con forma de mazo, poseen terminación redondeada (Bonifaz, 2012).



Figura 21. *Epidermophyton floccosum*. Se observan macroconidios en forma de mazo de *E. floccosum*. Adaptado de: Bonifaz, A. (2012).

## H. Análisis molecular de los dermatofitos

### 1. Taxonomía Clásica

A mediados del siglo XIX, Robert Remark observó estructuras peculiares que posteriormente fueron asociadas y nombradas como *A. schoenleinii* (Schoenlein, 1839).

Posteriormente, con base en las estructuras microscópicas, presentación clínica y cultivo, los dermatofitos fueron clasificados por Saboraud (1910) en cuatro géneros: *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton* (Cafarchia, Iatta, Latrofa, Gräser, & Otranto, 2013).

Emmons en 1934 reclasifica a los dermatofitos basado en las estructuras vegetativas y conidios en tres grupos: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* y reduce el número de especies válidas a 19 (Cafarchia et al., 2013).

Posteriormente, se unificaron las variedades de *T. tonsurans* y se reconoció *T. equinum* como un agente independiente. Luego al descubrir el estado teleomorfo se complicó la taxonomía de los dermatofitos. De acuerdo a su estado teleomorfo, algunas cepas clasificadas como *Microsporum* fueron clasificadas dentro de *Nannizzia* y posteriormente unificadas en *Arthroderma* donde se incluyeron a *Chrysosporium*, *Keratinomyces* y *Trichophyton*.

Con base en el mtDNA posteriormente *K. ajelloi*, *Keratinomyces ceretanicus* y *Keratinomyces longifusus* fueron reconocidos como especies (Cafarchia et al., 2013).

En 1960 y 1962 Ajello y Georg clasificaron a los dermatofitos basados en su nicho ecológico como: geofílicos, zoofílicos y antropofílicos. Posteriormente Graser et al, (1999), comienzan el estudio molecular de los dermatofitos basados en la región ITS DNA lo cual ayudó a categorizar a los dermatofitos cuyo origen no era geofílico, como verdaderos (Cafarchia et al., 2013).

## 2. Filogenia de los Dermatofitos

La filogenia de los dermatofitos, permanece poco clara, porque sus miembros están estrechamente relacionados en su filogenia y taxonomía; sus características fenotípicas son a veces pobres, ya que se ha evidenciado que muchos aislados a partir de muestras médicas y veterinarias han perdido su habilidad para reproducirse sexualmente (Takashio et al., 1997). Desde un punto de vista clínico, para la definición de las especies o la realización de un estudio epidemiológico, es importante disponer de un método fiable para la identificación de especies de dermatofitos. Durante mucho tiempo, los métodos fenotípicos, como la morfología, la fisiología y la bioquímica fueron la base de la taxonomía e identificación de dermatofitos, pero estos consumen mucho tiempo, son inexactos, y en muchos casos insuficientemente concluyentes para identificar los taxones menos comunes o aislados que representan potencialmente nuevas especies (Hubka et al., 2014a, 2014b).

Durante las dos últimas décadas, la secuenciación del DNA y la sistemática molecular han generado nuevos conceptos de especie en dermatofitos. Esto causó una reducción en el número de taxa reconocidas (Graser et al., 2008) y, por otro lado, ha conducido al descubrimiento de algunas especies crípticas nuevas (Choi et al., 2012; Hubka et al., 2014a, 2014b).

Los estudios de filogenia de los hongos iniciales se basaron en el uso del contenido G+C de DNA cromosómico (Davidson et al., 1980), homología de DNA total (Davidson et al., 1984), polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), análisis de DNA mitocondrial (mtDNA) (de Bièvre et al., 1987); (Mochizuki et al., 1990); (Kawasaki et al., 1992); (Nishio et al., 1992); (Kawasaki et al., 1996), amplificación aleatoria de DNA polimórfico (Liu et al., 1997); (Mochizuki et al., 1997); (Graser et al., 1998); (Kano et al., 1998), y la determinación de la secuencia de bases de 18S (Harmsen et al., 1995) o 28S (Leclerc et al., 1994) del rRNA o DNA ribosomal (rDNA).

Para dermatofitos, sin embargo, las relaciones filogenéticas de las especies no pueden ser totalmente definidas por estos métodos. No obstante,

durante la última década, se han obtenido avances importantes con la sistemática moderna, al utilizar marcadores moleculares como: regiones del espaciador interno transcrito 1 (ITS1) y 2(ITS2) del rDNA (Gräser et al., 2008).

En micología médica estos marcadores han demostrado ser útiles para resolver las relaciones entre organismos taxonómicamente relacionados (Carbone et al., 1993; Lobuglio et al., 1993; Berbee et al., 1995). ITS1 y el sistema de oligonucleótidos diseñados por White et al. (1990) y Makimura et al. (1998); han sido ampliamente utilizados en estudios filogenéticos (Attili et al., 1998; Makimura et al., 1998; Uijthof et al., 1998; Wedde et al., 1998). Así mismo, Makimura et al. (1998, 1999), mostraron que es factible diferenciar con éxito a los miembros del complejo *T. mentagrophytes*, a través de sus relaciones filogenéticas, por comparación de sus secuencias de las regiones ITS1, ya que son difíciles de identificar por sus características morfológicas.

Por un lado, se determinó la filogenia del grupo de dermatofitos, la cual incluye a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, y *Epidermophyton*, y se reclasificó a *T. tonsurans*, *T. schoenleinii* y *T. verrucosum*, como miembros del grupo *A. vanbreuseghemii*-*A. simii* o el grupo *A. benhamiae*. Los análisis filogenéticos y el uso de conceptos de especies filogenéticas con base en las regiones ITS del rDNA mejoraron la taxonomía; sin embargo, con el fin de obtener mejores resultados en la identificación intraespecie, se continuó en la búsqueda de otros marcadores moleculares (Gräser et al., 2008).

Por otro lado, un segmento del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina que es una proteína globular monomérica involucrada en la generación de microfilamentos, ha sido utilizada con éxito para la delimitación de las especies en otros grupos de hongos tales como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Scedosporium*, y *Phaeoacremonium* (Gilgado et al., 2005; Mostert et al., 2005; Serra y Peterson, 2007; Balajee et al., 2009). Este locus incluye algunos intrones, que son buenos estimadores para distinguir especies estrechamente relacionadas, por lo que Rezaei-Matehkolaei et al. (2014) utilizaron este marcador (*BT2*) para evaluar la variación intra e interespecífica en dermatofitos. Realizaron un estudio con 26

especies, incluidas en los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, las cuales fueron identificadas por medio de los marcadores ITS y *BT2*. El dendrograma obtenido con el gen *BT2*, presentó una topología casi compatible con la construida con base en la región ITS y se formaron clados similares; sin embargo, mostró mejor resolución el árbol construido con el gen *BT2*.

Otros marcadores han sido utilizados para clasificar especies estrechamente relacionadas, como la secuencia nucleotídica del gen del factor de elongación 1- $\alpha$  (Tef-1 $\alpha$ ), que codifica una parte de la maquinaria de traducción de proteínas, utilizado por primera vez con el hongo *Fusarium* (O'Donnell et al., 1998). Este gen presenta una sola copia y muestra un alto nivel de polimorfismo entre especies relacionadas, de manera que se consideró como otra alternativa para la identificación de los dermatofitos (O'Donnell et al., 2000). Mirhendi et al. (2015) utilizaron el gen Tef-1 $\alpha$  para evaluarlo en la identificación de dermatofitos.

Aunque se encontró una alta consistencia global entre la filogenia obtenida con el marcador ITS y el Tef-1 $\alpha$ , éste último mostró mayor poder de discriminación en especies relacionadas, como la *A. vanbreuseghemii*, *T. rubrum*, *A. benhamiae*, y complejos *A. otae*. Sin embargo, los autores hacen hincapié que un solo gen no puede especificar los límites entre las especies de los dermatofitos ya que hay múltiples líneas de evidencia que muestran que con la utilización de marcadores multilocus se puede obtener una evaluación más precisa del parentesco entre los aislados.

### **2.1 Internal transcribed spacer (ITS).**

La secuenciación del “*internal transcribed spacer*” (ITS) es usada comúnmente para el análisis filogenético e identificación de distintas especies de dermatofitos. Este análisis puede reconocer la taxonomía de los complejos *T. mentagrophytes*, *M. canis* y *T. rubrum*, lo cual permite reclasificar las variedades, así como encontrar sinónimos (Cafarchia et al., 2013).

Sin embargo, la región ITS presenta altas similitudes (99-100%) entre especies (*T. tonsurans* y *T. equinum*) y dentro de una misma especie (*M. canis*

complex). Los polimorfismos que discriminan (es decir código de barras) fueron observados en las regiones ITS1 e ITS2; estos, fueron utilizados para discriminar a los miembros del complejo *M. canis*, *T. tonsurans* y *T. equinum*. Al determinar el código de barras dentro de la región ITS1 se obtuvo una diferenciación de *T. soudanense* (población africana de *T. rubrum*) que previamente había sido sinónimo de *T. violaceum*. Similarmente la amplificación de ITS seguida por RFLP (restriction fragment length polymorphism) con enzimas como *MvaI* contribuyó a la identificación de especies cercanas, excepto para especies muy cercanas (*T. equinum*, *T. tonsurans* y *M. canis/M. ferrugineum*), las cuales fueron diferenciadas al utilizar otras enzimas de restricción (Cafarchia et al., 2013).

### 2.1.1 Filogenia por ITS

Algunos de los datos obtenidos mediante un análisis filogenético de ITS1 para el complejo *M. canis*, indican que *M. audouinii* está relacionado con *M. canis* y *M. gallinae* más que con *M. gypseum*, *M. fulvum* y *M. cookei*. Dentro del complejo de *M. canis*, se observa que *M. canis* (zoofilico) y *M. audouinii-M. ferrugineum* se encuentran en clados separados, lo cual fue confirmado por concatenados de ITS-1, ITS-2 y parcialmente chs-1 (quitina sintasa). Se logró agrupar a *M. fulvum* y *M. gypseum* en un grupo monofilético separado de *M. canis* y de *M. audouinii* (Cafarchia et al., 2013).

En cuanto al análisis filogenético del género *Trichophyton*, se ha logrado separar *T. ajelloi* y *T. terrestre* (geofílicos) de las especies zoofílicas de *Trichophyton*; también, se ha logrado separar las especies antropofílicas/zoofílicas de *Trichophyton* en dos grupos, *T. mentagrophytes/T. tonsurans* complex y *T. rubrum* complex (Cafarchia et al., 2013).

## I. Estudios en Guatemala y República Dominicana

En Guatemala, hasta la fecha, no se cuenta con estudios que revelen el porcentaje real de las dermatofitosis dentro de las micosis, pero existen algunos estudios que revelan porcentajes parciales sobre algunos aspectos epidemiológicos; en el caso de las onicomicosis en niños y adolescentes existen

dos estudios realizados, uno por Chang y Logemann (1994) en donde incluyeron niños menores de 12 años con esta enfermedad y se observó una mayor prevalencia en hombres respecto a mujeres, en una relación de 2:1. *T. rubrum* fue el agente causal más frecuente; en otro estudio realizado por Martínez et al., (2009) reportan en el período de un año 78 casos positivos, sin prevalencia marcada de sexo (aproximadamente 1:1); el agente causal más frecuente también fue *T. rubrum*. Así mismo Martínez et al. (2009) realizaron un estudio con 121 pacientes que presentaban sospecha clínica de *tinea capitis*, 60 mostraron resultados positivos con parasitación pilosa donde el agente causal responsable de la mayoría de los casos fue *M. canis*, seguido de *T. rubrum* y *M. gypseum*.

En República Dominicana, de igual manera, no existen estudios formales de las dermatofitosis, solo reportes aislados como el de Espinal et al. (2010), quienes estudiaron 265 muestras positivas para *tinea capitis*, el sexo masculino presentó un alto predominio y el agente causal responsable de la mayoría de los casos fue *M. canis* seguido de *M. audouini*. En otro estudio realizado por Arenas et al. (2010), se estudiaron muestras de pacientes con *tinea capitis*; ellos reportaron un cambio emergente en lo que respecta a los agentes causales de esta infección, encontraron que *T. tonsurans* y *M. audouini* eran los principales responsables, con predominio en el sexo masculino (71.18% respecto al femenino).

De manera habitual, a nivel mundial, en países de Centroamérica, la delimitación de especies en dermatofitos, en la mayoría de los laboratorios, se realiza con base en criterios micológicos o microbiológicos, que incluye macro y micromorfología de la colonia, así como capacidad de apareamiento y características bioquímicas/fisiológicas (Rezaei-Matehkolaei et al., 2012).

### III. JUSTIFICACIÓN

Los hongos dermatofitos están asociados a diversas patologías cutáneas. En cuanto a su diversidad, esta ha sido documentada de forma parcial (Martínez, et al. 2012). En Guatemala y República Dominicana no existen estudios sobre filogenia molecular de los dermatofitos. La micología molecular aún es una ciencia muy nueva y no existen estudios en ambos países que identifiquen las especies de dermatofitos para establecer relaciones inter e intra especies por medio de métodos moleculares. Se desconoce el grado de endemia (organismos geográficamente delimitados) o especiación (diversidad y evolución de los microorganismos entre distintos puntos geográficos) entre las especies de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*, tanto en República Dominicana como en Guatemala. El presente estudio será el primero a nivel Mesoamericano en establecer una identificación taxonómica molecular que proporcionará información nueva sobre las características moleculares de los hongos dermatofitos para conocer las relaciones filogenéticas entre cepas nacionales y de República Dominicana, así como plantear estrategias terapéuticas efectivas, ya que se ha observado que existe variación en la respuesta a los distintos antimicóticos respecto a especies de dermatofitos.

## IV. OBJETIVOS

### A. Objetivo General

Analizar las relaciones filogenéticas entre las especies de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* aislados de muestras clínicas procedentes de Guatemala y República Dominicana, entre junio de 2015 y julio de 2016

### B. Objetivos Específicos

1. Identificar aislados clínicos de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* por métodos fenotípicos (macro y micromorfología).
2. Establecer las variantes epidemiológicas relacionadas con las muestras clínicas: sexo, edad, origen, sitio anatómico, clasificación micológica y hallazgo micológico en el KOH.
3. Identificar aislados clínicos de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* por métodos genotípicos: PCR y secuenciación del espaciador interno transcrito -ITS.
4. Establecer la filogenia de las especies de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* a través de los métodos de Máxima Verosimilitud, Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana.
5. Determinar si existen diferencias filogenéticas intra/inter-especies entre los hongos dermatofitos procedentes de Guatemala y República Dominicana.

## V. HIPÓTESIS

Esta sección no aplica debido a que es un estudio de tipo descriptivo.

## VI. METODOLOGÍA

### A. Diseño de la investigación

El estudio es de tipo retrospectivo, transversal y descriptivo.

### B. Universo

#### 1. Población

Dermatofitos pertenecientes a los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* de muestras clínicas provenientes de la Ciudad de Guatemala recolectadas por la Universidad Nacional Autónoma de México –UNAM- y el Instituto Dermatológico y Cirugía de Piel “Prof. Dr. Huberto Díaz Boagert” de Santo Domingo, República Dominicana, aisladas entre junio de 2015 y julio de 2016.

#### 2. Muestra

La muestra está compuesta por 61 aislados de dermatofitos que corresponden al total de la población (total de dermatofitos aislados de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*). De estos 61 aislados, 42 corresponden a aislados de Guatemala y 19 a República Dominicana.

##### **2.1 Unidad de análisis**

La unidad de análisis la constituyen los hongos dermatofitos (61 aislados los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*) de Guatemala y República Dominicana.

##### **2.2 Unidad de muestreo**

Colección de hongos de Guatemala, la cual se encuentra depositada en la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Dermatológico y Cirugía de Piel “Prof. Dr. Huberto Díaz Boagert” en el caso de los hongos de República Dominicana.

### **2.3 Criterios de inclusión**

- a) Aislados de dermatofitos provenientes de dermatofitosis cutáneas (onicomicosis, *tinea faciei*, *tinea pedis*, *tinea manuum*, *tinea corporis*, *tinea capitis* y *tinea cruris*).
- b) Hongos dermatofitos que presente estructuras reproductivas (esporas) y sean reproductivamente viables

### **2.4 Criterios de exclusión**

- a) Muestras contaminadas, en las que no es posible su re-aislamiento.
- b) Muestras que durante el re-aislamiento presenten micelio estéril.
- c) Muestras cuyo registro epidemiológico este incompleto (sexo, edad, origen, sitio anatómico, clasificación micológica y hallazgo micológico en el KOH).
- d) Electroferogramas distorsionados, no legibles.
- e) Secuencias cortas o que no puedan editarse.

#### **2.4.1 Muestreo**

Debido a que en el presente estudio se utilizó el total de la población, no fue necesario realizar un cálculo para el muestreo

#### **2.4.2 Variables**

**2.4.2.1 Variable independiente:** Especies de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*

#### **2.4.2.2 Variables dependientes**

- Color macroscópico de la colonia
- Aspecto macroscópico de la colonia
- Superficie macroscópica de la colonia
- Bordos de la colonia

- Tipos de hifas
- Tipos de microconidios
- Tipos de macroconidios
- Tamaño de los microconidios
- Índice Q de los microconidios
- Tamaño de los macroconidios
- Análisis filogenético de los ejemplares

## **C. Recursos**

### **1. Humanos**

- Estudiante Investigador: Lic. Carlos Porras
- Asesor de México: PhD. María del Rocio Reyes Montes, UNAM
- Asesor de México: PhD. Erick Obed Martínez, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca (HRAEI)
- Asesor en Guatemala: PhD. Sergio Melgar, Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología, USAC
- Personal del Laboratorio de Micología Molecular, UNAM

### **2. Institucionales**

- Laboratorio de Micología Molecular de la Unidad de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Instituto Dermatológico y Cirugía de Piel “Prof. Dr. Huberto Díaz Boagert”, Santo Domingo, República Dominicana.

### **3. Materiales**

#### **3.1 Equipo**

- Autoclave
- Balanza

- Cámara digital (SONY Cyber-shot 8.1 mega pixeles, México, MX)
- Cámara de electroforesis
- Camara de Neubauer (BRAND, Wertheim, DE).
- Cámara fotográfica digital
- Campana de flujo laminar
- Centrífuga
- Columna DNeasy mini spin
- Columna lila QIAshredder mini spin
- Congelador
- Equipo FastPrep (MP Biomedicals, Solon, USA)
- Estereoscopio
- Fotodocumentador GelDoc™XR (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA)
- Herramienta para análisis de secuencias BLAST del NCBI (National Center of Biotechnology Information)
- Incubadora
- Microscopio (Olympus América Inc., Melville, NY) con micrometro
- Pinzas para estereoscopio
- Pipetas semi-automáticas
- Programa JmodelTest
- Programa BioEdit ver 7.2.5
- Programa Estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 12.0 (Montgomery, 1991)
- Programa FigTree ver 1.4.1.
- Programa Mr Bayes ver 3.2.6.
- Secuenciador
- Termociclador
- Tubos para PCR
- Vórtex (Daigger vórtex Genie 2 Scientific Industries. Inc, Bohemia, Nueva York, USA)
- Programa Mega ver 7.0.

### **3.2 Reactivos**

- Agar Mycosel
- Agar PDA
- Agar Sabouraud
- Agar Urea de Christensen
- Agua Milli Q estéril
- Amortiguador AP3/E
- Amortiguador AW
- Amortiguador de extracción AP1 del Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen)
- Amortiguador P2

- Buffer PE
- Buffer QG
- Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ )
- Colorante Azul de algodón
- Colorante Azul de lactofenol
- Desoxirribonucleotidos-trifosfato (dNTP)
- Extracto de Levadura Peptona Dextrosa
- Fago lambda (GIBCO, Brooklyn, US)
- Gel de Agarosa
- GelRed™ (0.3%) (Biotium Inc., Hayward, US)  
ITS- 4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´)
- Kit comercial QUIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)
- Kit DNeasy Plant Mini Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, DE)
- Región ITS: cebadores ITS 1 (5´- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´)
- Solución tampón TBS
- *Taq* polimerasa

### **3.3 De Oficina**

- Computadora
- Papel bond
- Impresora
- Escritorio
- Servicio de internet
- Escáner
- Cinta adhesiva

### **3.4 Otros**

- Pinzas
- Asas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cuaderno de notas
- Lapicero
- Lápiz
- Marcador de tinta permanente
- Papel Mayordomo
- Alcohol al 90%
- Cajas de Petri de vidrio y plástico
- Marcador
- Tubos de vidrio

## D. Método

### 1. Procedimientos

#### 1.1. *Recolección y análisis de datos*

La técnica de recolección de datos se realizó por observación, para este caso se utilizaron fuentes de tipo secundario, ya que se contaba con cepas recolectadas previamente; de acuerdo a la etapa de la investigación, se procedió a utilizar el software específico.

Previo al análisis de resultados, el control de calidad de los datos ingresados al libro bitácora se realizó mediante la verificación en cada cinco ejemplares, del correlativo conforme a la boleta de resultados, la cual fue llenada el mismo día para cada ejemplar. El control de calidad de las bases de datos digitales se realizó mediante la comparación del libro bitácora, semanalmente; así como cada 10 ejemplares respecto a las mismas.

#### 1.2 *Toma de muestra y pruebas de laboratorio*

Previo al análisis de los cultivos, las muestras tomadas directamente de pacientes fueron vistas por medio de KOH-DMSO, con sensibilidad de 87,5% y especificidad de 80%. Generalmente, el 60% de los aislados creció en un medio de cultivo (Mycosel Becton Dikenson)(Gomez *et al.*, 2011). La identificación macro y microscópica fue observador dependiente y está sujeta a errores, por lo que se utilizó la metodología propuesta por Frías De León *et al.* (2011). Toda la fase fenotípica fue realizada en Guatemala.

#### 1.3 *Caracterización fenotípica*

**Macromorfología:** La macromorfología se describió de acuerdo con lo descrito por Frías De León *et al.* (2011). Los aislados se sembraron en cajas de Petri con medio de agar papa dextrosa (APD) (Becton Dickinson, México, MX) y agar Sabouraud con antibióticos (Bioxon); se incubaron a 37 °C (28 °C) durante 4-8 días y, posteriormente, se observaron las características morfológicas coloniales de cada cultivo (color y textura 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.

**Obtención de cultivos monospóricos:** Para la obtención de los cultivos monospóricos se utilizó la metodología reportada por Frías De León *et al.* (2011). A partir del primoaislamiento de los aislados, éstos fueron sembrados en medio agar Sabouraud (Bioxon) y se incubaron durante 7 días a 37 °C; en seguida, se procedió a obtener una suspensión de conidios se agregó 1 mL de Tween 0.5 % a cada tubo de cultivo y se ajustó la cantidad de conidios a una concentración de 50 a 100 conidios/mL, se utilizó una cámara de Neubauer, BRAND, Wertheim, DE. Para obtener el número de conidios/mL se utilizó la siguiente fórmula:  $\frac{A \times 10,000}{B} = N$  (A= número de células; B= número de cuadrados de la cámara contados y N= número de conidios por ml).

Una vez ajustada la concentración de conidios, se sembraron 25 µL en una caja de Petri con medio agar Sabouraud con antibióticos (Bioxon), el inóculo se extendió en la placa con una varilla de vidrio, las cajas se incubaron a 37 °C y se realizaron observaciones a las 24 y 48 horas, con el fin de obtener colonias separadas, jóvenes, sin esporular. De las colonias crecidas se eligió una y se sembró en una caja con agar Sabouraud con antibióticos (Bioxon) y se incubó a 37 °C hasta observar esporulación abundante. Finalmente, se sembró por triplicado en tubos con agar Sabouraud con antibióticos (Bioxon) hasta observar crecimiento, un tubo se conservó a 4 °C, a otro se le adicionó 1 ml de aceite mineral, y el último tubo se utilizó para hacer una suspensión de conidios; esta suspensión fue repartida en 10 tubos que contenían agua bidestilada estéril para su preservación a 4 °C.

**Micromorfología.** Las características micromorfológicas de los dermatofitos se analizaron mediante la técnica de microcultivo de Ridell (1950), que consiste en cortar bloques de 1 cm<sup>3</sup> de medio agar Sabouraud; cada bloque se colocó sobre un portaobjetos estéril y se inoculó con el aislado correspondiente, en las cuatro aristas superiores del medio de cultivo. Sobre el bloque se colocó un cubreobjetos estéril y se incubó dentro de una caja de Petri a 37 °C durante 4 días.

Para evitar la deshidratación del agar durante la incubación, se colocó un algodón humedecido con agua estéril dentro de las cajas de Petri. Posteriormente, se separó cuidadosamente el cubreobjetos del agar, se depositó sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se observó al microscopio (Olympus América Inc., Melville, NY), con el fin de analizar las características morfológicas de los conidios. Las características microscópicas de los aislados se registraron con una cámara digital.

#### **1.4 Caracterización genotípica**

**Extracción de DNA genómico.** A partir de cada cultivo monospórico del dermatofito sembrado en PDA, se obtuvo una suspensión de conidios de la siguiente manera: se agregó a cada tubo 1 mL de PBST y se resuspendió por agitación en vórtex (Daigger vórtex Genie 2 Scientific Industries. Inc, Bohemia, Nueva York, USA), posteriormente se sembró en 50 mL de medio líquido Extracto de Levadura Peptona Dextrosa (ELPD), inmediatamente se incubó a 37 °C en agitación durante 2 días o hasta observar crecimiento micelial. Se cosechó individualmente la biomasa micelial de cada aislado por filtración en filtros *swinex*, se utilizó papel filtro estéril. Enseguida, se lavó el micelio con agua Milli Q estéril y se secó con papel filtro, posteriormente, la extracción del DNA se llevó a cabo con el Kit DNeasy Plant Mini Qiagen (Quiagen GmbH, Hilden,DE), de la siguiente manera: se tomaron 100 mg de masa micelial húmeda y se depositó en microtubos de 1.5 mL con 0.2 g de perlas de vidrio previamente estériles (400 a 455  $\mu\text{m}$  de diámetro lavadas previamente con ácido clorhídrico) y el amortiguador de extracción AP1 del Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). Los tubos fueron colocados en un equipo FastPrep (MP Biomedicals, Solon, 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 en las siguientes condiciones: 6 periodos de 40 s a 6 m/s con 2 min de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Se analizaron las

suspensiones de micelio resultantes bajo el microscopio (Olympus), para determinar el tiempo y velocidad óptima con la que se obtiene el mayor porcentaje de micelio roto y su contenido liberado dentro de la suspensión. Después de que se rompió el micelio, se adicionarán 4  $\mu\text{L}$  de RNAsa a 100 mg/mL, se agitó vigorosamente en el vórtex y se incubó la mezcla por 10 min a 65 °C, se mezcló 2 ó 3 veces por inversión. Pasados los 10 min se adicionaron 130  $\mu\text{L}$  del amortiguador AP2 y se incubó por 5 min en hielo, se centrifugó durante 5 min a 372 g. Se transfirió el volumen total del sobrenadante a la columna lila QIAshredder mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL para centrifugarse a 427 g por un min.

El sobrenadante obtenido en el tubo colector se transfirió a un nuevo tubo, 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 427g, se desechó 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 427g.

Por último, la columna se colocó en un microtubo nuevo de 1.5mL, a la membrana se le adicionó 50 $\mu\text{L}$  de agua Milli Q, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 427g para eluir. La concentración del DNA se determinó al comprar los DNAs problema con diferentes concentraciones del fago Lambda (GIBCO, Brooklyn, US) de 10, 20 y 50 ng, por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% teñido con GelRed™ (0.3%) (Biotium Inc., Hayward, US), se dejó correr por un tiempo aproximado de 45 min a 100 V y luego se procedió a observar el gel en un fotodocumentador GelDoc™XR (BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA). Posteriormente, el DNA obtenido de cada uno de los aislados se diluyó en agua Milli Q para obtener una concentración final de 10 ng/ $\mu\text{L}$  para su utilización.

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la identificación genotípica de aislados clínicos de dermatofitos**

Gen	Nombre del primer	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
Internal transcribed spacer (ITS)	ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	750	White et al., 1990
	ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

**PCR con la región ITS.** Se utilizaron los oligonucleótidos ITS1-F y ITS4R (Tabla 1), En un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L, se emplearon: 10 ng de DNA genómico, 2.0 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTPs, 1.0 U de *Taq* polimerasa y 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido; la amplificación se realizó en un termociclador con el siguiente programa: un ciclo de amplificación 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 gel red (0.5  $\mu$ g/100 mL). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V durante 60 min, en amortiguador TBE 0.5x. El estándar de tamaño molecular que se empleó fue de 100 pb DNA Ladder. Se utilizó como negativo un blanco de reactivos. Las imágenes de los geles se capturaron en un Fotodocumentador GelDoc™XR.

**Purificación de productos de PCR.** Se realizó la purificación de los productos de amplificación por medio del protocolo establecido por el fabricante del kit comercial QUIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE). Como se menciona a continuación, se cortó el fragmento que contiene la banda que se deseaba purificar, asegúrese la eliminación de los excesos de agarosa y se colocó en una columna de 1.5 mL, se pesó el fragmento, se aseguró de no exceder los 400mg por tubo y se agregó tres volúmenes de Buffer QG por un volumen de gel. Se incubó a 50 °C por 10 min o hasta que se observó la disolución del gel.

Posteriormente se colocó la columna en un tubo de colección de 2 mL. Se agregó 800 µL de la muestra en el tubo de colección y se centrifugó a 427g por 1 min; si se obtienen volúmenes mayores, se vuelve a agregar el mismo volumen y se centrifuga nuevamente por 1 min, se descarta el líquido del tubo y se vuelve a colocar en el mismo tubo de colección. Para lavar, se agregó 750 µL de Buffer PE a la columna y se centrifugó durante 1 min. Se descartó el líquido del tubo de colección y se centrifugó 1 min adicional, se colocó la columna en un tubo limpio de 1.5 mL. Finalmente, se eluyó el DNA con 50 mL de agua Mili Q y se centrifugó por 1 min.

**Secuenciación de los fragmentos amplificados.** Una vez purificados los fragmentos de los 61 aislados de dermatofitos, se secuenciaron en ambos sentidos (Macrogen Inc. Seoul, KOREA). El electroferograma de las secuencias obtenidas se editó con el programa BioEdit ver 7.2.5 (Hall, 1999).

### **1.5 Análisis estadístico y bioinformático**

**Análisis de las secuencias.** Se compararon las secuencias obtenidas de los tres genes con todas las secuencias de nucleótidos pertenecientes a hongos depositadas en el GenBank, a través del algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1997). Los alineamientos de las secuencias de los genes ITS (ITS1-5.8S-ITS2), fueron analizados y se tomaron en cuenta los porcentajes de similitud, identidad y valores; ello permitió corroborar la homología entre las secuencias obtenidas.

**Identificación molecular de las especies de los géneros *Microsporium* y *Trichophyton*.** Para el análisis filogenético, se eligieron secuencias de cada una de las especies de los géneros *Microsporium* y *Trichophyton*, con el fin de ubicar los aislados estudiados de diferente origen geográfico. El análisis filogenético se efectuó mediante los métodos de Máxima Verosimilitud, Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana. El modelo de evolución fue determinado por medio de Jmodel test (ver 2.1.10). Para la obtención del dendrograma por el método de Máxima Verosimilitud se utilizó el programa MEGA 7.0 (Kumar, Stecher & Tamura,

2016), mientras que para el obtenido por el método de Inferencia Bayesiana, se utilizó el programa Mr Bayes ver 3.2.2. (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) con 500,000 generaciones. El dendrograma obtenido por Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia fue validado por el método de bootstrap con 1000 repeticiones (Soltis y Soltis, 2003), mientras que el obtenido por Inferencia Bayesiana, fue validado al utilizar los valores de probabilidad posterior (Huelsenbeck y Rannala, 2003). Los dendrogramas se editaron por medio del programa FigTree ver 1.4.1 (URL10).

## VII. RESULTADOS

De las 61 cepas estudiadas, 42 pertenecen a Guatemala; de ellas, el 71% pertenecen al género masculino. El grupo etario predominante fueron adultos mayores de 50 años (29%). Las muestras fueron obtenidas de uñas en su mayoría (36%), con un tiempo de evolución mayor de 1 año (36%). El hallazgo microscópico más frecuente fueron filamentos (81%).

**Tabla 4. Caracterización epidemiológica de los ejemplares de Guatemala**

<b>Variables epidemiológicas</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	30	71
Femenino	12	29
<b>Grupo etario</b>		
1-10 años	11	26
10-20 años	0	0
20-30 años	5	12
30-40 años	5	12
40-50 años	9	21
mayor de 50 años	12	29
<b>Sitio anatómico</b>		
Uñas	15	36
Rostro	7	17
Extremidades inferiores	7	17
Piel cabelluda	5	12
Extremidades superiores	4	10
Ingle	2	5
Abdomen	2	5
<b>Tiempo de evolución</b>		
0- 1 mes	8	19
1-3 meses	10	24
3-6 meses	6	14
6 meses 1 año	3	7
mas de 1 año	15	36
<b>Hallazgo microscópico</b>		
Filamentos	34	81
Invasión endothrix	5	12
Dermatofitomas	3	7
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>100</b>

Elaboración: propia

Se analizaron 19 cepas procedentes de muestras clínicas de Santo Domingo, República Dominicana. Las cuales en su mayoría pertenecían al género masculino (63%), con un grupo etario mayoritario entre 30 y 40 años (32%), tomadas de extremidades inferiores (32%), un tiempo de evolución mas frecuente entre 0-1 mes (74%), con un hallazgo de filamentos (84%).

**Tabla 5. Caracterización epidemiológica de los ejemplares de República Dominicana**

<b>Variables epidemiológicas</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	12	63
Femenino	7	37
<b>Grupo etario</b>		
1-10 años	4	21
10-20 años	1	5
20-30 años	2	11
30-40 años	6	32
40-50 años	2	11
mayor de 50 años	4	21
<b>Sitio anatómico</b>		
Extremidades inferiores	6	32
Uñas	5	26
Piel cabelluda	3	16
Espalda	2	11
Rostro	2	11
Ingle	1	5
<b>Tiempo de evolución</b>		
0- 1 mes	14	74
1-3 meses	1	5
3-6 meses	1	5
<b>Hallazgo microscópico</b>		
Filamentos	16	84
Invasión endothrix	3	16
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>100</b>

Elaboración: propia

## Caracterización genotípica

Las concentraciones de DNA se obtuvieron mediante espectrofotometría, obteniendo valores con un intervalo de 45.78-5078.08 ng/ $\mu$ L, los valores de la relación 260/280 estuvieron en un intervalo de A=1.69-2.13, lo que indica que las purzas de los DNA se aproximan a los valores óptimos reportados (1.8-2.0). La cuantificación de DNA por electroforesis se realizó comparando diferentes concentraciones de fago  $\lambda$ , como se muestra en la figura 22. La concentración de todos los DNAs se ajustó a 50 ng/ $\mu$ L.

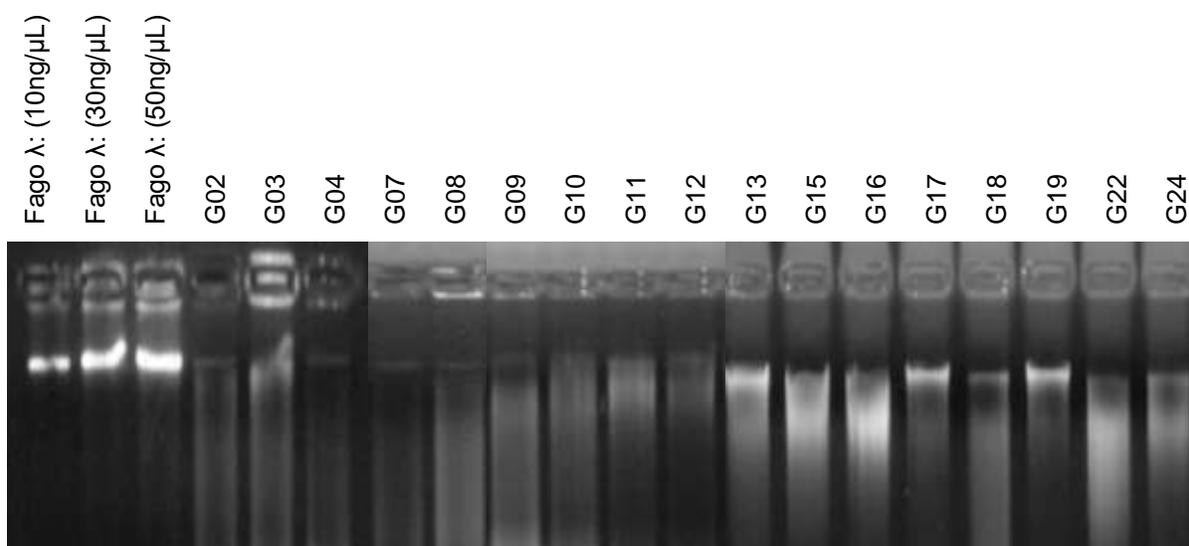


Figura 22. Cuantificación de DNA de los aislados de dermatofitos, por electroforesis en gel, de agarosa al 1%, teñido con GelRed™ (Biotium, USA), comparando con diferentes concentraciones de fago  $\lambda$ .

Después de que las secuencias fueron editadas, éstas se compararon con las secuencias de nucleótidos pertenecientes a hongos depositadas en el GenBank. Los alineamientos de las secuencias de los genes ITS se analizaron tomando en cuenta los porcentajes de similitud, identidad y valores de expectación, con el fin de corroborar la correcta amplificación de los aislados con ambos genes. Las secuencias de la región ITS presentaron un porcentaje de similitud en un rango de 98-100%, con un porcentaje de identidad entre 99-100%. (Tablas 6 y 7).

Las especies obtenidas por medio de características morfológicas fueron comparadas con las especies obtenidas posterior a la secuenciación y comparación de la región ITS1-5.8S-ITS2 con la base del GenBank por medio del algoritmo Blastn del NCBI (National Center for Biotechnology Information). En las tablas 6 y 7 se muestra la información correspondiente a las cepas guatemaltecas y dominicanas.

**Tabla 6. Identificación morfológica y molecular de los ejemplares estudiados, de Guatemala**

Cepa	Criterio morfológico	ITS1-5.8-ITS2	
		% Id*	Criterio Molecular
G02	<i>Microsporum gypseum</i>	99	<i>Nannizzia gypsea</i>
G03	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G04	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G07	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G08	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G09	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G10	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G11	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia gypsea</i>
G12	<i>Microsporum canis</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G13	<i>Microsporum gypseum</i>	99	<i>Nannizzia gypsea</i>
G15	<i>Microsporum gypseum</i>	99	<i>Nannizzia gypsea</i>
G16	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G17	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia gypsea</i>
G18	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G19	<i>Microsporum nanum</i>	99	<i>Nannizzia nana</i>
G22	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G24	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G25	<i>Trichophyton rubrum</i>	99	<i>Trichophyton rubrum</i>
G26	<i>Microsporum gypseum</i>	99	<i>Nannizzia incurvata</i>
G28	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G29	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G30	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G31	<i>Microsporum gypseum</i>	99	<i>Nannizzia gypsea</i>
G33	<i>Microsporum gypseum</i>	99	<i>Nannizzia incurvata</i>
G36	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G40	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>

\*%id: hace referencia al % de identidad molecular según el algoritmo BLASTn (NCBI)

Elaboración: propia

**Tabla 6 (continuación). Identificación morfológica y molecular de los ejemplares estudiados de Guatemala**

Cepa	Criterio morfológico	ITS1-5.8-ITS2	
		% Id*	Criterio Molecular
G41	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	99	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G42	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
G43	<i>Trichophyton tonsurans</i>	100	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
G47	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G49	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G51	<i>Trichophyton tonsurans</i>	100	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
G57	<i>Trichophyton tonsurans</i>	100	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
G58	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G59	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
G62	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G63	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
G64	<i>Microsporum canis</i>	100	<i>Microsporum canis</i>
G65	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G68	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia incurvata</i>
G71	<i>Microsporum gypseum</i>	100	<i>Nannizzia gypsea</i>
G73	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>

\*%id: hace referencia al % de identidad molecular según el algoritmo BLASTn (NCBI)

**Tabla 7. Identificación morfológica y molecular de los ejemplares estudiados de República Dominicana**

Cepa	Criterio morfológico	ITS1-5.8-ITS2	
		% Id*	Criterio Molecular
D01	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton rubrum</i>
D02	<i>Microsporum canis</i>	100	<i>Microsporum canis</i>
D03	<i>Microsporum canis</i>	100	<i>Microsporum canis</i>
D04	<i>Trichophyton sp</i>	99	<i>Trichophyton interdigitale</i>
D05	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton interdigitale</i>
D06	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
D10	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton rubrum</i>
D11	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton rubrum</i>
D12	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton rubrum</i>
D13	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton rubrum</i>
D14	<i>Microsporum audouinii</i>	100	<i>Microsporum audouinii</i>
D15	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton equinum</i>
D17	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton rubrum</i>
D18	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100	<i>Trichophyton equinum</i>
D19	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton equinum</i>
D23	<i>Trichophyton rubrum</i>	100	<i>Trichophyton rubrum</i>
D26	<i>Microsporum canis</i>	99	<i>Microsporum ferrugineum</i>
D28	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	99	<i>Trichophyton interdigitale</i>
D30	<i>Microsporum canis</i>	100	<i>Microsporum canis</i>

\*%id: hace referencia al % de identidad molecular según el algoritmo BLASTn (NCBI)

**Máxima verosimilitud con la región ITS de aislados procedentes de República Dominicana.** El árbol construido a través del método de Máxima Verosimilitud, para determinar la posición filogenética de los aislados de dermatofitos, formó dos grupos. El grupo I con tres subgrupos; el subgrupo Ia incluyó cuatro cepas (D28, D06, D05 y D04) que se asociaron con la secuencia de referencia de *T. interdigitale* (LT906383.1), también incluyó a la cepa de referencia de *T. mentagrophytes* (MF926358.1); el subgrupo Ib incluyó tres cepas (D15, D18 y D19) que se asociaron con la cepa de referencia de *T. equinum* (KR232951.1) y el subgrupo Ic que incluyó siete cepas (D01, D10, D11, D12, D13, D17 y D23) que se asociaron con la cepa de referencia de *T. rubrum* (KU729093.1), este grupo tuvo un valor de bootstrap de 96%. El grupo II formó dos subgrupos. El subgrupo IIa sólo incluyó la cepa D14, que se asoció con la cepa de referencia de *M. audouinii* (MF926388.1). El subgrupo IIb se formó con cuatro cepas (D02, D03, D26y D30) que se asociaron con la cepa de referencia de *M. canis* (GU291265.1) y también incluyó a la cepa de referencia de *M. ferrugineum* (MF926389.1), este grupo presentó un bootstrap de 99% (figura 23).

**Máxima verosimilitud con la región ITS de aislados procedentes de Guatemala.** El árbol construido a través del método de Máxima Verosimilitud, para determinar la posición filogenética de los aislados de dermatofitos, formó tres grupos. El grupo I se formó con tres subgrupos. El subgrupo Ia incluyó doce cepas (G65, G68, G49, G47, G28, G26, G24, G12, G4, G3, G10 y G33) que se asociaron con las cepas de referencia *Nannizzia incurvata* (NF415404.1) y *N. incurvata* (MH378242). El subgrupo Ib incluyó siete cepas (G2, G11, G13, G15, G17, G31, 71) que se asociaron con la cepa de referencia de *N. gypsea* (KT155845.1). El subgrupo Ic incluyó sólo una cepa (G19) que se asoció con la cepa de referencia de *N. nana* (MF926383.1). Este grupo tuvo como soporte un bootstrap de 94%. El grupo II se formó con dos subgrupos. El subgrupo IIa formado por una cepa (G25) que se asoció con la cepa de referencia de *T. rubrum* (KU29093.1). El subgrupo IIb formado por 20 cepas (G07, G08, G09, G16, G18, G22, G29, G30, G36, G40, G41, G42, G43, G51, G57, G58, G59, G62, G63, G73) que se asociaron con la cepa de referencia de *T. interdigitale* (NR144900.1) y con la cepa

de referencia de *T. mentagrophytes* (KT155741.1). Este grupo presentó un bootstrap de 79%. El grupo III sólo incluyó una cepa (G64) que se asoció con la cepa de referencia de *M. canis* (GU291265.1). Este grupo presentó un bootstrap de 99% (Figura 24).

**Máxima verosimilitud con la región ITS de aislados procedentes de Guatemala y República Dominicana (unificado).** El árbol construido a través del método de Máxima Verosimilitud, para determinar la posición filogenética de los aislados de dermatofitos, formó tres grupos. El grupo I con dos subgrupos; el subgrupo Ia incluyó 27 cepas (G62, G63, G59, G58, G57, G51, G43, G42, G41, G40, D28, D19, D18, D15, D06, D05, D04, G36, G30, G29, G22, G18, G16, G09, G08, G07 y G73) que se asociaron con la secuencia de referencia de *T. mentagrophytes* (KT155741.1), *T. interdigitale* (NR144900.1) y *T. equinum* (KR232951.1); el subgrupo Ib incluyó ocho cepas (G25, D01, D10, D11, D12, D13, D17 y D23) que se asociaron con la cepa de referencia de *Trichophyton rubrum* (KU729093.1), este grupo tuvo un bootstrap de 67%. El grupo II formó tres subgrupos. El subgrupo IIa sólo incluyó la cepa G19, que se asoció con la cepa de referencia de *N. nana* (MF926383.1); el subgrupo IIb se conformó con la siete cepas (G02, G31, G71, G17, G15, G13 y G11) que se asociaron con la cepa de referencia de *N. gypseae* (KT155845.1); el subgrupo IIc incluyó doce cepas (G10, G33, G24, G28, G47, G65, G03, G12, G26, G49, G04 y G68) que se asociaron con *N. incurvata* (MF415404.1) y *N. incurvata* (MH37842.1), este grupo presentó un bootstrap de 93%. El grupo III está conformado por seis cepas (G64, D30, D26, D14, D03, D02) que se asociaron con las cepas de referencia *M. ferrugineum* (MF926389.1), *M. audouinii* (MF926388.1) y *M. canis* (GU291265.1), este grupo presento un valor de bootstrap de 98% (Figura 25).

En la figura 23, 24 y 25 (páginas 56 a 58) se observa la historia evolutiva de los ejemplares de República Dominicana y Guatemala al utilizar las secuencias de la región ITS, la cual fue inferida por el método de máxima verosimilitud con el Modelo General de Tiempo Reversible (GTR) (el cual permite 6 tasas diferentes de sustituciones reversibles y permite diferencias en las frecuencias de las bases)

con una distribución gama según el programa Jmodel Test (ver 2.1.10). Los ejemplares fueron agrupados en base al test de bootstrap (1,000 repeticiones), cuyos valores se muestran en las ramas. El árbol fue construido a escala basado en el número de sustituciones por sitio. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA 7.0 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016).

**Inferencia Bayesiana con la región ITS de aislados procedentes de República Dominicana.** El árbol construido a través del método de Inferencia Bayesiana, para determinar la posición filogenética de los aislados de dermatofitos, formó dos grupos. El grupo I se formó con dos subgrupos. El subgrupo Ia incluyó una cepa (D14), que se asoció con la cepa de referencia de *M. audouini* (MF926388.1); el subgrupo Ib incluyó cuatro cepas (D02, D03, D26 y D30), que se asociaron con la cepa de referencia de *M. canis* (GU291265.1), también incluyó la cepa de referencia de *M. ferrugineum* (MF926389.1), este grupo mostró una probabilidad posterior de 1. El grupo II se formó con tres subgrupos. El subgrupo IIa incluyó siete cepas (D01, D10, D11, D12, D13, D17 y D23) que se asociaron con la cepa de referencia de *T. rubrum* (KU729093.1); el subgrupo IIb se formó con cuatro cepas (D28, D06, D05 y D04) que se asociaron con la cepa de referencia de *T. interdigitale* (LT906383.1), también incluyó a la cepa de referencia de *T. mentagrophytes* (MF926358.1), el subgrupo IIc se formó con tres cepas (D15, D18 y D19) que se asociaron con la cepa de referencia de *T. equinum* (KR232951.1). Este grupo mostró una probabilidad posterior de 0.9993 (Figura 26).

**Inferencia Bayesiana con la región ITS de aislados procedentes de Guatemala.** El árbol construido a través del método de Inferencia Bayesiana, para determinar la posición filogenética de los aislados de dermatofitos, formó tres grupos. El grupo I se formó con dos subgrupos. El subgrupo Ia incluyó siete cepas (G2, G11, G13, G15, G17, G31, G71) que se asociaron con las cepas de referencia de *Nannizzia gypsea* (KT155845) y *N. incurvata* (MH378242); el subgrupo Ib incluyó 20 cepas (G07, G08, G09, G16, G18, G22, G29, G30, G36, G40, G41, G42, G43, G51, G57, G58, G59, G62, G63, G73) que se asociaron con

la cepa de referencia de *T. interdigitale* (NR144900.1) y la cepa de referencia de *T. mentagrophytes* (KT155741.1); el subgrupo Ic incluyó una cepa (G25) que se asoció con la cepa de referencia de *T. rubrum* (KU729093.1), este grupo presentó una probabilidad posterior de 0.9874. El grupo II incluyó dos subgrupos. El subgrupo Ila formado por doce cepas (G3, G4, G12, G24, G26, G28, G47, G49, G65, G68, G10, G33) que se asociaron con la cepa de referencia de *N. incurvata* (MH378242 y MF926383); el subgrupo Iib incluyó una cepa (G19) que se asoció con la cepa de referencia de *N. nana* (MF926383.1), este grupo mostró una probabilidad posterior de 0.994. El grupo III sólo incluyó una cepa (G64) que se asoció con la cepa de referencia de *M. canis* (GU291265.1), este grupo mostró una probabilidad posterior de 0.9574 (Figura 27).

**Inferencia Bayesiana con la región ITS de aislados procedentes de Guatemala y República Dominicana (unificado).** El árbol construido a través del método de Inferencia Bayesiana, para determinar la posición filogenética de los aislados de dermatofitos, formó tres grupos. El grupo I se formó con tres subgrupos. El subgrupo Ia incluyó cuatro cepas (D15, D18, D19 y G41) que se asociaron con la cepa de referencia *T. equinum* (KR232951.1); el subgrupo Ib incluyó 23 cepas (G07, G08, G09, G16, G18, G22, G29, G30, G36, D04, D05, D06, D28, G40, G42, G43, G51, G57, G58, G59, G62, G63 y G73) que se asociaron con las cepas *T. interdigitale* (NR144900.1) y la cepa de referencia de *T. mentagrophytes* (KT155741.1); el subgrupo Ic se conforma por ocho cepas (G25, D01, D10, D11, D12, D13, D17 y D23) que se asociaron con la cepa de referencia *T. rubrum* (KU729093.1), el grupo I mostró una probabilidad posterior de 1. El grupo II incluyó cuatro subgrupos. El subgrupo Ila se conforma por diez cepas (G03, G04, G12, G24, G28, G46, G49, G65 y G68) las cuales se asociaron a la cepa de referencia *N. incurvata* (NF415404.1); el subgrupo Iib incluye a la cepa G19, que se asocia a la cepa de referencia de *N. nana* (MF926383.1); el subgrupo Iic incluye dos cepas (G10 y G33), asociadas a la cepa de referencia *N. incurvata* (MH378242), el grupo Iid incluyó siete cepas (G31, G71, G17, G15, G13, G11 y G2) que se asociaron con la cepa de referencia de *N. gypsea* (KT155845.1), este grupo mostró una probabilidad posterior de 0.9085. El grupo III está conformado por

seis cepas (D14, D02, D03, D26, D30 y D64), asociadas a las cepas de referencia *M. audouini* (MF926388.1), *M. canis* (GU291265.1) y *M. ferrugineum* (MF926389.1), con una probabilidad posterior de 1 (Figura 28).

Respecto a la figuras 26, 27 y 28 (páginas 59 a 61) se puede observar la historia evolutiva obtenida al utilizar el método de Inferencia Bayesiana de acuerdo al Modelo General de Tiempo Reversible (GTR) (el cual permite 6 tasas diferentes de sustituciones reversibles y permite diferencias en las frecuencias de las bases) con una distribución gama según el programa Jmodel Test (ver 2.1.10). Los árboles filogenéticos fueron obtenidos por medio del programa MrBayes v3.2.6 con 500,000 generaciones de MCMC (Markov Chain Monte Carlo) (Huelsenbeck y Ronquist, 2001).

**Máxima Parsimonia con la región ITS de aislados procedentes de República Dominicana.** El árbol construido a través del método de Máxima Parsimonia, para determinar la posición filogenética de los aislados de dermatofitos, formó dos grupos. El grupo I se formó con tres subgrupos. El subgrupo Ia incluyó cuatro cepas (D05, D28, D06 y D04) que se asociaron con las cepas de referencia *T. interdigitale* (LT906383.1) y *T. mentagrophytes* (MF926358.1); el subgrupo Ib incluyó tres cepas (D15, D18 y D19) que se asociaron con la cepa de referencia de *T. equinum* (KR232951.1); el subgrupo Ic incluyó siete cepas (D01, D12, D17, D11, D13, D10 y D23) que se asociaron con la cepa de referencia de *T. rubrum* (KU729093.1), este grupo tuvo como soporte un bootstrap de 99%. El grupo II se formó con dos subgrupos. El subgrupo IIa formado por una cepa (D14) que se asoció con la cepa de referencia de *M. audouinii* (MF926388.1); el subgrupo IIb formado por cinco cepas (D14, D26, D30, D02 y D03) que se asociaron con las cepas de referencia de *M. ferrugineum* (MF926389) MF926389.1) y *M. canis* (GU291265.1). Este grupo presentó un bootstrap de 100% (Figura 29).

**Máxima Parsimonia con la región ITS de aislados procedentes de Guatemala.** El árbol construido a través del método de Máxima Parsimonia, para determinar la posición filogenética de los aislados de dermatofitos, formó tres

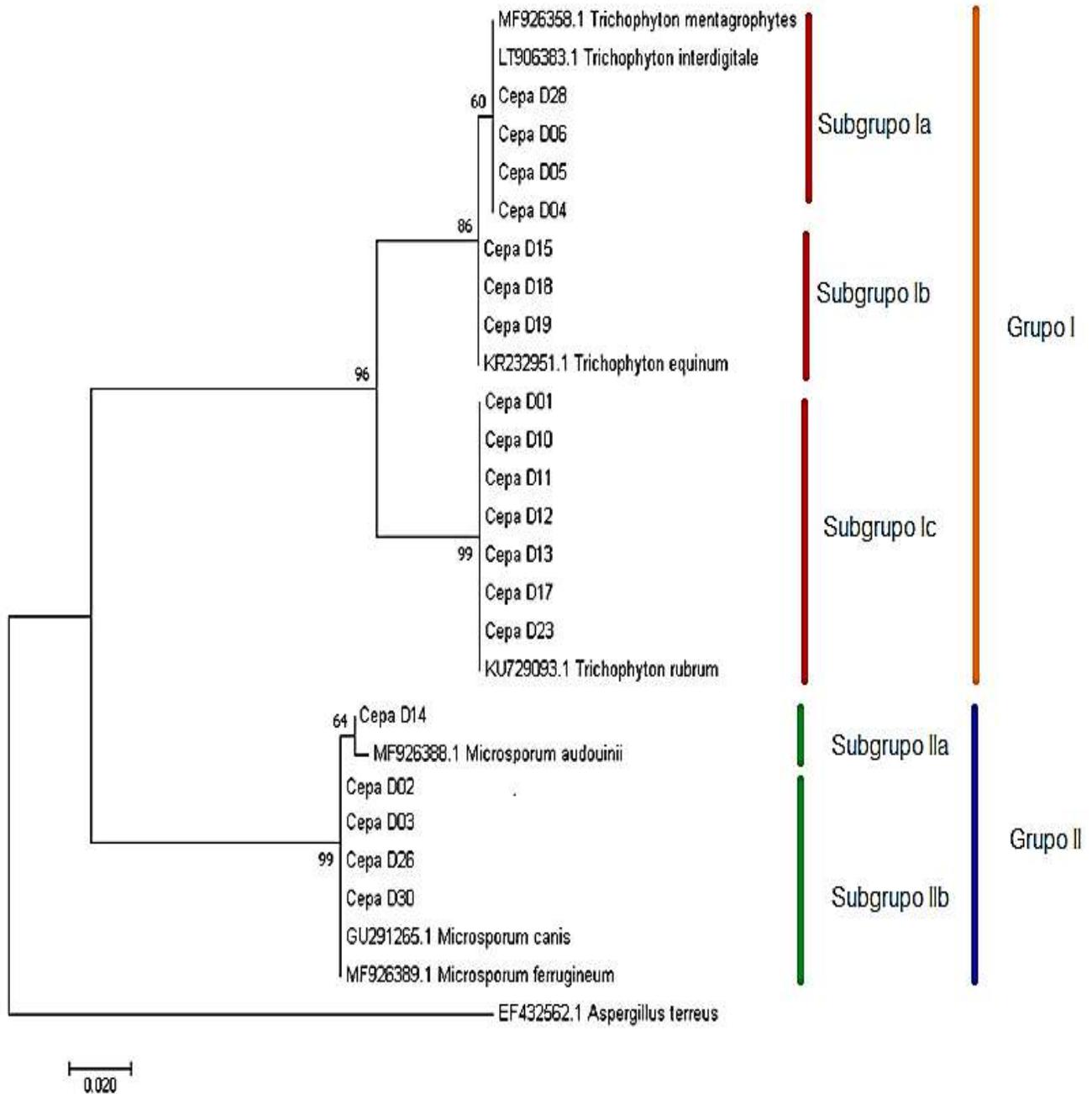
grupos. El grupo I se formó con tres subgrupos. El subgrupo Ia incluyó 20 cepas (G7, G63, G59, G58, G51, G42, G40, G30, G8, G73, G62, G57, G43, G41, G36, G29, G22, G18, G16, G9) que se asociaron con las cepas de referencia *T. mentagrophytes* (KT155741.1) y *T. interdigitale* (NR144900.1); el subgrupo Ib se formó por una cepa (G25) que se asoció con la cepa de referencia de *Trichophyton rubrum* (KU729093.1); el subgrupo Ic incluyó una cepa (G64) que se asoció con la cepa de referencia de *Microsporum canis* (GU291265.1), este grupo tuvo como soporte un bootstrap de 55%. El grupo II se formó con dos subgrupos. El subgrupo IIA formado por siete cepas (G31, G71, G17, G15, G13, G11, G2) que se asociaron con la cepa de referencia de *N. gypsea* (KT155845.1); el subgrupo IIB formado por doce cepas (G10, G33, G12, G26, G49, G68, G4, G24, G28, G47, G3, G65) que se asociaron con las cepas de referencia de *N. incurvata* (MH378242.1) y *N. incurvata* (MF415404.1), este grupo presentó un bootstrap de 93%. El grupo III se formó por un aislado (G19) que se asoció a *Nannizzia nana* (MF926383.1), con un bootstrap de 97% (Figura 30).

**Máxima Parsimonia con la región ITS de aislados procedentes de Guatemala y República Dominicana (unificado).** El árbol construido a través del método de Máxima Parsimonia, para determinar la posición filogenética de los aislados de dermatofitos, formó tres grupos. El grupo I se formó con dos subgrupos. El subgrupo Ia incluyó 27 cepas (G7, G63, G59, G58, G51, G42, G40, G30, G8, G73, G62, G57, G43, G41, G36, G29, G22, G18, G16, G9, D28, D18, D15, D06, D04, D19 y D05) que se asociaron con las cepas de referencia *T. mentagrophytes* (KT155741.1), *T. interdigitale* (NR144900.1) y *T. equinum* (KR232951.1); el subgrupo Ib se formó por ocho cepas (D01, D10, D12, D17, G25, D11, D13 y D23) que se asociaron con la cepa de referencia de *T. rubrum* (KU729093.1). El grupo II se formó con tres subgrupos. El subgrupo IIA formado por una cepa (G19) que se asoció con la cepa de referencia de *N. nana* (MF926383.1); el subgrupo IIB formado por siete cepas (G31, G71, G17, G16, G13, G11 y G02) que se asociaron con la cepa de referencia de *Nannizzia gypsea* (KT155845.1), el subgrupo IIC formado por doce cepas (G10, G33, G24, G28, G47, G65, G03, G12, G26, G49, G04 y G68) que se asociaron con *N. incurvata*

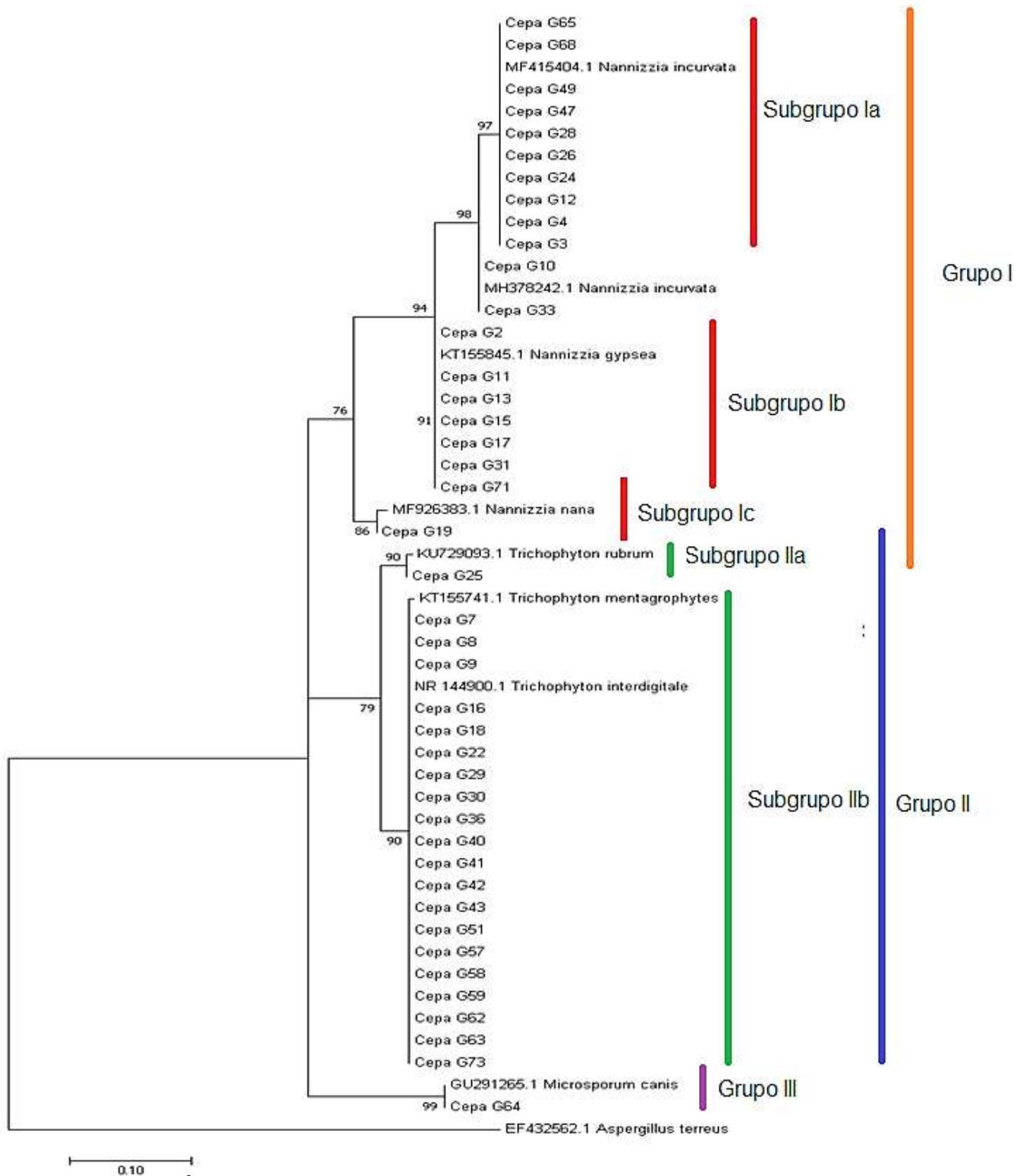
(MF415404.1) y *N. incurvata* (MH37842.1), este grupo presentó un bootstrap de 93%. El grupo III se formó por una cepa (G19) que se asoció a la cepa de referencia de *N. nana* (MF926383.1), con un bootstrap de 99% (Figura 30).

Para las figuras 29, 30 y 31 (página 62 a 64) se puede observar la historia evolutiva inferida por el método de Máxima Parsimonia. Los ejemplares fueron agrupados en base al test de bootstrap (1,000 repeticiones), cuyos valores se muestran en las ramas. El árbol se obtuvo por medio del algoritmo SPR (Subtree pruning regrafting). El análisis evolutivo fue realizado en MEGA 7.0 (Kumar et al, 2016).

## Método: Máxima Verosimilitud



**Figura 23. Árbol filogenético República Dominicana, Máxima Verosimilitud**



**Figura 24. Árbol filogenético Guatemala, Máxima Verosimilitud**

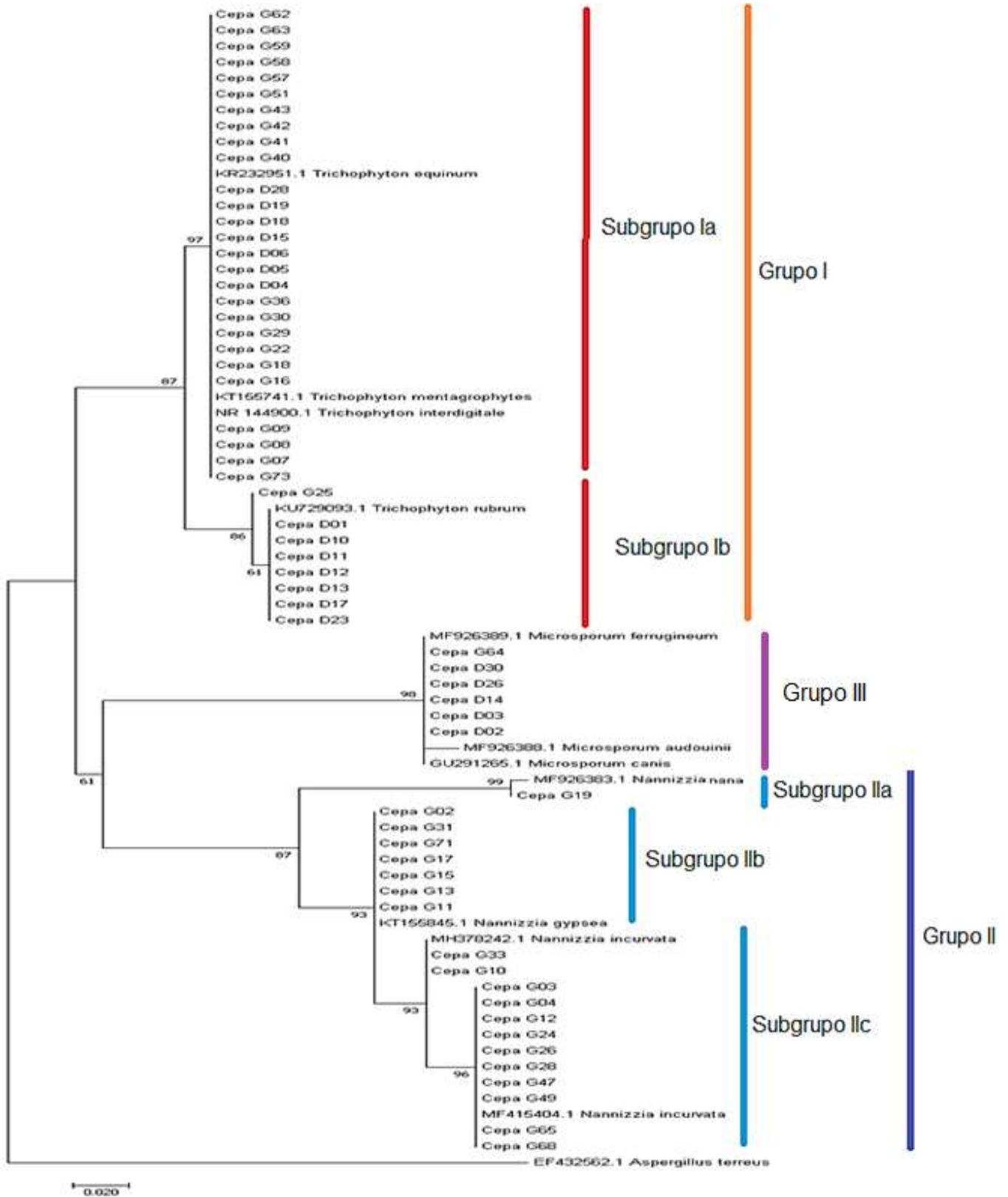
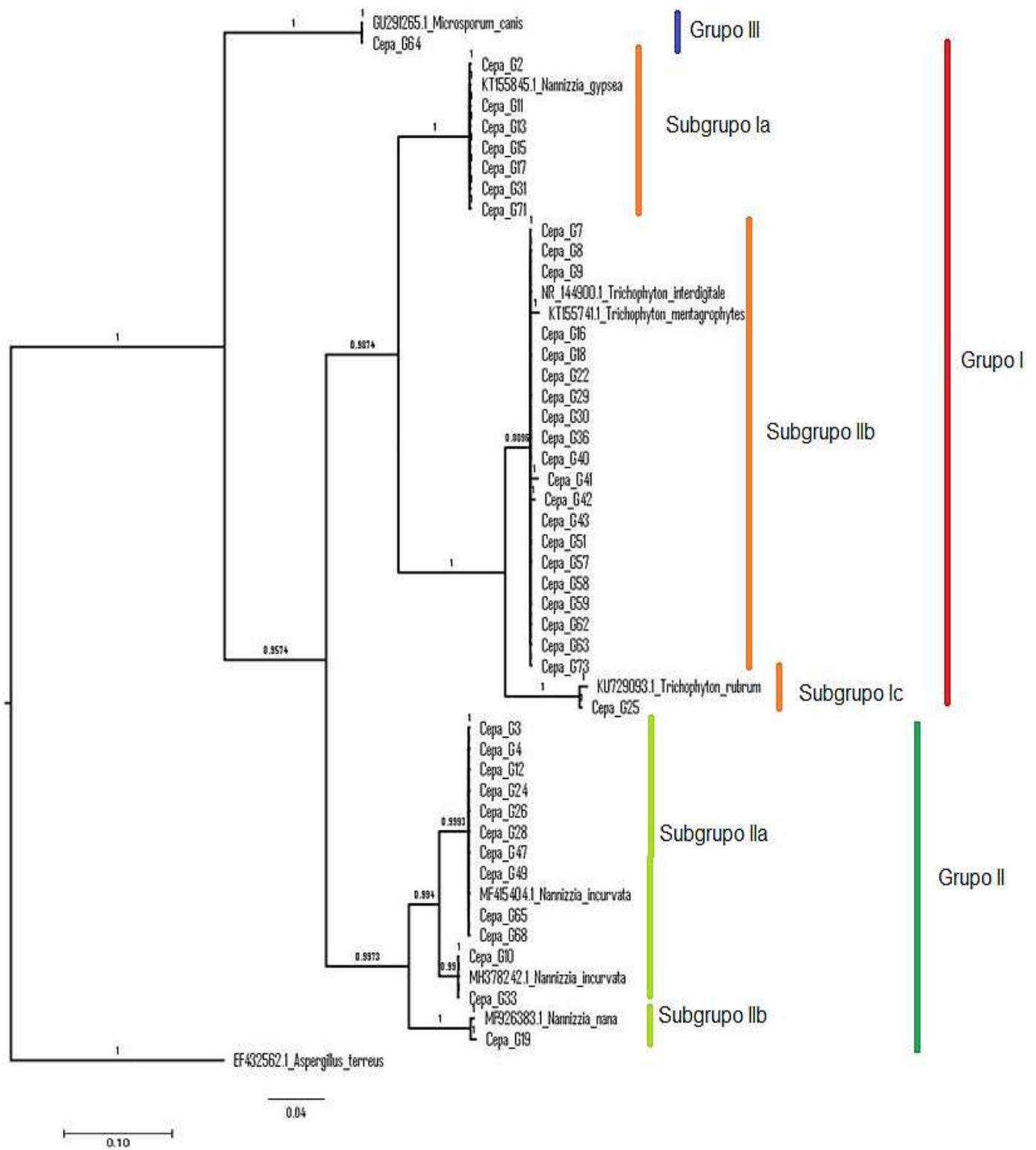


Figura 25. Árbol filogenético Unificado, Máxima Verosimilitud

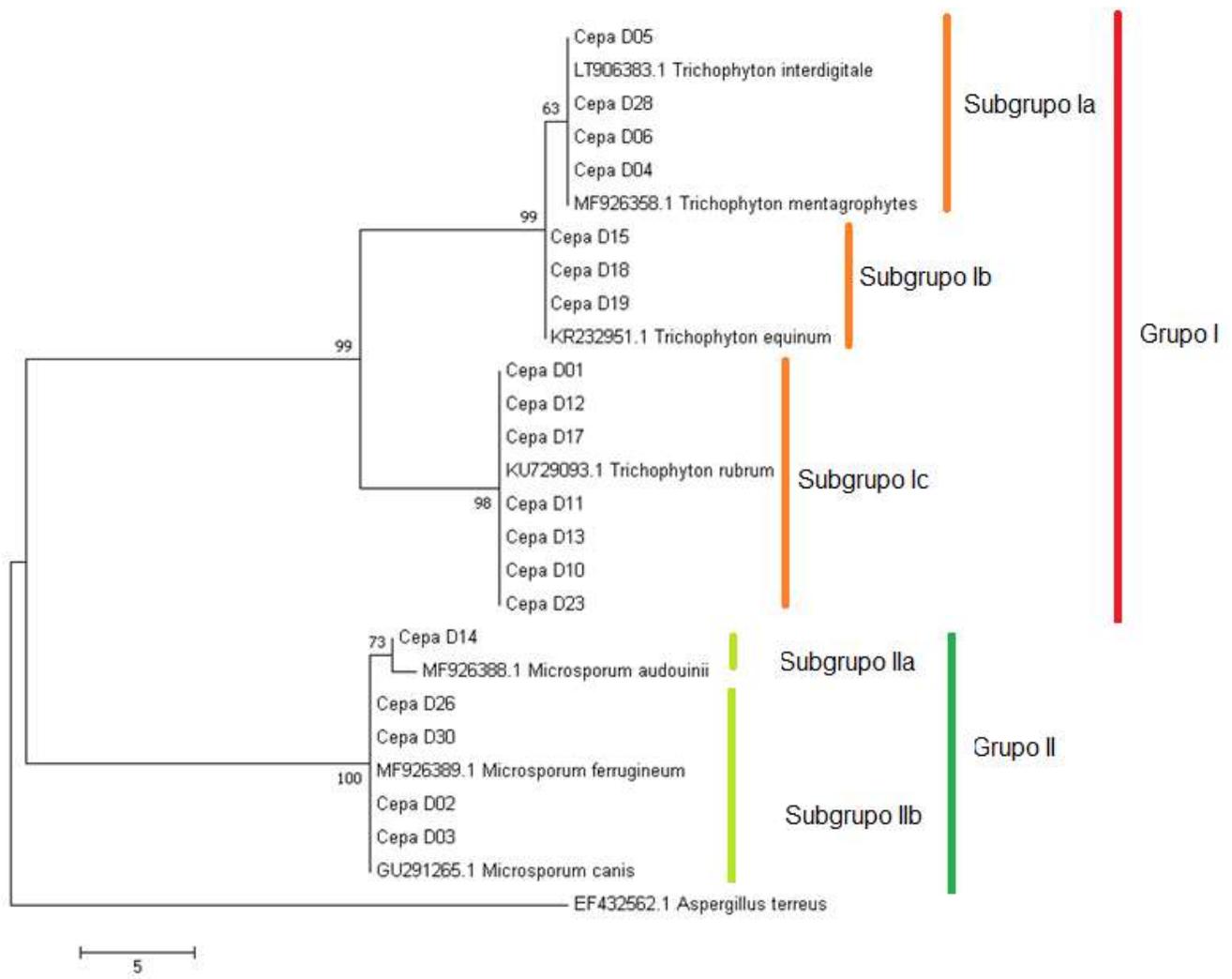




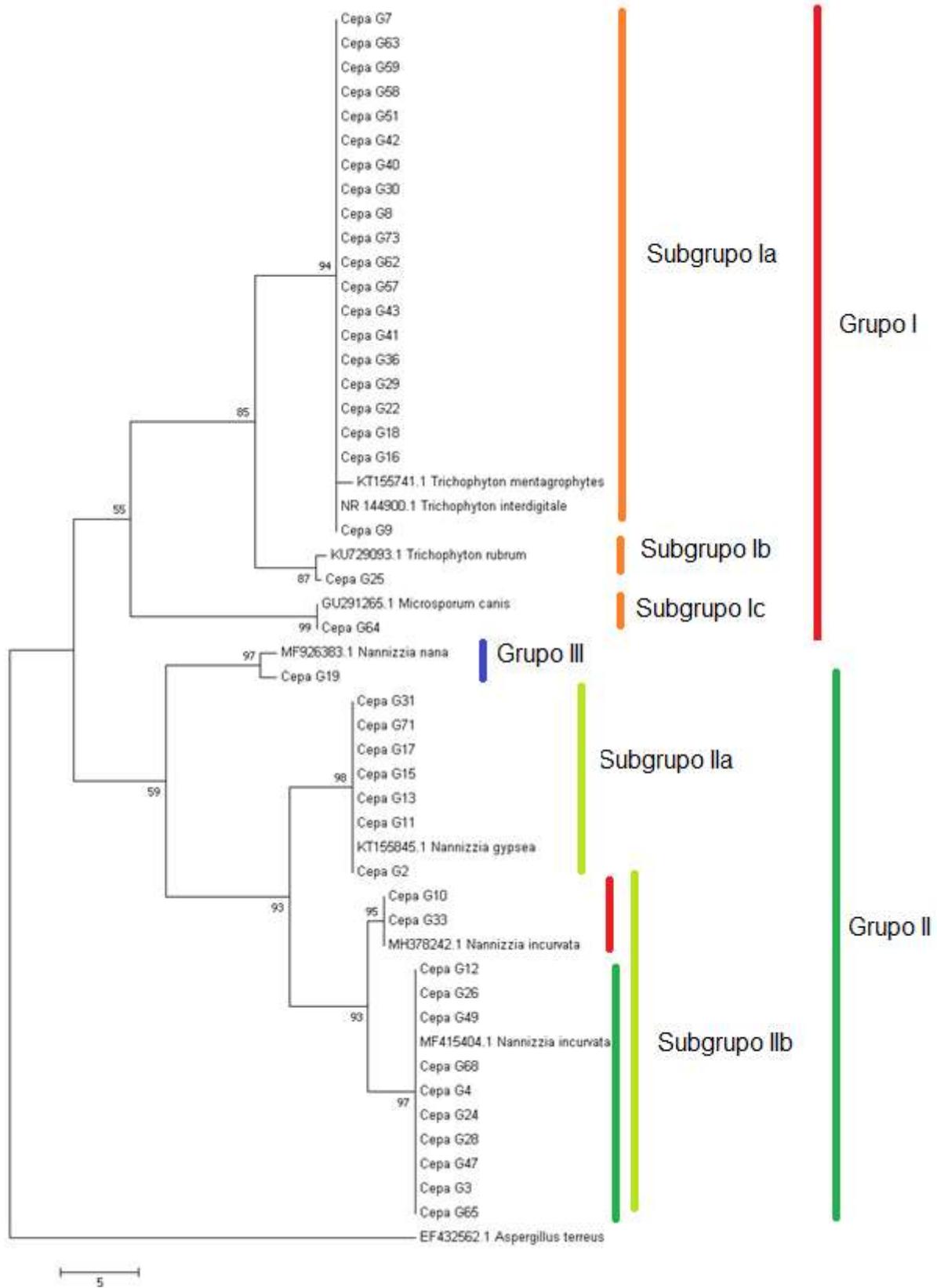
**Figura 27. Árbol filogenético Guatemala, Inferencia Bayesiana**



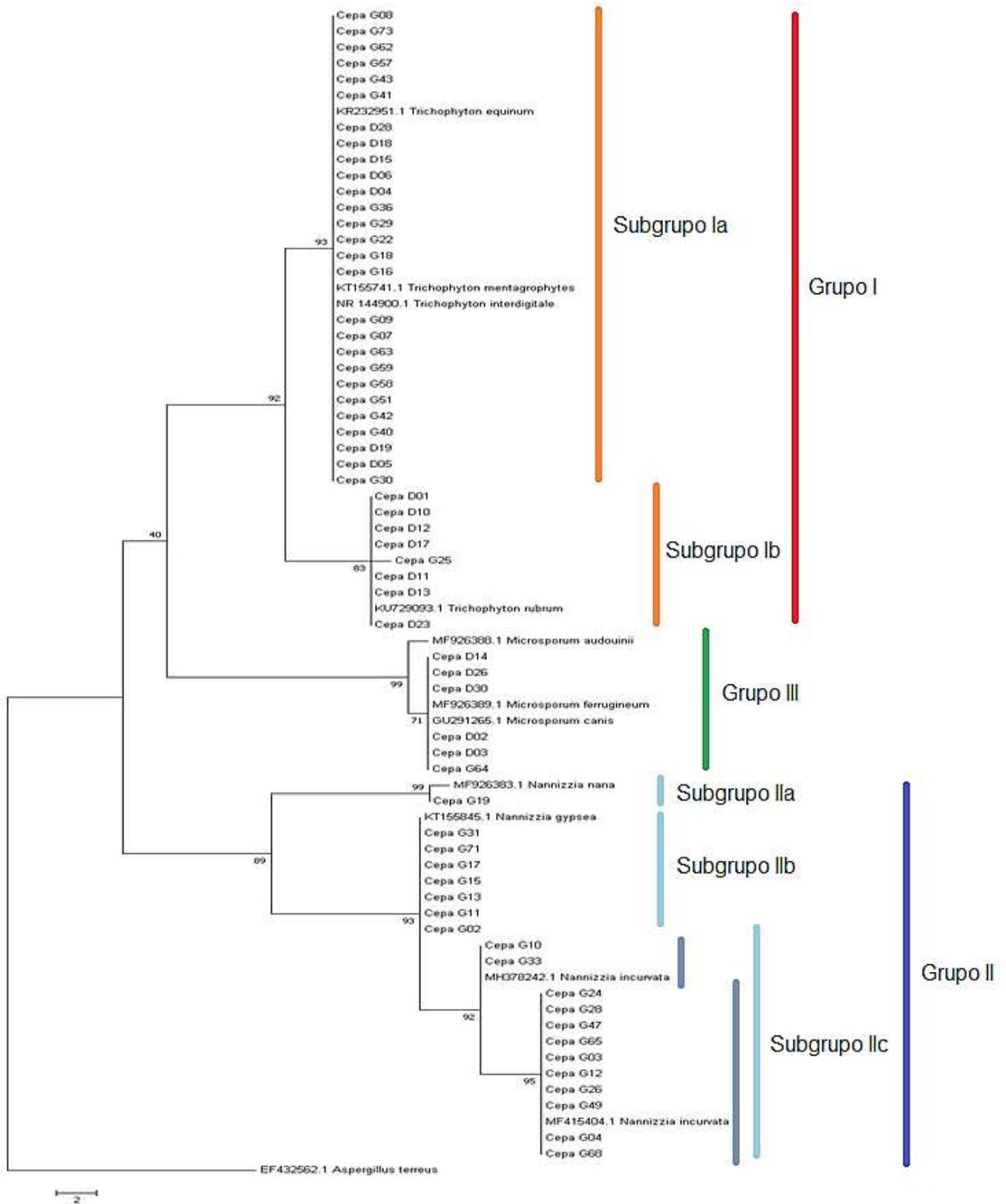
## Método: Máxima Parsimonia



**Figura 29.** Árbol filogenético República Dominicana, Máxima Parsimonia



**Figura 30. Árbol filogenético Guatemala, Máxima Parsimonia**



**Figura 31. Árbol filogenético Unificado, Máxima Parsimonia**

## VIII. DISCUSIÓN

Los hongos dermatofitos han modificado su epidemiología en los últimos 100 años debido a condiciones relacionadas con variables geográficas, socioeconómicas y migracionales, Zhan & Lui (2016) refieren que hace 100 años los dermatofitos más frecuentes eran, *E. floccosum*, *M. audouinii* y *T. schoenleinii* pero que han quedado limitados a países en vías de desarrollo; los más frecuentes en esta época a nivel global son: *T. rubrum*, *T. inderdigitale*, *T. tonsurans* y *M. canis*. Generalmente, su clasificación se ha realizado por medio de métodos fisiológicos (bioquímicos) y fenotípicos, tanto a nivel microscópico como macroscópico (colonias) Gräser et al (2008). A pesar de los avances en el campo de la biología molecular, aún se desconoce la epidemiología molecular de estos microorganismos en países en vías de desarrollo. Cabe mencionar que estos microorganismos producen un gasto anual de \$ 500,000,000 en antifúngicos a nivel mundial (Graser, Scott & Summerbell, 2008) desconociéndose cual es el costo de los mismos en latinoamérica.

De la recolección de dermatofitos se obtuvieron 42 cepas guatemaltecas del Departamento de Micología Molecular (UNAM) entre 2015 a 2016, las cuales presentaron características epidemiológicas relacionadas con datos previamente reportados por Martínez et al (2012), los cuales encontraron que en la consulta dermatológica de Guatemala las onimicosis son las dermatofitosis más frecuentes. En cuanto a las cepas procedentes del Instituto Dermatológico y Cirugía de Piel “Prof. Dr. Huberto Díaz Boagert” se pudo corroborar que al igual que las guatemaltecas, presentaron mayor frecuencia en hombres; las muestras en general fueron procedentes de uñas y extremidades inferiores, lo cual correlaciona en cuanto a la epidemiología global descrita por Seebacher & Bouchara (2008), en la que se ha observado que la dermatofitosis más comunes se observan a nivel de miembros inferiores, presentándose como una onicomycosis o tinea pedis.

Existen distintos hallazgos microscópicos en las dermatofitosis (filamentos, esporas, levaduras, dermatofitomas), los filamentos fueron la forma microscópica con mayor frecuencia para Guatemala y República Dominicana. En Guatemala se reportó la presencia de dermatofitomas (n=3), hallazgo descrito Robert y Evans (1998) y estudiado en Guatemala por Martínez y col (2010a, 2010b) que según los autores está relacionado con una baja respuesta de estos microorganismos a los antimicóticos convencionales.

Las formas anamorfas de los dermatofitos fueron agrupadas dentro de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* y su forma teleomorfa dentro del género *Arthroderma*. Actualmente la clasificación de los dermatofitos se aborda según la nueva clasificación propuesta por De Hoog et al (2017) en la cual se dividen en los géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Microsporum*, *Lophophyton*, *Arthroderma*, *Paraphyton* y *Ctenomyces*. Tal clasificación se obtuvo al concatenar las secuencias obtenidas por diversos marcadores, con lo que se logró separar varias especies donde antes solo se consideraba una misma especie. Los dermatofitos en general han mostrado ser un grupo homogéneo con una divergencia reciente, en la actualidad el uso del espaciador interno transcrito (ITS1-5.8S-ITS2) del rARN se ha considerado un buen marcador para diferenciar especies (Ziołkowska et al, 2015) cuya característica es la alta variabilidad entre las mismas, propuesto por Graser (1999) y Makimura (1999), utilizado en el presente estudio para identificación y análisis filogenético.

Los dermatofitos al inicio fueron identificados por medio de sus características micro-morfológicas distintivas lográndose determinar para el caso de Guatemala (Tabla No. 1) la presencia de 18 cepas de *Microsporum gypseum*, 14 de *Trichophyton mentagrophytes*, cuatro de *Trichophyton rubrum*, tres de *Trichophyton tonsurans*, dos de *Microsporum canis* y una de *Microsporum nanum*; posterior a extracción de DNA, amplificación y secuenciación se obtuvieron electroferogramas, los cuales fueron editados (Bioedit ver 7.2.5), para luego ser comparados con secuencias patrón depositados en el GenBank al utilizar para dicho fin el algoritmo BLASTn del NCBI, lográndose identificar en el caso de

Guatemala las especies de *Nannizzia gypsea* (siete cepas), *Nannizzia incurvata* (once cepas), *Trichophyton interdigitale* (15 cepas), *Microsporium canis* (una cepa), *Nannizzia nana* (una cepa), *Trichophyton rubrum* (una cepa) y *Trichophyton mentagrophytes* (cinco cepas); se pudo establecer que 12 cepas descritas inicialmente como *T. mentagrophytes* y (tres) cepas descritas como *T. rubrum* fueron identificadas por medio del algoritmo BLASTn como *T. interdigitale*. En general existe incongruencia entre los métodos fenotípicos y genotípicos a nivel de los dermatofitos lo cual es mencionado en otros estudios (Carfarchia et al, 2013; de Hoog et al, 2017; Garcia et al, 2016).

En el caso de las cepas identificadas inicialmente como pertenecientes al complejo *T. mentagrophytes* es importante reconocer la presencia de cuatro especies muy relacionadas entre sí a nivel fenotípico: *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. erinacei* y *T. simii* (Gracer, 1999) las cuales, debido al pleomorfismo fúngico, pueden llegar a ser indistinguibles e incluso, tal y como lo menciona Sun et al (2010) se puede complicar su diferenciación a nivel genotípico y separación filogenética. Normand et al (2018) hacen mención que por medio del marcador ITS (amplificación de ITS1-5.8S.ITS2) no se puede diferenciar adecuadamente *T. mentagrophytes* de *T. interdigitale*, *T. equinum* de *T. tonsurans* o *T. rubrum*, *T. violaceum* y *T. sudanense*, requiriéndose otros marcadores moleculares como  $\beta$  tubulina o factor de elongación 1- $\alpha$  (tef-1 $\alpha$ ). De igual manera dado el pleomorfismo fúngico, es probable que *T. rubrum* haya sido identificado de forma errónea debido a la escasa presencia de conidios por parte de los ejemplares o la presencia de micelio estéril, el fenómeno de infertilidad fúngica que se caracteriza por la ausencia de estructuras reproductivas (Arenas, R., 2011)

La taxonomía de los hongos dermatofitos ha sido revisada por medio de un análisis filogenético multilocus, realizado por De Hoog et al (2017), en el cual especies como *M. gypseum*, hongo de origen geofílico fue incluido dentro del género *Nannizzia* con el nombre de *Nannizzia gypsea* y a nivel de cultivo es indistinguible de *Nannizzia incurvata*, la cual fue descrita por Stockdale (1962); de las 18 cepas guatemaltecas identificadas al inicio por medio de características

microscópicas y morfología de las colonias, por medio del algoritmo BLASTn, siete cepas fueron identificadas como *Nannizzia gypsea* y once como *N. incurvata*, dato que correlaciona con las observaciones hechas por Dolenc & Gasparič (2017), donde se hace mención que las especies *N. incurvata* y *N. gypsea* están subestimadas, por lo que se requiere estudio de tipo molecular para su caracterización adecuada. Se encontró una cepa identificada como *Microsporium nannum* la cual fue reclasificada por De Hoog et al (2017) dentro del género *Nannizzia* como *Nannizzia nana*. Respecto al género *Microsporium* se pudo corroborar que la cepa identificada como *M. canis* concordaba con la identificación dada por el algoritmo BLASTn. El presente estudio corrobora por primera vez en Guatemala, a nivel molecular, la presencia de las especies mencionadas anteriormente; así mismo, por primera vez, se reporta en el país *N. incurvata*, *N. gypsea* y *T. interdigitale*.

En el caso de República Dominicana por medio de micromorfología, se determinó 11 cepas de *Trichophyton rubrum*, tres de *Microsporium canis*, tres de *Trichophyton mentagrophytes*, una de *Microsporium audouinii* y una de *Trichophyton* spp. (él cual no fue posible identificar microscópicamente debido a la ausencia de estructuras reproductivas) (Tabla No. 7), este último fue clasificado como *T. interdigitale* de forma posterior al utilizar el algoritmo BLASTn. El complejo *T. mentagrophytes* al igual que lo encontrado para Guatemala, fue reclasificado como *T. interdigitale* (dos *T. mentagrophytes*); así mismo se observa que algunas cepas fueron reclasificadas como *T. equinum* (dos *T. rubrum*, una *T. mentagrophytes*) al utilizar el algoritmo BLASTn. Estos datos concuerdan con los datos Guatemaltecos, donde por medio de micromorfología y la macromorfología no se puede deducir claramente la presencia de algunas especies (Sun et al, 2010), por lo que se subestima su frecuencia a nivel epidemiológico. En el caso del género *Microsporium* se obtuvo tres especies: *M. canis*, *M. ferrugineum* y *M. audouinii*; esta última es una especie endémica de República Dominicana a nivel latinoamericano (Sanchez, et al., 2010), es importante señalar que la comparación epidemiológica se complica ya que no existen estudios epidemiológicos previos para este país respecto a todas las dermatofitosis, a excepción del caso de *Tinea*

*capitis*. Se evidenció a nivel del análisis del algoritmo BLASTn la presencia de *M. ferrugineum* y *T. equinum*, lo cual constituye el primer reporte molecular de estas especies en República Dominicana.

Desde el punto de vista filogenético se ha definido el concepto de especie en función de su cercanía, es importante señalar que se describió el género *Trichophyton* como parafilético, separado por *Microsporum* y *Epidermophyton* (Chen, et al., 2011). La base de datos relacionada con el marcador ITS (ITS1-5.8S-ITS2) es amplia y posee distintas secuencias para la comparación con los datos obtenidos. (García et al, 2016).

Existen tres métodos utilizados en general respecto a la sistemática y filogenética, a) La Cladística (principio de Máxima Parsimonia), b) Máxima Verosimilitud y c) Inferencia Bayesiana. Estos, se seleccionan en función de las preferencias, y poseen la finalidad de mostrar la historia evolutiva del grupo taxonómico en estudio, En algunos casos, como lo menciona Peña (2011), se prefiere utilizar los tres métodos para darle robustez a la hipótesis filogenética en dado caso exista concordancia entre las topologías de los mismos (Martin et al, 2002).

En el presente estudio filogenético se evaluó la topología porterior a utilizar los tres métodos, se definió como grupo externo (outgroup) *Aspergillus terreus*, seleccionado en base al estudio de Capella, Kauff & Gabaldon (2013), quienes evidencian que a nivel de la historia evolutiva de Arthrodermatacea esta especie ocupa un lugar más cercano al ancestro común.

Respecto a República Dominicana (ver figuras 23, 26 y 29) se determinó que existe concordancia respecto a un ancestro común que separa a los géneros *Trichophyton* (especies antropofílicas) y *Microsporum* (especies zoofílicas en el caso de *M. canis* y antropofílicas en el caso de *M. audouinii*). Para Máxima Verosimilitud se obtuvo un bootstrat (1,000 repeticiones) de 96 (para el grupo de *Trichophyton* spp) y de 99 para el grupo de *Microsporum* spp); para inferencia Bayesiana se obtuvieron valores de probabilidad posterior de 0.98 (para

*Microsporium* spp.) y 0.99 (para *Trichophyton* spp). Para Máxima Parsimonia se determinó un bootstrap (1,000 repeticiones) de 99 (*Trichophyton* spp.) y de 100 (*Microsporium* spp.); respecto a la forma en que se bifurcan estas dos ramas existe concordancia entre los tres métodos, por lo que el análisis es robusto. Estos datos correlacionan con los obtenidos por García et al (2016) respecto a la distribución filogenética de hongos originarios de Sao Paulo, Brazil. Estos investigadores obtuvieron una historia evolutiva similar al utilizar la ITS1-5.8S-ITS2 y el dominio D (D1/D2) por medio del método de Máxima Verosimilitud y evidenciaron un origen común para las especies del género *Trichophyton* spp. y *Microsporium* spp. Carfarchia et al (2013) hacen mención que estos dos géneros están relacionados entre sí ya que surgieron debido a la adaptación del hospedero por lo que el origen de los hongos antropofílicos (contenidos en el género *Trichophyton*) está estrechamente relacionado a las especies zoofílicas de *Microsporium*, lo cual ubicaría a estas especies de forma más cercana al ancestro común (como se puede observar en los árboles obtenidos por Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud).

En las figuras 23, 26 y 29 se puede observar que se separan el complejo *Trichophyton mentagrophytes* del complejo *Trichophyton rubrum*, ambos con un ancestro común, similar como al estudio realizado por García et al (2016) en el que se observa la misma separación. Es importante también resaltar como lo menciona Carfarchia et al (2013) que existe un alto grado de colinearidad entre los dermatofitos; así mismo, hace mención que en el caso de *Trichophyton interdigitale* es complicado separarlo de *T. mentagrophytes*, así como es complicado dilucidar las dos variaciones de *T. interdigitale*: *T. interdigitale* de origen zoofílico y *T. interdigitale* de origen antropofílico, lo cual se logra según Beguin et al (2012) por medio de concatenar genes como ITS, actina y  $\beta$ -tubulina. Según Kawasaki (2011) es importante considerar el origen de las especies, las cuales en este estudio fueron de procedencia humana, respecto a los métodos utilizados; en el caso de la Inferencia Bayesiana se observó una mejor resolución para este complejo, ya que separó la cepa patrón MF926358.1 de *T.*

*mentagrophytes* y LT906383.1 de *T. interdigitale* con un factor de probabilidad posterior  $\geq 0.80$  (Figura 26).

Respecto al complejo *M. canis* se puede observar que los tres métodos coinciden en que existe una clara separación de la cepa D14 de República Dominicana identificada por medio del algoritmo BLASTn como *M. audouinii* de *M. canis* /*M. ferrugineum*, los cuales no pueden ser separados. Cafarchia et al (2009) menciona esta cercanía filogenética de *M. audouinii* (antropofílico) respecto a *M. canis* (zoofílico). Respecto a *M. ferrugineum* al utilizar ITS1 no se puede separar de *M. canis* independiente del método. Kazubiak et al (2004) utilizaron un conjunto de microsatélites para poder delimitar *M. canis*, *M. audouinii* y *M. ferrugineum*, dicho autor menciona que respecto a la historia evolutiva, *M. canis* es originario de África y que, posterior a la domesticación de los gatos en dicha área, este pudo haberse adaptado a un nuevo hospedero. En cuanto a *M. ferrugineum* este se originó en Asia y respecto a *M. audouinii* es confuso dilucidar su origen, aunque comparten un ancestro en común tal y como se pudo determinar por medio del análisis realizado por este autor y el análisis del presente estudio. El árbol filogenético en el caso de República Dominicana es robusto dado que los tres métodos utilizados presentan una topología similar.

En el caso de las cepas guatemaltecas es importante que aunque existe concordancia con su agrupación respecto a las cepas de referencia, la historia evolutiva es diferente. En el caso de Máxima Parsimonia esta coloca a *M. canis* en relación con los complejos *T. rubrum* /*T. mentagrophytes*; Cafarchia et al (2013) menciona que existe una gran distancia evolutiva entre *M. canis* y *T. rubrum* dada por la baja colinealidad y un alto número de inversiones. A su vez, al tomar en cuenta la nueva clasificación propuesta por Graser et al (2016) basada en ITS, porción parcial LSU, la proteína ribosomal 60S,  $\beta$ -tubulina, y el factor tres de traslación y elongación, el árbol obtenido en el presente estudio con mayor afinidad a lo antes mencionado son los de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, los cuales colocan a *M. canis* como un ancestro tanto del género *Nannizzia* como de *Trichophyton*, lo cual a su vez correlaciona con el estudio de

Garcia et al (2016) quienes encontraron que *M. canis* es más cercano al ancestro que da origen a los géneros *Trichophyton* y *Nannizzia*.

Respecto al género *Nannizzia* se logró establecer la presencia de *N. incurvata*, *N. gypsea* y *N. nanna*, se probaron dos cepas de referencia respecto a *N. incurvata*, MF415404.1 y MH378242.1 de origen Asiático y Europeo respectivamente, las cuales dieron como resultado dos grupos distintos al utilizar los tres métodos; las de origen europeo fueron más antiguas respecto al ancestro común para dicho grupo, esta agrupación revela un probable subgrupo dentro de la misma especie, lo cual debería ser corroborado desde un punto de vista multigénico (Graser et al, 2016). En el estudio de Kawasaki et al (1990) se hace mención que *N. gypsea* es más antigua en evolución que *N. incurvata*, por lo que el método que mejor resolución mostró para *Nannizzia* fue el de Máxima Verosimilitud. Se logró identificar la presencia de *N. nanna*, tanto desde un punto de vista microscópico como molecular. Este es el primer estudio molecular en Guatemala que utiliza cepas de este género, así mismo logra una clara separación entre las mismas a nivel filogenético.

Respecto a las cepas del género *Trichophyton* de Guatemala, al igual que las cepas de República Dominicana, no fue posible obtener una buena resolución respecto a *T. mentagrophytes complex* el cual debería de ser estudiado desde un punto de vista multigénico (Beguin et al, 2012); en general, el mejor método comparado con la filogenia actual de Graser et al (2016) que a su vez describe la historia evolutiva de las cepas Guatemaltecas es el de Máxima Verosimilitud, lo cual puede deberse a la falta de especies que aclaren la historia evolutiva de las cepas guatemaltecas.

Es importante considerar que existe una clara separación geográfica de Guatemala respecto a República Dominicana dada por un gran cuerpo de agua salada (Mar Caribe), separadas sus capitales por aproximadamente 2,155 kilómetros; dada esta diferencia y ausencia de datos epidemiológicos en República Dominicana, respecto a los dermatofitos y dermatofitosis, se planteó establecer las relaciones intra e interespecíficas entre los dermatofitos de ambas

regiones para evidenciar si existían agrupaciones distintas debidas a cambios notables a nivel de la región ITS1-5.8D-ITS2 por lo que se realizó un análisis filogenético conjunto.

Respecto al árbol filogenético unificado se evidenció que tanto Máxima Verosimilitud como Máxima Parsimonia colocan al género *Nannizzia* más cercano al ancestro común de los dermatofitos, el cual a su vez da origen a *Microsporum* y *Trichophyton*; la evolución en este caso se puede explicar de mejor manera por Inferencia Bayesiana, por medio de la cual se logró obtener un árbol parecido al propuesto por Gracer et al (2016) como modelo evolutivo y al obtenido por García et al (2016).

Respecto a las relaciones dentro del género *Trichophyton* para los ejemplares Guatemaltecos y Dominicanos en conjunto, se observó la falta de resolución en el caso del complejo *T. mentagrophytes* al utilizar los métodos de Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia, pero al comparar estos árboles con el obtenido por inferencia Bayesiana respecto a este grupo, se observó una buena resolución para *T. equinum*, con un valor de probabilidad posterior en este grupo mayor de 0.99 a excepción de la cepa guatemalteca G41, que según el algoritmo BLASTn y el análisis de los árboles guatemaltecos pertenece a *T. interdigitale*; se observó las mismas relaciones filogenéticas previamente mencionadas para el género *Trichophyton* las cuales concuerdan con lo mencionado en la literatura (Carfarchia et al, 2013).

En el caso del género *Nannizzia*, conformado por cepas Guatemaltecas se puede observar que se separan en dos grupos en base a su origen geográfico (*Nannizzia incurvata* de Asia y de Europa), al igual que lo observado en los árboles de Guatemala, lo cual no ha sido descrito en la literatura, que en el presente estudio es robusto debido a que se obtuvieron las mismas agrupaciones en los tres árboles de Guatemala por los tres métodos. También se pudo corroborar nuevamente en los tres árboles unificados, por lo que se puede decir que esta hipótesis posee robustez (Peña, 2011), lo cual podría ser confirmado por un análisis posterior de tipo multigénico (De Hoog et al, 2017).

Respecto al género *Microsporum*, se puede observar que no existe una buena resolución de *M. canis*, *M. ferrugineum* y *M. audouinii* al utilizar Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia, lo cual coincide con lo mencionado por Carfarchia et al (2013) quienes mencionan que existe poca distancia filogenética entre *M. canis* y *M. audouinii*. Según Carfarchia et al (2009) se puede lograr una buena resolución al concatenar ITS-1, ITS-2 y chs-1, obteniéndose un mejor resultado al igual que el estudio realizado por Kaszubiak et al (2004), quienes obtuvieron una buena separación al analizar 13 marcadores microsatelites y regiones no microsatelites. Respecto al análisis se puede observar una mejor resolución por Inferencia Bayesiana (Figura 6) en donde se separan *M. audouinii* del resto y *M. ferrugineum* con un bajo factor de probabilidad posterior (0.54), lo cual no es significativo ya que no agrupa a las cepas identificadas como esta especie al utilizar el algoritmo BLASTn, por lo que se requiere concatenar más genes para lograr una mejor resolución. En el caso del género *Microsporum* solo el método de inferencia Bayesiana logra establecer a nivel de evolución la lejanía de este grupo y su cercanía al ancestro común tal y como lo menciona Carfarchia et al (2013), de Hoog et al (2016) y García et al (2016).

Basado en los análisis de los árboles filogenéticos y en las comparaciones con la taxonomía actual y orden evolutivo (de Hoog et al 2016; Garcia et al 2016), se determinó que el método más útil en cuanto a filogenia de dermatofitos para las cepas Guatemaltecas fue Inferencia Bayesiana; no hubo dificultad al momento de escoger un grupo respecto a las cepas de República Dominicana. Dada la baja resolución en los género *Microsporum* y *Trichophyton*, es importante realizar estudios multigénicos para delimitar las especies, sin dejar a un lado las comparaciones de genomas completos, los cuales tienen aplicaciones clínicas, bioquímicas y filogenéticas. Tal y como lo menciona Carfarchia et al (2013) la proteómica y metabolómica pueden ayudarnos a comprender las relaciones entre especies/genotipos de dermatofitos y su hospedero a nivel molecular y bioquímico. En general, se logró corroborar la especie y las relaciones filogenéticas de los ejemplares identificados por medio del algoritmo BLASTn, se obtuvo una historia evolutiva cuyo origen está cercano a las cepas de origen geofílico-zoofílico que

posteriormente se adaptaron a hospederos humanos, se evidencio subgrupos respecto a la especie *N. incurvata*; sin embargo, no existieron subgrupos respecto a *T. interdigitale*, el cual a nivel filogenético contenía tanto cepas guatemaltecas como dominicanas, por lo que no existe diferencia inter-especie a nivel filogenético.

## IX. CONCLUSIONES

1. De las 42 cepas se identificaron, por métodos fenotípicos, 26 cepas del género *Microsporum* y 16 del género *Trichophyton*.
2. Se logró establecer que, la mayoría de las muestras guatemaltecas habían sido aisladas de hombres, con un grupo etario frecuente de 1-10 años, en uñas con un tiempo clínico de evolución más frecuente mayor a 1 año y con un hallazgo microscópico de filamentos. En República Dominicana también fueron aisladas de hombres, con un grupo etario más frecuente entre 30-40 años, ubicadas las lesiones en extremidades inferiores y uñas, con un tiempo clínico de evolución de 0-1 mes y con hallazgo de filamentos.
3. Respecto a Guatemala se identificaron por medio de la región ITS1-5.8S-ITS2, siete cepas de *N. gypsea*, 11 de *N. incurvata*, 15 de *T. interdigitale*, una de *M. canis*, una de *N. nana*, una de *T. rubrum*, y cinco de *T. mentagrophytes*; en cuanto a República Dominicana, siete cepas de *T. rubrum*, tres de *M. canis*, tres de *T. interdigitale*, una de *T. mentagrophytes*, una de *M. audouinii*, dos de *T. equinum* y una de *M. ferrugineum*.
4. Respecto a Guatemala se logró determinar que el mejor método en cuanto a hipótesis evolutiva y resolución fue el de Inferencia Bayesiana aunque no se logró una buena resolución del complejo de *T. mentagrophytes*. Respecto a República Dominicana se obtuvo concordancia con los métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana pero no se logró buena resolución en el caso de *M. audouinii* ni en el complejo *T. mentagrophytes*.
5. No se observaron diferencias filogenéticas inter-especie en cuanto a la agrupación de las cepas de Guatemala y República Dominicana ni en conjunto, observándose una agrupación intra-especie en el caso de *N. incurvata*.

## X. RECOMENDACIONES

1. Caracterizar las cepas estudiadas por medio de concatenar diferentes marcadores, como: proteína ribosomal 60S,  $\beta$ -tubulina, y factor 3 de traslación y elongación.
2. Realizar estudios comparativos de genomas completos con las cepas estudiadas para profundizar en el conocimiento de las mismas.
3. Estudiar con mayor profundidad las cepas pertenecientes a *N. incurvata* por medio de otros marcadores moleculares para corroborar la subdivisión hallada con ITS1-5.8S-ITS2.
4. Caracterizar las cepas estudiadas en función de sus proteínas (proteómoica) y de sus metabolitos (metabolómica).
5. Aumentar la cantidad de especies y de cepas para mejorar la agrupación y la resolución de los árboles filogenéticos

## XI. REFERENCIAS

- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(No.17), 3389-3402.
- Ameen, M. (2010). Epidemiology of superficial fungal infections. *Clinics in dermatology*, 28(No.2), 197-201.
- Anane, S., Chtourou, O., Chedi, A., Triki, S., Belhaj, S., Kaouech, E., & Chaker, E. (2007). Onychomycosis in the elderly. *Annales de dermatologie et de venerology*, 28(No.10), 743-747.
- Arenas, R. (2011). *Micología médica ilustrada*. (4<sup>a</sup> ed). México: Editorial McGraw-Hill.
- Arenas, R., Torres, E., Amaya, M., Rivera, E., Espinal, A., Polanco, M., & Isa-Isa, R. (2010). Tinea capitis. Emergencia de *Microsporum audouinii* y *Trichophyton tonsurans* en la República Dominicana. *Actas dermo-sifiliográficas*, 101(No.4), 330-335.
- Attili, D., De Hoog, G., & Pizzirani-Kleiner, A. (1998). rDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. *Medical mycology*, 36(No.4), 219-225.
- Balajee, S., Kano, R., Baddley, J., Moser, S., Marr, K., Alexander, B., & Brandt, M. (2009). Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *Journal of clinical microbiology*, 47(No.10), 3138-3141.

- Bao, Y., Wan, Z., & Li, R. (2013). *In vitro* antifungal activity of micafungin and caspofungin against dermatophytes isolated from China. *Mycopathologia*, 175(No.1-2), 141-145.
- Bassiri-Jahromi, S., & Khaksari, A. (2009). Epidemiological survey of dermatophytosis in Tehran, Iran, from 2000 to 2005. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 75(No.2), 142.
- Beguín, H., Pyck, N., Hendrickx, M., Planard, C., Stubbe, D., & Detandt, M. (2012). The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. *Medical mycology*, 50(No.8), 871-882.
- Benavides, J., & Villanueva, J. (2010). Tiña del cuero cabelludo por *Trichophyton tonsurans*: agente emergente en Colombia. *Rev. Asoc. Colomb. Dermatol*, 18, 99-101.
- Berbee, M., Yoshimura, A., Sugiyama, J., & Taylor, J. (1995). Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8 S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia*, 210-222.
- Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica*. (3ª ed.). McGraw Hill, México DF.
- Cabañes, F. (2000). Dermatophytes in domestic animals. *Rev Iberoam Micol*, 17, 104-8.
- Cafarchia, C., Romito, D., Sasanelli, M., Lia, R., Capelli, G., & Otranto, D. (2004). The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. *Mycoses*, 47(No.11-12), 508-513.

- Cafarchia, C., Romito, D., Capelli, G., Guillot, J., & Otranto, D. (2006). Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. *Veterinary dermatology*, 17(No.5), 327-331.
- Cafarchia, C., Otranto, D., Weigl, S., Campbell, B., Parisi, A., Cantacessi, C., & Gasser, R. (2009). Molecular characterization of selected dermatophytes and their identification by electrophoretic mutation scanning. *Electrophoresis*, 30(No.20), 3555-3564.
- Cafarchia, C., Weigl, S., Figueredo, L., & Otranto, D. (2012). Molecular identification and phylogenesis of dermatophytes isolated from rabbit farms and rabbit farm workers. *Veterinary microbiology*, 154(No.3), 395-402.
- Cafarchia, C., Iatta, R., Latrofa, M., Gräser, Y., & Otranto, D. (2013). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infection, Genetics and Evolution*, 20, 336-351.
- Capella-Gutierrez, S., Kauff, F., & Gabaldon, T. (2014). A phylogenomics approach for selecting robust sets of phylogenetic markers. *Nucleic acids research*, 42(No.7), e54-e55.
- Carbone, I., & Kohn, L. (1993). Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia*, 415-427.
- Chang, P., & Logemann, H. (1994). Onychomycosis in children. *International journal of dermatology*, 33(No.8), 550-551.

- Choi, J., Gräser, Y., Walther, G., Peano, A., Symoens, F., & de Hoog, S. (2012). *Microsporum mirabile* and its teleomorph *Arthroderma mirabile*, a new dermatophyte species in the *M. cookei* clade. *Medical mycology*, 50(No.2), 161-169.
- Coelho, L., Aquino-Ferreira, R., Maffei, C., & Martinez-Rossi, N. (2008). In vitro antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidio and arthroconidio. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(No.4), 758-761.
- Das, S., Goyal, R., & Bhattacharya, S. (2007). Laboratory-based epidemiological study of superficial fungal infections. *The Journal of dermatology*, 34(No.4), 248-253.
- Davison, F., & Mackenzie, D. (1984). DNA homology studies in the taxonomy of dermatophytes. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 22(No.2), 117-123.
- Davison, F., Mackenzie, D., & Owen, R. (1980). Deoxyribonucleic acid base compositions of dermatophytes. *Microbiology*, 118(No.2), 465-470.
- Dawson, C., & Gentles, J. (1962). The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* van-Breuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie & Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 1(No.1), 49-57.
- De Bievre, C., Dauguet, C., Nguyen, V., & Ibrahim-Granet, O. (1987). Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens. In *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*, 138 (No.6), 719-727.

- De Hoog, G., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M. & Rezaei-Matehkolaei, A. (2017). Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, 182(No.1-2), 5-31.
- Dolenc-Voljč, M., & Gasparič, J. (2017). Human Infections with *Microsporum gypseum* Complex (*Nannizzia gypsea*) in Slovenia. *Mycopathologia*, 182(No.11-12), 1069-1075.
- Elewski, B. (1999). Onychomycosis. Treatment, quality of life, and economic issues. *American journal of clinical dermatology*, 1(No.1), 19-26.
- Espinal A, Herrera MC, Sánchez E, Isa R, Miniño M, Cruz AC, Arenas R. (2010). Tiña de la cabeza en República Dominicana. Estudio de 285 casos en encuestas epidemiológicas en diferentes zonas geográficas que incluyeron zona urbana, rural y rural margina. *Rev Dom Dermatol*, 37(No.1); 11-15.
- Faergemann, J., & Baran, R. (2003). Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, 149(No.65), 1-4.
- Frías-De León, M., Zavala-Ramírez, M., Córdoba, S., Zúñiga, G., Duarte-Escalante, E., Pérez-Torres, A. & Rocio R. (2011). Phenotypic characteristics of isolates of *Aspergillus* section *Fumigati* from different geographic origins and their relationships with genotypic characteristics. *BMC infectious diseases*, 11(No.1), 1.
- Garcia Garces, H., Hrycyk, M., Giacobino, J., Capela Machado, G., Domingos Arantes, T., Theodoro, R., & Bagagli, E. (2016). Molecular identification and phylogenetical analysis of dermatophyte fungi from Latin America. *Mycoses*, 59(No.12), 787-797.

- Ghannoum, M., Hajjeh, R., Scher, R., Konnikov, N., Gupta, A. K., Summerbell, R., & Rich, P. (2000). A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(No.4), 641-648.
- Gilgado, F., Cano, J., Gené, J., & Guarro, J. (2005). Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(No.10), 4930-4942.
- Glass, N., & Donaldson, G. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(No.4), 1323-1330.
- Gómez, L., Massaro, M., Tabares, Á., Zuluaga, A., Vélez, J., Vélez, A., & Cano, L. (2011). Utilidad de la muestra de la lámina ungular en el diagnóstico de onicomicosis. *Rev. Asoc. Colomb. Dermatol. Cir. Dermatol*, 19(No.3).
- Graser, Y., el Fari, M., Presber, W., Sterry, W., Tietz, H. (1998). Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *British Journal of Dermatology*, 138(No.4), 576-582.
- Gräser, Y., El Fari, M., Vilgalys, R., Kuijpers, A., De Hoog, G., Presber, W., & Tietz, H. J. (1999). Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Medical Mycology*, 37(No.2), 105-114.
- Gräser, Y., Kuijpers, A., Presber, W., & De Hoog, G. (1999). Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Medical mycology*, 37(No.5), 315-330.

- Gräser, Y., Kuijpers, A., El Fari, M., Presber, W., & De Hoog, G. (2000). Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporium canis* complex. *Medical mycology*, 38(No.2), 143-153.
- Gräser, Y., De Hoog, G., & Kuijpers, A. (2000). Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. *Rev Iberoam Micol*, 17, 17-21.
- Gräser, Y., De Hoog, S., & Summerbell, R. C. (2006). Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Medical mycology*, 44(No.3), 199-209.
- Gräser, Y., Czaika, V., & Ohst, T. (2012). Diagnostic PCR of dermatophytes—an overview. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 10(No.10), 721-725.
- Gräser, Y., Scott, J., & Summerbell, R. (2008). The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. *Mycopathologia*, 166(No.5-6), 239-256.
- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 12(No.3), 454-500.
- Gugnani, H., & Denning, D. (2016). Burden of serious fungal infections in the Dominican Republic. *Journal of infection and public health*, 9(No.1), 7-12.
- Gupta, A. (2000). Onychomycosis in the elderly. *Drugs & aging*, 16(No.6), 397-407.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series 41*, 95-98.

- Harmsen, D., Schwinn, A., Weig, M., Bröcker, E., & Heesemann, J. (1995). Phylogeny and dating of some pathogenic keratinophilic fungi using small subunit ribosomal RNA. *Journal of medical and veterinary mycology*, 33(No.5), 299-303.
- Havlickova, B., Czaika, V., & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 51(No.4), 2-15.
- Hernández-Hernández, F., Manzano-Gayosso, P., Córdova-Martínez, E., Méndez-Tovar, L., López-Martínez, R., de Acevedo, B., & Cerbón, M. (2007). Morphological varieties of *Trichophyton rubrum* clinical isolates. *Revista Mexicana de Micología*, (No.25), 9-14.
- Hubka, V., Cmokova, A., Skorepova, M., Mikula, P., & Kolarik, M. (2014). *Trichophyton onychocola* sp. nov. isolated from human nail. *Medical mycology*, myt010.
- Hubka, V., Dobiášová, S., Dobiáš, R., & Kolařík, M. (2014). *Microsporum aenigmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of tinea corporis. *Medical mycology*, myt033.
- Huelsenbeck, J., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(No.8), 754-755.
- Huelsenbeck, J., & Rannala, B. (2004). Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic biology*, 53(No.6), 904-913.
- Iorio, R., Cafarchia, C., Capelli, G., Fasciocco, D., Otranto, D., & Giangaspero, A. (2007). Dermatophytoses in cats and humans in central Italy: epidemiological aspects. *Mycoses*, 50(No.6), 491-495.

- Kac, G. (2000). Molecular approaches to the study of dermatophytes. *Medical mycology*, 38(No.5), 329-336.
- Kanbe, T. (2008). Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166(No.5-6), 307-317.
- Kano, R., Nakamura, Y., Watari, T., Watanabe, S., Takahashi, H., Tsujimoto, H., & Hasegawa, A. (1998). Identification of clinical isolates of *Microsporum canis* and *M. gypseum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization analyses. *Mycoses*, 41(No.3-4), 139-143.
- Kawasaki, M., Aoki, M., Ishizaki, H., Nishio, K., Mochizuki, T., & Watanabe, S. (1992). Phylogenetic relationships of the genera *Arthroderma* and *Nannizzia* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia*, 118(No.2), 95-102.
- Kawasaki, M., Aoki, M., Ishizaki, H., Nishimura, K., & Miyaji, M. (1996). Phylogeny of *Epidermophyton floccosum* and other dermatophytes. *Mycopathologia*, 134(No.3), 121-128.
- Kawasaki, M. (2011). Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses. *Medical mycology journal*, 52(No.4), 291-295.
- Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

- Kaszubiak, A., Klein, S., De Hoog, G. S., & Gräser, Y. (2004). Population structure and evolutionary origins of *Microsporium canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(No.3), 179-186.
- Leclerc, M., Philippe, H., & Guého, E. (1994). Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32(No.5), 331-341.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (1997). Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *British Journal of Dermatology*, 137(No.3), 351-355.
- Liu, D. (Ed.). (2011). *Molecular detection of human fungal pathogens*. New York, Estados Unidos: CRC Press.
- LoBuglio, K., Pitt, J., & Taylor, J. (1993). Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia*, 592-604.
- Loo, D. (2007). Onychomycosis in the elderly. *Drugs & aging*, 24(No.4), 293-302.
- Makimura, K., Murayama, S., & Yamaguchi, H. (1994). Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology*, 40(No.5), 358-364.
- Makimura, K., Mochizuki, T., Hasegawa, A., Uchida, K., Saito, H., & Yamaguchi, H. (1998). Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of clinical microbiology*, 36(No.9), 2629-2633.

- Makimura, K., Tamura, Y., Mochizuki, T., Hasegawa, A., Tajiri, Y., Hanazawa, R., & Yamaguchi, H. (1999). Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of clinical microbiology*, 37(No.4), 920-924.
- Martin, J., Gilles, A., Lortscher, M., & Descimon, H. (2002). Phylogenetics and differentiation among the western taxa of the *Erebia tyndarus* group (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 75(No.3), 319-332.
- Martínez, E., de León, S., Pérez, E., Pacheco, A., Rivas, E., Borjas, C., & Arenas, R. (2009). *Tinea capitis*. Informe de 60 casos con parasitación pilar y/o agente causal confirmado. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 7(No.2), 98-101.
- Martínez, E., Tejada, D., Rivas, E., & Arenas, R. (2009). Onicomycosis en niños y adolescentes. Informe de 78 casos estudiados en un año en Guatemala. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 7(No.4), 243-246.
- Martínez, E., Alas, R., Escalante, K., Miller, K., & Arenas, R. (2010). Dermatofitoma Subungueal. Estudio Epidemiológico de 100 Casos. *Rev. chil. dermatol*, 26(No.1), 22-24.
- Martínez, E., Cantillo, M. F. P., Carbajal, R. A., Rivas, E., Escalante, K., Valencia, C., & Arenas, R. (2010). Dermatofitoma extraungueal. Comunicación de 15 casos. *Dermatología Rev Mex*, 54, 10-3.

- Martinez, E., Matta, V., Porras, C., Logeman, H., & Arenas, R. (2012). Dermatofitos y dermatofitosis; Frecuencia en Guatemala durante el período de mayo del 2008 a junio 2009. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 22(No.1), 19-23.
- Martínez, E., Ameen, M., Tejada, D., & Arenas, R. (2014). *Microsporum* spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(No.2), 181-186.
- Mason, D., & Marks, M. (2015). Images in Clinical Tropical Medicine Baku: *Tinea Imbricata* in the Solomon Islands. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 92(No.5), 883.
- Mendoza, N., Palacios, C., Cardona, N., & Gómez, L. (2012). Onicomycosis: afección común de difícil tratamiento. *Rev. Asoc. Colomb. Dermatol*, 20(No.2), 149-158.
- Mihali, C., Buruiana, A, Turcus, V., Covaci, A., & Ardelean, A. (2012). Morphology and ultrastructure aspects in species belongs to *Trichophyton* genus using light and scanning electron microscopy. *Annals of RSCB*, 17(No.1), 90-95.
- Mihali, C., Buruiana, A., Turcus, V., Covaci, A., & Ardelean, A. (2012). Comparative Studies of Morphology and Ultra Structure in Two Common Species of Dermatophytes: *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. *Annals of RSCB*, 17, 85-89.
- Mirhendi, H., Makimura, K., de Hoog, G., Rezaei-Matehkolaei, A., Najafzadeh, M. J., Umeda, Y., & Ahmadi, B. (2015). Translation elongation factor 1- $\alpha$  gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Medical mycology*, 53(No.3), 215-224.

- Mirzahoseini, H., Omidinia, E., Shams-Ghahfarokhi, M., Sadeghi, G., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2009). Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. *Iranian Journal of Public Health*, 38(No.1), 18-24.
- Mochizuki, T., Takada, K., Watanabe, S., Kawasaki, M., & Ishizaki, H. (1990). Taxonomy of *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*) by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 28(No.3), 191-196.
- Mochizuki, T., Sugie, N., & Uehara, M. (1997). Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses*, 40(No.11-12), 405-409.
- Montgomery, D. (2008). Diseño y análisis de experimentos. 2ª ed. México: Limusa Wiley.
- Mostert, L., Groenewald, J., Summerbell, R., Robert, V., Sutton, D., Padhye, A., & Crous, P. (2005). Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(No.4), 1752-1767.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(No.12), 3321-3323.
- Nishio, K., Kawasaki, M., & Ishizaki, H. (1992). Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia*, 117(No.3), 127-132.
- Normand, A., Packeu, A., Cassagne, C., Hendrickx, M., Ranque, S., & Piarroux, R. (2018). Nucleotide sequence database comparison for Internal Transcribed

Spacer 2 genetic region DNA barcode dermatophyte routine identification. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM-00046. *In press*.

Nyilasi, I., Kocsubé, S., Krizsán, K., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., ... & Vágvölgyi, C. (2014). Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. *Medical mycology*, 52(No.2), 140-148.

O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the Fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular phylogenetics and evolution*, 7(No.1), 103-116.

O'Donnell, K., Kistler, H, Cigelnik, E., & Ploetz, R. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(No.5), 2044-2049.

O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 919-938.

Outerbridge, C. (2006). Mycologic disorders of the skin. *Clinical techniques in small animal practice*, 21(No.3), 128-134.

Panasiti, V., Devirgiliis, V., Borroni, R., Mancini, M., Curzio, M., Rossi, M., & Calvieri, S. (2007). Epidemiology of dermatophytic infections in Rome, Italy: a retrospective study from 2002 to 2004. *Medical mycology*, 45(No.1), 57-60.

Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista peruana de biología*, 18(No.2), 265-267.

- Rebell, G., & Taplin, G. (1970). *Dermatophytes, their identification and recognition. Miami, Florida, Estados Unidos University of Miami Press.*
- Refai, M., Heidy, A., & Mahmoud, E. (2013). *Monograph on dermatophytes. Cairo. Egypt: University. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine*
- Rezaei-Matehkolaei, A., Makimura, K., Shidfar, M., Zaini, F., Eshraghian, M., Jalalizand, N., & Mirhendi, H. (2012). Use of Single-enzyme PCR-restriction Digestion Barcode Target-ing the Internal Transcribed Spacers (ITS rDNA) to Identify Dermatophyte Species. *Iranian journal of public health, 41*(No.3), 82-94.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Makimura, K., de Hoog, S., Shidfar, M., Zaini, F., Eshraghian, M., & Mirhendi, H. (2013). Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. *Medical mycology, 51*(No.2), 203-207.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H., Makimura, K., de Hoog, G., Satoh, K., Najafzadeh, M., & Shidfar, M. (2014). Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Medical mycology, 52*(7), 674-688.
- Riddell, R. (1950). Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia, 42*(No.2), 265-270.
- Roberts, D., & Evans, E. (1998). Subungual dermatophytoma complicating dermatophyte onychomycosis. *The British journal of dermatology, 138*(No.1), 189.

- Sánchez J. (2010). Tiña de la cabeza en República Dominicana. Estudio de 285 casos en encuestas epidemiológicas en diferentes zonas geográficas que incluyeron zona urbana, rural y rural marginal. *Dermatología*, 71(No.35), 1.
- Sandoval, N., Arenas, R., Giusiano, G., García, D., Chávez, L., & Zúniga, P. (2012). Diagnóstico y tratamiento de dermatofitosis y pitiriasis versicolor. *Rev Med Hondur*, 80(No.2), 66-74.
- Seebacher C., Bouchara J. (2008). Updates on Epidemiology of Dermatophytes infections. *Mycopatologia* 166, 335-352.
- Schwartz, R. (2004). Superficial fungal infections. *The Lancet*, 364, 1173-1182.
- Serra, R., & Peterson, S. (2007). *Penicillium astrolabium* and *Penicillium neocrassum*, two new species isolated from grapes and their phylogenetic placement in the *P. olsonii* and *P. brevicompactum* clade. *Mycologia*, 99(No.1), 78-87.
- Soltis, P., & Soltis, D. (2003). Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Science*, 18(No.2), 256-267.
- Squeo, R., Beer, R., Silvers, D., Weitzman, I., & Grossman, M. (1998). Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 39(No.2), 379-380.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(No.21), 2688-2690.

- Stockdale, P. (1962). *Nannizzia incurvata* gen. nov., sp. nov., a perfect state of *Microsporum gypseum* (Bodin) Guiart et Grigorakis. *Sabouraudia*, 1(No.1), 41-48.
- Summerbell, R., Haugland, R., Li, A., & Gupta, A. (1999). rRNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related to *Trichophyton rubrum*. *Journal of clinical microbiology*, 37(No.12), 4005-4011.
- Takashio, M. (1972). Sexual reproduction of some *Arthroderma* and *Nannizzia* on diluted Sabouraud agar with or without salts<sup>1</sup>). *Mycoses*, 15(No.1), 11-17.
- Takashio, M. (1977). The *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Recent advances in medical and veterinary mycology*, 271-276.
- Torres-Guerrero, E., Martínez-Herrera, E., Arroyo-Camarena, S., Porras, C., & Arenas, R. (2015). Kerion Celsi: A report of two cases due to *Microsporum gypseum* and *Trichophyton tonsurans*. *Our Dermatology Online/Nasza Dermatologia Online*, 6(4).
- Uijthof, J., van Belkum, A., De Hoog, G., & Haase, G. (1998). *Exophiala dermatitidis* and *Sarcinomyces phaeomuriformis*: ITS1-sequencing and nutritional physiology. *Medical mycology*, 36(No.3), 143-151.
- Vena, G., Chieco, P., Posa, F., Garofalo, A., Bosco, A., & Cassano, N. (2012). Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences*, 35(No.2), 207.

- Wedde, M., Müller, D., Tintelnot, K., De Hoog, G., & Stahl, U. (1998). PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. *Medical mycology*, 36(No.2), 61-67.
- Weitzman, I., & Summerbell, R. (1995). The dermatophytes. *Clinical microbiology reviews*, 8(No.2), 240-259.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(No.1), 315-322.
- Williams, R., Ward, E., & McCartney, H. (2001). Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Applied and environmental microbiology*, 67(No.6), 2453-2459.
- Zhan, P., & Liu, W. (2017). The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia*, 182(No.1-2), 77-86.
- Ziółkowska, G., Nowakiewicz, A., Gnat, S., Trościańczyk, A., Zięba, P., & Majer Dziedzic, B. (2015). Molecular identification and classification of Trichophyton mentagrophytes complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses*, 58(No.3), 119-126.

## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Clasificación taxonómica de los dermatofitos

	Fase teleomórfica	Fase anamórfica
<b>Phylum</b>	<i>Ascomycota</i>	
<b>Clase</b>	<i>Euascmycetes</i>	<i>Hyphomycetidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Onygenales</i>	<i>Hyphomycetes</i>
<b>Familia</b>	<i>Arthrodermataceae</i>	<i>Hyphomycetaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Arthroderma</i>	<i>Trichophyton</i>
<b>Género</b>	<i>Arthroderma</i>	<i>Microsporum</i>
<b>Género</b>	No reportado	<i>Epidermophyton</i>

Adaptado de: Bonifaz, A. (2012). Micología Médica Básica. Tercera edición. McGraw Hill, México DF. Cortesía de: García-Vargas A, Guadalajara, México.

## Anexo 2. Caracterización macroscópica y molecular de los ejemplares analizados

### Cepa G2 *N. gypsea*

#### A. Secuencia obtenida

CGGTGTCGCCGGCCACACGCCCATCTTGTCTATTTACCCAGTTGCCTCGGCGGGCCGCG 60

CACTCGTGCCGCGCCTCGAGGAGCCGTCCGGGGACAATCAACTCCCTGGATCGCGCCCGC 120

CGGAGGAGTGATTAATCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAG 180

TTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 240

GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC 300

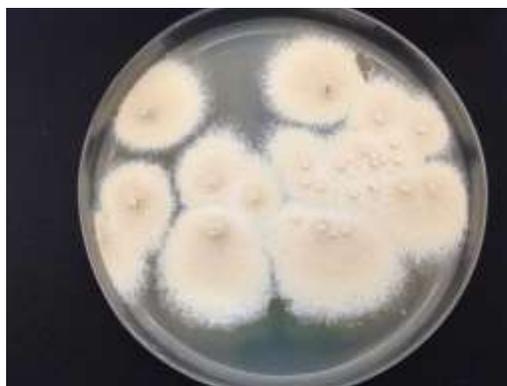
CCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCT 360

TGTGTGATGGACGACCGTCCCGCCCTCCCTACTCCAGGGGAGGGGACGCGCCCGAAAAG 420

CAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAACGCCTCTAGG 480

ACCGGCCGTTTTCTGGCCTAGTTTTAGTTAGGGATGAACTTCCCTATCTAACTC 535

#### B. Cultivo



Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G3 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

AAGGCGCGCCGCGGACGCCATGTCCGCGAGCTGTGCCGCGGCCACACGCCCATTCCTTGT 60

CTACCCACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCGCCCGCCAGAGGAGTGATTAGAACCCATG 120

AATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTGAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCT 180

CTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA 240

TTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATG 300

CCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCG 360

TCCTCCCTGATCTCCAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCC 420

GGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAACGCCTCTAGGACCGGCCGGCTCTCTGGCCTA 480

GTTTCCGTTAGGGATTAGTTTCTCTACATCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC 540

CGCTGAACTTAAGCATATC 559

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G4 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

GGACGCCATGTCCGCGAGCTGTGCCGCCGCCACACGCCATTCTTGTCTACCCACCCGG 60

TTGCCTCGGCGGGCCGCGCCCCGCCAGAGGAGTGATTAGAACCCATGAATACTGTTCCG 120

TCTGAGCGTTAGCAAGTGAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGC 180

ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCA 240

TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTTGAGCG 300

TCATTTCAACCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCGTCCTCCCTGATC 360

TCCAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCG 420

AATGGGCAACAACCAACGCCTCTAGGACCGCCGGCTCTCTGGCCTAGTTTCCGTTAGG 480

GATTAGTTTCTCTACATCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA 540

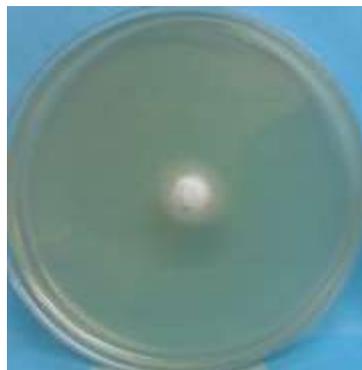
GCATAT 546

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G7 *T. interdigitale*****A. Secuencia Obtenida**

CAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACA 60  
TTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTT 120  
TAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAA 180  
GAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTC 240  
TTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT 300  
TCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGC 360  
CTGTTTCGAGCGTCATTTTCAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCG 420  
CCCCCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGC 480  
TTCCTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAA 539

**B. Colonia obtenida**

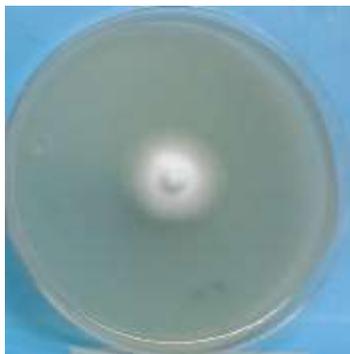
Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

## Cepa G8 *T. interdigitale*

### A. Secuencia obtenida

GATCATTAGCGCGCAGGCCGGAGGCTGGCCCCCACGATAGGGCAAACGTCCGTCAGGG 60  
GTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTACTCGGTTGCCTCG 120  
GCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTGCGCGAGCCTCTCTTTAGTGGCTAAACGCTG 180  
GACCGCGCCCCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAG 240  
CGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA 300  
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAA 360  
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATT 420  
TCAGCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCCGTCTTTGGGGG 480  
TGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCTAGGCGAATGGG 540  
CAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAATCTGTTTTATACTTATC 600  
AGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA 635

### B. Cultivo



Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G9 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

CACGATAGGGCCAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCAT 60

TCTTGTCTACACTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTCCGGC 120

GAGCCTCTCTTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAA 180

TTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAA 240

CAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG 300

AATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCC 360

GGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACG 420

ACCGTCCGGCGCCCCCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCC 480

GCGATTCCGGCTTCCTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCT 540

GGCCTCAAATC 552

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G10 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

GCAGGCCGTTGAAGGCGCGCCGCGGACCCCAGGTCCGCCGTGCAGTGCCGCCGGCCACAC 60  
GCCATTCTTGTCTACTTACCCAGTTGCCTCGGCGGGCCTCGCGCCCGCCAGAGGAGTGA 120  
TTAAAATCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTC 180  
AACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG 240  
TGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATT 300  
CCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGATGGA 360  
CGACCGTCCCCGCCCTCCCCGGCTCCCGGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCASTGGCCA 420  
GGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCTAGGACCGGCCGG 480  
CTCTCTGGCCTAGTTTCCGTCAGAGATGTATTTCTC 516

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G11 *N. gypsea*****A. Secuencia obtenida**

CGGTGTCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTATTTACCCAGTTGCCTCGGCGGGCCGCG 60

CACTCGTGCCGCGCCTCGAGGAGCCGTCCGGGGACAATCAACTCCCTGGATCGCGCCCGC 120

CGGAGGAGTGATTAATAATCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAG 180

TTAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 240

GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC 300

CCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCT 360

TGTGTGATGGACGACCGTCCC GCCCTCCCTACTCCAGGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAG 420

CAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAACGCCTCTAGG 480

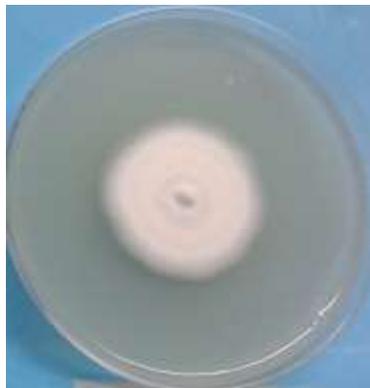
ACCGGCCGGTTTTCTGGCCTAGTTTTAGTTAGGGATGAACTT 522

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G12 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

TGAAGGCGCGCCGCGGACGCCATGTCCGCGAGCTGTGCCGCGGCCACACGCCATTCTT 60  
GTCTACCCACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCGCCCGCCAGAGGAGTGATTAGAACCCA 120  
TGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTGAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGAT 180  
CTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 240  
AATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCA 300  
TGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCC 360  
CGTCCTCCCTGATCTCCAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATT 420  
CCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAACGCCTCTAGGACCGGCCGGCTCTCTGGCC 480  
TAGTTTCCGTTAGGGATTAGTTTCTCTACATCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA 540  
CCCGCTGAAC 550

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G13 *N. gypsea*****A. Secuencia obtenida**

CGGATGCGTCCGGGGGCGGTGTCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTATTTACCCAGTT 60

GCCTCGGCGGGCCGCGCACTCGTGCCGCGCCTCGAGGAGCCGTCCGGGGACAATCAACTC 120

CCTGGATCGCGCCCCCGGAGGAGTGATTAATCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGT 180

TAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAA 240

GAACGCASCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCARAATCCGTGAATCATCGAATCTT 300

TGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAA 360

CCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCGCCCTCCCTACTCCAGGGGAGGG 420

GGACGCGCCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACA 480

AACCAACGCCTCTAGGACCGGCCGGTTTTCTGGCCTAGTTTTAGTTAGGGATGAACTTCC 540

CT 542

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

## Cepa G15 *N. gypsea*

### A. Secuencia obtenida

CCGGATGGCGTCCGGGGGGCGGTGTCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTATTTACCCA 60

GTTGCCTCGGCGGGCCGCGCACTCGTGCCGCGCCTCGAGGAGCCGTCCGGGGACAATCAA 120

CTCCCTGGATCGCGCCCCGCCGGAGGAGTGATTAATCCATGAATACTGTTCCGTCTGAG 180

CGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGAT 240

GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAAT 300

CTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTT 360

CAACCCCTCAAGCCCGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCGCCCTCCCTACTCCAGGGGA 420

GGGGGACGCGCCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCA 480

ACAAACCAACGCCTCTAGGACCGGCCGGTTTTCTGGCCTAGTTTTAGTTAGGGATGAACT 540

TCCCTA 546

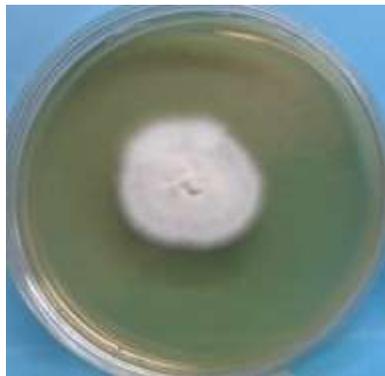
### B. Cultivo



Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G16 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

GGCAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCT 60  
ACATTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCT 120  
CTTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCA 180  
GAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGAT 240  
CTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 300  
AATTCGTAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCA 360  
TGCCTGTTGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCG 420  
GCGCCCCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCC 480  
GGCTTCCTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAA 540  
AATCTGTTTTATACTTATC 559

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G17 *N. gypsea*****A. Secuencia obtenida**

TGCGTCCGGGGCGGTGTCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTATTTACCCAGTTGCCT 60

CGGCGGGCCGCGCACTCGTGCCGCGCCTCGAGGAGCCGTCCGGGGACAATCAACTCCCTG 120

GATCGCGCCCGCCGGAGGAGTGATTA AAAATCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGC 180

AAGTAAAATCAGTTAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC 240

GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA 300

CGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCC 360

TCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCGCCCTCCCTACTCCAGGGGAGGGGGAC 420

GCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACC 480

AACGCCTCTAGGACCGGCCGGTTTTCTGGCCTAGTTTTAGTTAGGGATGAACTTCCCTAC 540

AA 542

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25 °C, 8 días

**Cepa G18 *T. mentagrophytes*****A. Secuencia obtenida**

GTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACACTCGGTTGCCTCG 60

GCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTCCGCGAGCCTCTCTTTAGTGGCTAAACGCTG 120

GACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAG 180

CGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA 240

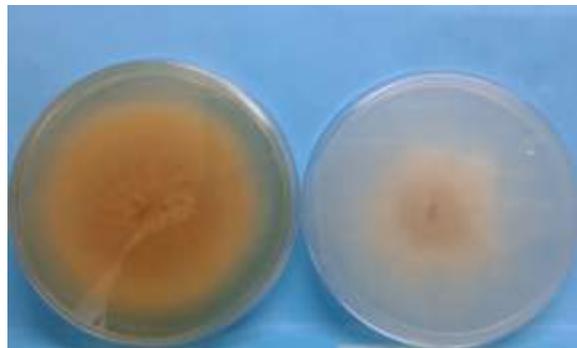
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAA 300

TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATT 360

TCAGCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCCGTCTTTGGGGG 420

TGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCTAGGCGAATGGG 480

CAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAATCTGTTTTATAC 535

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G19 *M. nannum*****A. Secuencia obtenida**

GCCCGCCGGAGGAACGATCAAAACACGCGAACACCGTCCAGTCTGAGCGTAAAGCGAAGT 60  
GAAAAAATCAGTCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACG 120  
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC 180  
GCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCT 240  
CAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCTCTCCCCGCTCCCGGGGAGAGGCGG 300  
GACGCGCCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGCTTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAA 360  
ACCAGCGCCCCTAGGACCGGCCGGCCCTTCTGGCCCAGTTTCCAGTCAAGGACTTACGGC 420  
GCCTTGCGAC 430

**B. Cultivo**

Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G22 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

ACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTA 60

CTCGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTTTAG 120

TGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTTCAGAAGAG 180

CTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG 240

GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCC 300

GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTG 360

TTCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCC 420

CCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTC 480

CTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAATCTG 540

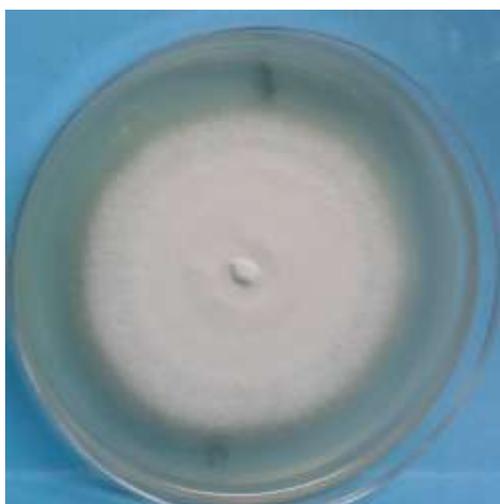
TTTTATACTTATCAGGTTGACCTCGGATCAG 571

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G24 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

CGGACGCCATGTCCGCGAGCTGTGCCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTACCCACCCG 60  
GTTGCCTCGGCGGGCCGCGCGCCCGCCAGAGGAGTGATTAGAACCCATGAATACTGTTCC 120  
GTCTGAGCGTTAGCAAGTGAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG 180  
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATC 240  
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGC 300  
GTCATTTCAACCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCGTCCTCCCTGAT 360  
CTCCAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGC 420  
GAATGGGCAACAAACCAACGCCTCTAGGACCGGCCGGCTCTCTGGCCTAGTTTCCGTTAG 480

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G25 *T. interditale*****A. Secuencia obtenida**

CCCGCCGGAGGACAGACACCAAGAAAAANTTTTCTGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTTA 60

GCAAGCACAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA 120

ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTG 180

AACGCACATTGCGCCCTCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACC 240

CCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCCTCCCTTCGGGGGCGGGACGC 300

GCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAGGCGAATGGGCAGCCAATTC 360

AGCGCCCTCAGGACCGGCCGCCCTGGCCCCAATCTTTATATATATATATA 410

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G26 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

TTGAAGGCGCGCCGCGGACGCCATGTCCGCGAGCTGTGCCGCCGGCCACACGCCCATTTCT 60  
TGTCTACCCACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCGCCCGCCAGAGGAGTGATTAGAACCC 120  
ATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTGAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGA 180  
TCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA 240  
GAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGC 300  
ATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCC 360  
CCGTCCTCCCTGATCTCCAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGAT 420  
TCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAACGCCTCTAGGACCGGCCGGCTCTACTGG 480  
CCTAGTTTCCGTTAGGGATTAGTTTCTCTACATCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA 540  
TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA 565

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G28 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

GATCATTAAACGCGCAGGCCGTTGAAGGCGCGCCGCGGACGCCATGTCCGCGAGCTGTGCC 60

GCCGGCCACACGCCCATTTCTTGTCTACCCACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCGCCCGC 120

CAGAGGAGTGATTAGAACCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTGAAATCAG 180

TTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 240

GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC 300

CCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCGCGGCT 360

TGTGTGATGGACGACCGTCCCCGTCTCCCTGATCTCCAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAA 420

AGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGCAACAACCAACGCCTCTA 480

GGACCGGCCGGCTCTCTGGCCTAGTTTCCGTTAGGGATTAGTTTCTCTACATCTAGGTTG 540

ACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT 584

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G29 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

CGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTA CTGG 60

TTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCAGGAGAGCCGTTGCGGAGCCTCTCTTTAGTGGCT 120

AAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTC 180

AGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGTTCC 240

GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAA 300

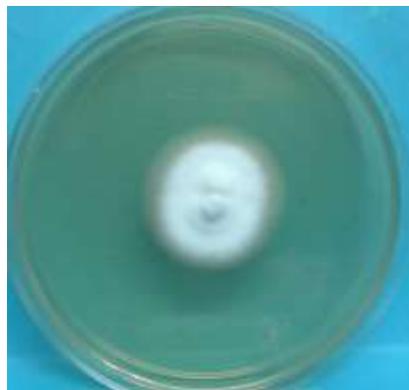
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGCATGCCTGTTCGA 360

GCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCCGTC 420

TTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAGG 480

CGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCCCCTGGCCTCAAAATCTGTTTTA 540

TACTTATCAGGTTGACCTCGGA 562

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G30 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

ACGATAGGGCCAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATT 60  
CTTGTCTACATTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCAGGAGAGCCGTTTCGGCG 120  
AGCCTCTCTTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAAT 180  
TCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAAC 240  
AACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA 300  
ATTGCAGAATTCGCGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCG 360  
GGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGA 420  
CCGTCCGGCGCCCCCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCG 480  
CGATTCCGGCTTCTAGGCGAATGGGCAACAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTG 540  
GCCTCAAAATCTGTTTTATACTTATCAGGTTGACCTCGGATCA 583

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G31 *N. gypsea*****A. Secuencia obtenida**

GCGGTGTCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTATTTACCCAGTTGCCTCGGCGGGCCGC 60

GCACTCGTGCCGCGCCTCGAGGAGCCGTCCGGGGACAATCAACTCCCTGGATCGCGCCCG 120

CCGGAGGAGTGATTAATAATCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCA 180

GTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG 240

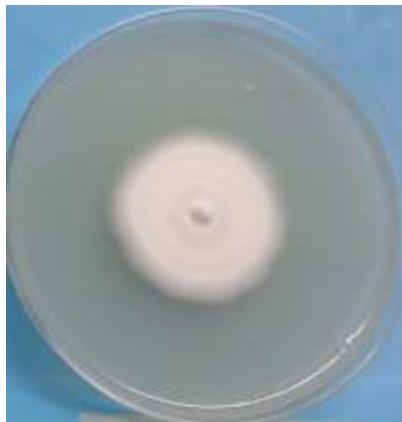
CGATAAGTAATGTGAATTGCARAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG 300

CCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGC 360

TTGTGTGATGGACGACCGTCCCGCCCTCCCTACTCCAGGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAA 420

GCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAACGCCTCTAG 480

GACCGGCCGGTTTTCTGGCCTAGT 504

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G33 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

CGGACCCCAGGTCCGCCGTGCAGTGCCGCCGCCACACGCCCATTCCTTGTYTACTTACC 60

CAGTTGCCTCGGCGGGCCTCGCGCCCGCCAGAGGAGTGATTAATCCATGAATACTGTT 120

CCGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCC 180

GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAA 240

TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGA 300

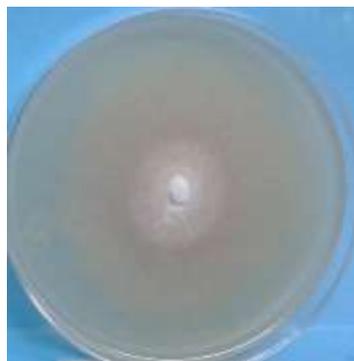
GCGTCATTTCAACCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCGCCCTCCCCG 360

GCTCCCGGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGG 420

GCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCTAGGACCGGCCGGCTCTCTGGCCTAGTTTCCGTC 480

AGAGATGTATTTCTCTGCAATTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC 540

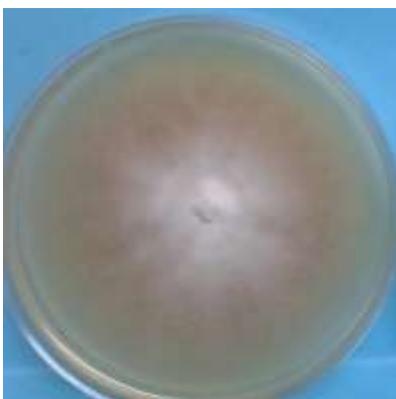
T 541

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G36 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

ACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTA 60  
CTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTTTAG 120  
TGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAG 180  
CTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTG 240  
GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCC 300  
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTG 360  
TTCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCC 420  
CCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCCAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTC 480  
CTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAATCT 539

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G40 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

GAGCAGAATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATACTCGGTTGCCTCGG 60

CGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTGCGGAGCCTCTCTTTAGTGGCTAAACGCTGG 120

ACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAGC 180

GTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGAT 240

GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAAT 300

CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATT 360

CAGCCCCTCAAGCCCGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCCGTCTTTGGGGT 420

GCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAGGCGAATGGGC 480

AACAAACCAGCGCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAATCTGTTTTATACTTATCA 540

GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG 563

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G41 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

ACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTA 60

CTCGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTTTAG 120

TGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTTCAGAAGAG 180

CTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG 240

GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCC 300

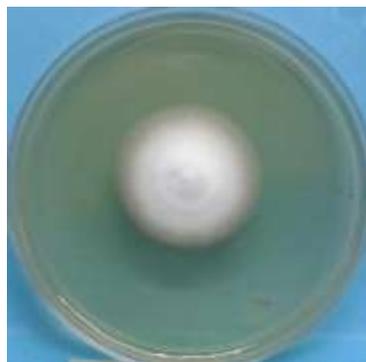
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGCATGCCTG 360

TTCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCC 420

CCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCNGGCCGCGATTCCGGCTTT 480

CTAGGCGAATGGGCAAACAAAACCAAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTTCAAAA 540

TCTGT 545

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G42 *T. mentagrophytes*****A. Secuencia obtenida**

CATTACTCGGTTGCCTCGGCCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTCCGGCGAGCCTCTC 60

TTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAG 120

AAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATC 180

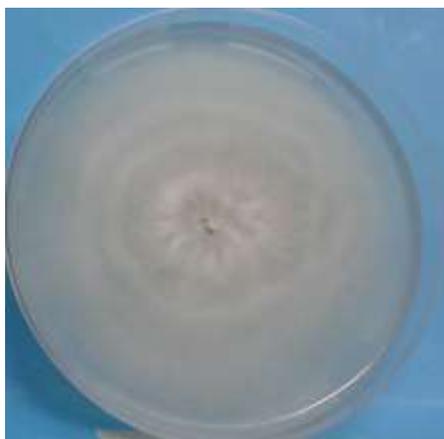
TCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA 240

ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCAT 300

GCCTGTTGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGG 360

CGCCCCCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCG 420

GCTTCCTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGC 452

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G43 *T. mentagrophytes*****A. Secuencia obtenida**

TCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTACTC 60  
GGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTTTAGTGG 120  
CTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTG 180  
TCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT 240  
CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTG 300  
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTC 360  
GAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCCG 420  
TCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTA 480  
GGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAATCTGT 538

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G47 *Nannizzia incurvata*****A. Secuencia obtenida**

CATGTCCGCGAGCTGTGCCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTACCCACCCGGTTGCCT 60

CGGCGGGCCGCGCGCCCGCCAGAGGAGTGATTAGAACCCATGAATACTGTTCCGTCTGAG 120

CGTTAGCAAGTGAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGAT 180

GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAAT 240

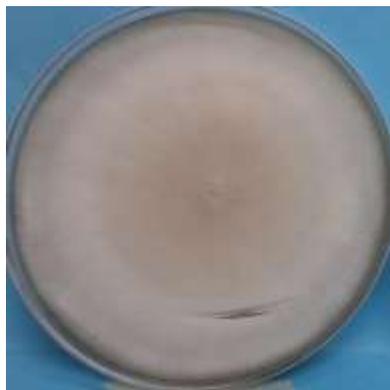
CTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT 300

CAACCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCGTCTCCCTGATCTCCAGG 360

GAGGGGGACGCGCCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGG 420

CAACAAACCAACGCCTCTAGGACCGGCCGGCTCTCTGGCCTAGTTTCCGTTAGGGATTAG 480

TTTCTCTACAT 491

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

## Cepa G49 *Nannizzia incurvata*

### A. Secuencia obtenida

GTCCGCGAGCTGTGCCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTACCCACCCGGTTGCCTCGG 60

CGGGCCGCGCGCCCGCCAGAGGAGTGATTAGAACCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGT 120

TAGCAAGTGAAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAA 180

GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTT 240

TGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAA 300

CCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCGTCTCCCTGATCTCCAGGGAG 360

GGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAA 420

CAAACCAACGCCTCTAGGACCGGCCGGCTCTCTGGCCTAGTTTCCGTTAGGGATTAGTTT 480

CTCTAC 486

### B. Cultivo



Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G51 *T. mentagrophytes*****A. Secuencia obtenida**

ACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTA 60  
CTCGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCAGGAGAGCCGTTCCGGCGAGCCTCTCTTTAG 120  
TGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAG 180  
CTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG 240  
GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCC 300  
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTG 360  
TTCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCC 420  
CCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTC 480  
CTAGGCGAATGGGCAACAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAATCTG 540  
TTTTATACTTATCAGG 556

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G57 *T. mentagrophytes*****A. Secuencia obtenida**

CGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTAC 60

TCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTCCGGCGAGCCTCTCTTTAGT 120

GGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGC 180

TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG 240

TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCG 300

TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGT 360

TCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCC 420

CGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCC 480

TAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAATCTGT 540

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G58 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

GCCAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTA 60

CATTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTC 120

TTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAG 180

AAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATC 240

TCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA 300

ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCAT 360

GCCTGTTGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGG 420

CGCCCCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCG 480

GCTTCCTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAA 540

ATCTGTTTTATACTTATCAGGTTGACCTCGGATCA 575

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G59 *T. mentagrophytes*****A. Secuencia obtenida**

CGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGC 60

GCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAG 120

CAAGCAAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA 180

ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTG 240

AACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTTCAGCC 300

CCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCCGTCTTTGGGGGTGCGGG 360

ACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAGGCGAATGGGCAACAA 420

ACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAATCTGT 462

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G62 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

GTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTACTCGGT 60

TGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCAGGAGAGCCGTTGCGCGAGCCTCTCTTTAGTGGCTA 120

AACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTCA 180

GTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCG 240

GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAAT 300

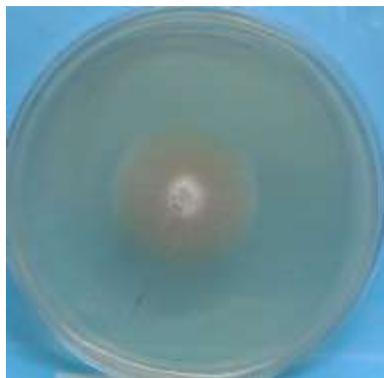
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAG 360

CGTCATTTAGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCGTCT 420

TTGGGGGTGCGGGACGCGCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAGGC 480

GAATGGGCAACAAACCAGCGCTCCAGGACCGCCGCCCTGGCCTCAAATCTGTTTTAT 540

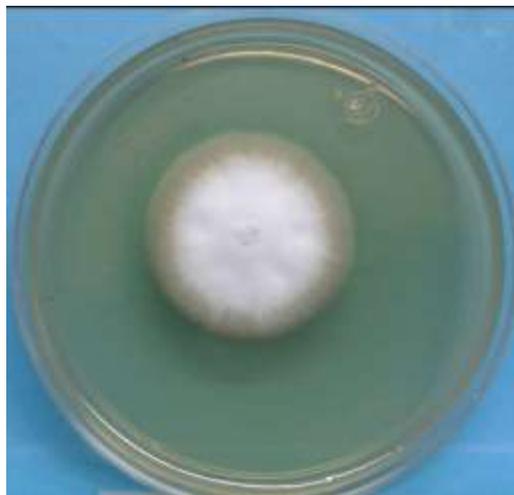
ACTTATCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT 594

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G63 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

CGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTAC 60  
TCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTCCGGCGAGCCTCTCTTTAGT 120  
GGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGC 180  
TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG 240  
TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCG 300  
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGT 360  
TCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCC 420  
CGTCTTTGGGGGTGCGG 437

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G64 *M. canis*****A. Secuencia obtenida**

GCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTGTCT 60

ACTGACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGGGGGGA 120

CGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGATTA 180

CTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGTTAA 240

AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 300

AGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCC 360

TGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTG 420

TGATGGACGACCGTCCCCCTCCCCAGTAACCACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAG 480

GGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGACA 540

TACCACCGCCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCTAACGCA 582

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G65 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

AAGGATCATTAAACGCGCAGGCCGTTGAAGGCGCGCCGCGGACGCCATGTCCGCGAGCTGT 60

GCCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTACCCACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCGCC 120

CGCCAGAGGAGTGATTAGAACCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTGAAAT 180

CAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 240

TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG 300

CGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCGCG 360

GCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCGTCTCCCTGATCTCCAGGGAGGGGGACGCGCCCG 420

AAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAACGCCT 480

CTAGGACCGCCGGCTCTCTGGCCTAGTTTCCGTTAGGGATTAGTTTCTCTACATCTAGG 540

TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC 585

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G68 *N. incurvata*****A. Secuencia obtenida**

GCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCGTTGAAGGCGCGCCGCGGACGCCATGTCCGCGAG 60

CTGTGCCCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTACCCACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCG 120

CGCCCGCCAGAGGAGTGATTAGAACCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTG 180

AAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGCGCATCGATGAAGAACGCAGC 240

GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC 300

ATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAG 360

CGCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCCGTCTCCCTGATCTCCAGGGAGGGGGACGCG 420

CCCAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAAC 480

GCCTCTAGGACCGCCGGCTCTCTGGCCTAGTTTCCGTTAGGGATTAGTTTCTCTACATC 540

TAGGTTGACCTCGGATCA 558

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa G71 *N. gypsea*****A. Secuencia obtenida**

GAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCGTAGACGGCCCGTCCCCGGATGCGTCCGGGGGCGGTG 60

TCGCCGGCCACACGCCATTCTTGTCTATTTACCCAGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCACTC 120

GTGCCGCGCCTCGAGGAGCCGTCCGGGGACAATCAACTCCCTGGATCGCGCCCCGCCGAG 180

GAGTGATTAATAATCCATGAATACTGTTCCGTCTGAGCGTTAGCAAGTAAATCAGTTAAA 240

ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA 300

GTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCT 360

GGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGT 420

GATGGACGACCGTCCCGCCCTCCCTACTCCAGGGGAGGGGGACGCGCCCCGAAAAGCAGTG 480

GCCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGCAACAAACCAACGCCTCTAGGACCGG 540

CCGGTTTTCTGGCCTAGTTTTAGTTAGGGATG 572

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

## Cepa G73 *T. interdigitale*

### A. Secuencia obtenida

GGCCAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCT 60

ACATTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCT 120

CTTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCA 180

GAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGAT 240

CTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 300

AATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCA 360

TGCCTGTTTCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCG 420

GCGCCCCCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCC 480

GGCTTCCTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAA 540

AATCTG 546

### B. Cultivo



Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D1 *T. rubrum*****A. Secuencia obtenida**

GCCTCGGCGGGCCGCGCTCCCCCTGCCAGGGAGAGCCGTCCGGCGGGCCCCCTTCTGGGAG 60

CCTCGAGCCGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACACCAAGAAAAAATTCTCTGAAGAGCT 120

GTCAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT 180

TCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGT 240

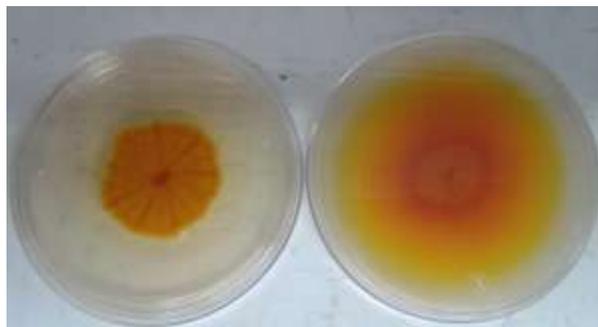
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTT 300

CGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCCCTCC 360

CTTCGGGGGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAGGC 420

GAATGGGCAGCCAATTCAGCGCCCTCAGGACCGGCCGCCCTGGCCCCAATCTTTATATAT 480

ATATATA 487

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D2 *M. canis*****A. Secuencia obtenida**

CGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCAGGGGTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTG 60  
TCTACTGACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGGGG 120  
GGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGA 180  
TTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGT 240  
TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG 300  
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC 360  
CCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTT 420  
GTGTGATGGACGACCGTCCC 440

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D3 *M. canis*****A. Secuencia obtenida**

CGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTG 60  
TCTACTGACCCGGTTGCCTCGGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGGGG 120  
GGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGA 180  
TTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGT 240  
TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG 300  
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC 360  
CCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTT 420  
GTGTGATGGACGACCGTCCCCCTCCCCAGTAACCACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAG 479

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D4 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

CGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTAC 60

TCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTTTAGT 120

GGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGC 180

TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAATATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG 240

TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCG 300

TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGT 360

TCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCC 420

CGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCC 480

TAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAATCTGT 540

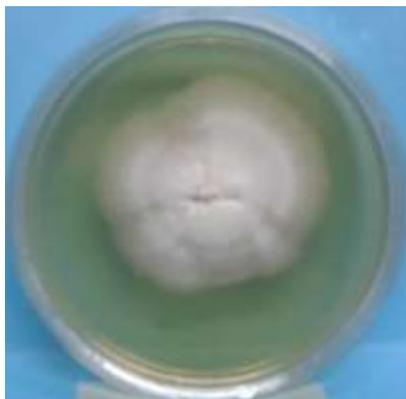
TTTATACTTATCAGGTTGACC 561

**B. Cultivo**

Cultivo PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D5 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

CGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACATTAC 60  
TCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTGCGCGAGCCTCTCTTTAGT 120  
GGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGC 180  
TGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG 240  
TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCG 300  
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTG 360  
TTCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCC 420  
CCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTC 480  
CTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAATCTG 540

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D6 *T. mentagrophytes*****A. Secuencia obtenida**

GAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACA 60

GACGCAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGT 120

TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG 180

ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC 240

CCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTAGCCCTCAAGCCCGGCTT 300

GTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCGCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGC 360

AGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGG 420

ACCGGCCGCCCTGGCCTCAAATC 444

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D10 *T. rubrum*****A. Secuencia obtenida**

CGACGTTCCATCAGGGGTGAGCAGACGTGCGCCGGCCGTACGCCCCATTCTTGCTACC 60

TCACCCGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCCCCCTGCCAGGGAGAGCCGTCCGGCGGGCCC 120

CTTCTGGGAGCCTCGAGCCGGACCGCGCCCGCGGAGGACAGACACCAAGAAAAATTCT 180

CTGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAAATCAGTAAAACTTTCAACAACGG 240

ATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC 300

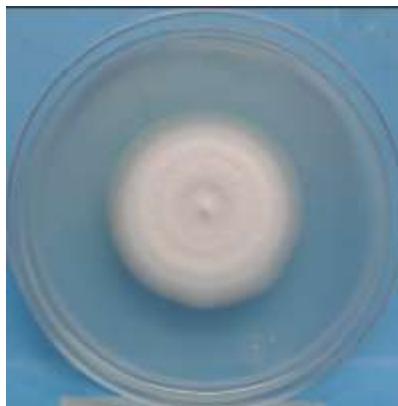
AGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGCATTCCGGGGGG 360

CATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTC 420

CGGCCCCCTCCCTTCGGGGGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGG 480

CTTCCTAGGCGAATGGGCAGCCAATTCAGCGCCCTCAGGACCGGCCGCCCTGGCCCCAAT 540

CTTTATATATAT 552

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D11 *T. rubrum*****A. Secuencia obtenida**

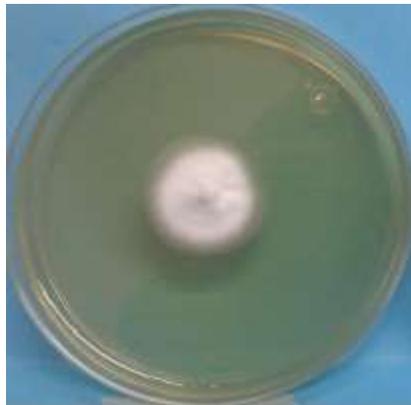
GTTCCATCAGGGGTGAGCAGACGTGCGCCGGCCGTACGCCCCATTCTTGTCTACCTCAC 60  
CCGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCCCCCTGCCAGGGAGAGCCGTCCGGCGGGCCCTTC 120  
TGGGAGCCTCGAGCCGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACACCAAGAAAAAATTCTCTGA 180  
AGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCT 240  
CTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA 300  
TTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGCATTCCGGGGGGCATG 360  
CCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGC 420  
CCCTCCCTTCGGGGGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTC 480  
CTAGGCGAATGGGCAGCCAATTCAGCGCCCTCAGGACCGGCCGCCCTGGCCCCAATCTTT 540  
ATATAT 546

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D12 *T. rubrum*****A. Secuencia obtenida**

CGACGTTCCATCAGGGGTGAGCAGACGTGCGCCGGCCGTACGCCCCATTCTTGTCTACC 60  
TCACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCCCCCTGCCAGGGAGAGCCGTCCGGCGGGCCC 120  
CTTCTGGGAGCCTCGAGCCGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACACCAAGAAAAAATTCT 180  
CTGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGG 240  
ATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC 300  
AGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGCATTCCGGGGGG 360  
CATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTC 420  
CGGCCCTCCCTTCGGGGGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGCCAGGCCGCGATTCCGG 480  
CTTCCTAGGCGAATGGGCAGCCAATTCAGCGCCCTCAGGACCGGCCGCCCTGGCCCAAT 540  
CTTTATATATATATAT 556

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D13 *T. rubrum*****A. Secuencia obtenida**

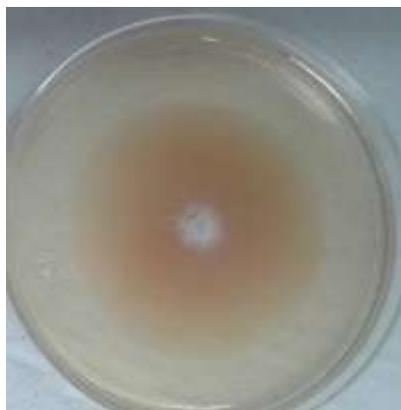
GACGTTCCATCAGGGGTGAGCAGACGTGCGCCGGCCGTACGCCCCATTCTTGTCTACCT 60  
CACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCCCCCTGCCAGGGAGAGCCGTCCGGCGGGCCCC 120  
TTCTGGGAGCCTCGAGCCGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACACCAAGAAAAAATTCTC 180  
TGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGA 240  
TCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA 300  
GAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGCATTCCGGGGGGC 360  
ATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCC 420  
GGCCCTCCCTTCGGGGGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGCCAGGCCGCGATTCCGGC 480  
TTCCTAGGCGAATGGGCAGCCAATTCAGCGCCCTCAGGACCGGCCGCCCTGGCCCCAATC 540  
TTTATATATATATATA 556

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D14 *M. audouinii*****A. Secuencia obtenida**

CGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTG 60  
TCTACTGACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGGGG 120  
GGACGCCTGAGGGGGACTTTTGTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGA 180  
TTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGT 240  
TAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG 300  
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC 360  
CCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTT 420  
GTGTGATGGACGACCGTCCCCCAATAACCACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGG 480  
GGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCCTGGGCGAATGGGACAT 540  
ACCACCGCCTCTAGGACCGCCGGTAGGCTGGCCTAACGCACCATGTA 588

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D15 *T. equinum*****A. Secuencia obtenida**

TGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACCTTACTCGGTTGCCTCGG 60

CGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTTTATAGCGGCTCAACGCT 120

GGACCGCGCCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCT 180

GAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCAT 240

CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATC 300

GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC 360

ATTCAGCCCCCTCAAGCCCGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCCGTCTCTGG 420

GGGTGCGGGACGCGCCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTTCTAGGCGAAT 480

GGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAATCT 529

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D17 *T. rubrum*****A. Secuencia obtenida**

ATCAGGGGTGAGCAGACGTGCGCCGGCCGTACGCCCCATTCTTGTCTACCTCACCCGGT 60  
TGCCTCGGCGGGCCGCGCTCCCCCTGCCAGGGAGAGCCGTCCGGCGGGCCCTTCTGGGA 120  
GCCTCGAGCCGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACACCAAGAAAAATTCTCTGAAGAGC 180  
TGTCAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAAATCAGTAAAACTTCAACAACGGATCTCTTGG 240  
TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCG 300  
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGT 360  
TCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCTC 420  
CCTTCGGGGGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCTAGG 480  
CGAATGGGCAGCCAATTCAGCGCCCTCAGGACCGCCGCCCTGGCCCAATCTTTATATA 540

T 541

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D18 *T. equinum*****A. Secuencia obtenida**

GTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACCTTACTCGGTTGCCTCG 60  
GCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTGCGCGAGCCTCTCTTTATAGCGGCTCAACGC 120  
TGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTC 180  
TGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCA 240  
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCAT 300  
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGT 360  
CATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCCGTCTCTG 420  
GGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTTCTAGGCGAA 480  
TGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAATCTGT 532

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D19 *T. equinum*****A. Secuencia obtenida**

AAACGTCGGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATTCTTGCTACCT 60  
TACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTTCGGCGAGCCTCTCTTT 120  
ATAGCGGCTCAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAAAAATTCTTTCA 180  
GAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGAT 240  
CTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG 300  
AATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCA 360  
TGCCTGTTGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCG 420  
GCGCCCCGTCTCTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCC 480  
GGCTTTCTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCCCTGGCCTCAA 540  
AATCTGT 547

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D23 *T. rubrum*****A. Secuencia obtenida**

CGACGTTCCATCAGGGGTGAGCAGACGTGCGCCGGCCGTACGCCCCATTCTTGTCTACC 60  
TCACCCGGTTGCCTCGGCGGGCGCGCTCCCCCTGCCAGGGAGAGCCGTCCGGCGGGCCC 120  
CTTCTGGGAGCCTCGAGCCGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACACCAAGAAAAAATTCT 180  
CTGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAAATCAGTTAAACTTTCAACAACGG 240  
ATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC 300  
AGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGCATTCCGGGGGG 360  
CATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTC 420  
CGGCCCCCTCCCTTCGGGGGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGG 480  
CTTCCTAGGCGAATGGGCAGCCAATTCAGCGCCCTCAGGACCGGCCGCCCTGGCCCCAAT 540  
CTTATATATATATATAT 558

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D26 *M. ferrugineum*****A. Secuencia obtenida**

CGGGCCTCCCGGGGTAGGTTGCGGGCGGCGAGGGGTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTT 60  
GTCTACTGACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTTCGGGG 120  
GGGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGG 180  
ATTACTCTGGAAAACACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAG 240  
TTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 300  
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC 360  
CCCCTGGCATT 372

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D28 *T. interdigitale*****A. Secuencia obtenida**

CCACGATAGGGCCAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCA 60  
TTCTTGTCTACATTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCAGGAGAGCCGTTCCGG 120  
CGAGCCTCTCTTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAA 180  
ATTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAACTTTCA 240  
ACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT 300  
GAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTTC 360  
CGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTAGCCCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGAC 420  
GACCGTCCGGCGCCCCCGTCTTTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGC 480  
CGCGATTCCGGCTTCTTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAGGACCGGCCGCC 540  
TGGCCTTCAAATCTGTTTTATACTTATCAGGTTGACCTCGG 582

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días

**Cepa D30 *M. canis*****A. Secuencia obtenida**

CGGGCCTCCCGGGGAGGTTGCGGGCGGCAGGGGTGCCTCCGGCCGCACGCCATTCTTG 60

TCTACTGACCCGGTTGCCTCGGGCGGGCCGCGCCTGCTGTGCTACAGCGGCCGTTCCGGGGG 120

GGACGCCTGAGGGGGACTCTTGTTTCCTAGGCCACGCCCCGGGCAGCGCTCGCCGGAGGA 180

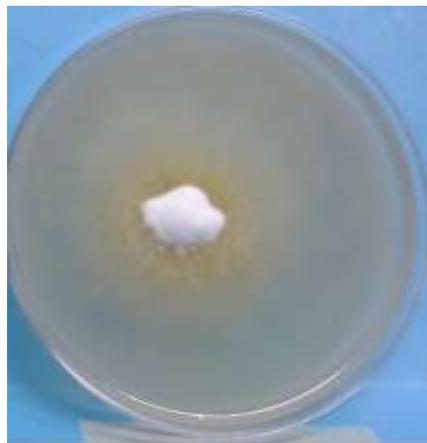
TTACTCTGGAAAAACACTCTTGAAAGAACATACCGTCTGAGCGAGCAACGCAAATCAGT 240

TAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG 300

ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC 360

CCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTT 420

GTGTGATGGACGACCGTCCCCCTCCCCAGTAACCACCCACCGCTTAGGGGGGTGGG 477

**B. Cultivo**

Cultivo Agar PDA, 25°C, 8 días



Carlos Francisco Porras López

**AUTOR**



Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladarez

**ASESOR**



MSc. María Ernestina Ardón Quezada

**DIRECTORA**



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

**DECANO**