

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“Epidemiología molecular de aislamientos clínicos de *Trichophyton spp*
en Monterrey, México”**

Por

DRA. ANABELLA WATTS SANTOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALIDAD EN DERMATOLOGÍA**

FEBRERO 2021

**"Epidemiología molecular de aislamientos clínicos de *Trichophyton spp*
en Monterrey, México"**

Aprobación de la tesis:



Dra. Carmen Amelia Molina Torres
Director de Tesis



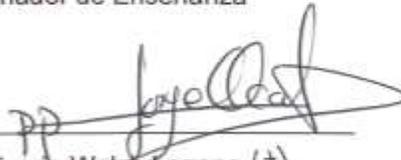
Dr. Lucio Vera Cabrera
Co-Director de Tesis



Dr. Jorge Ocampo Candiani
Jefe del Servicio de Dermatología y
Co-Director de Tesis



Dra. Minerva Gómez Flores
Coordinador de Enseñanza



Dr. Olivero Welsh Lozano (†)
Coordinador de Investigación Básica



Dr. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi futuro esposo, Juan Carlos, porque siempre estuviste a mi lado, alentándome a seguir adelante. Gracias por escucharme y confiar en mí. Nunca dudaste que lo lograría. Y ahora, juntos como familia, vamos a cumplir muchas metas más.

A mis papás, Lorenzo y Anabella, quienes han sido el mejor ejemplo de trabajo, entrega y amor incondicional. Siempre estuvieron presentes para darme ánimos en los momentos difíciles. Agradezco todos sus esfuerzos y sacrificios. Gracias por impulsarme a ser una mejor persona y por apoyarme en cumplir todas mis metas.

A mis hermanas, Lorena y Ana Catalina, quienes admiro mucho por su pasión y dedicación al trabajo y a la familia. Gracias por todos sus consejos y palabras de aliento, siempre los recibí con mucho cariño.

Le agradezco a Dios por la familia que me dio y todas las bendiciones que hemos recibido. Todos mis logros se los dedico a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Carmen Molina, por su paciencia y dedicación en esta tesis. Muchas gracias por su confianza, sus enseñanzas y por transmitir esa pasión que tiene por la micología. Al personal del laboratorio, al Dr. Lucio, Anabel, Mayra, Carlos, Mario y Wendy, les quiero agradecer su disponibilidad en todo momento. Gracias por estar presentes cuando llevaba a cabo mis experimentos. Admiro mucho el trabajo que realizan todos los días en el laboratorio.

A todos mis maestros, quiero agradecerles su disponibilidad y sus lecciones. Gracias por involucrarse en nuestra formación como mejores dermatólogos y profesionistas. Llevaré conmigo todos los buenos consejos que nos dieron.

A Andrés Flores, por toda la ayuda que me brindó este último año. Te deseo mucha suerte en tus futuros planes.

A mis compañeros de Dermatología, con quienes conviví intensamente estos últimos 4 años, quiero agradecerles su amistad y empatía. Vivimos muchos momentos felices y otros no tanto, pero siempre apoyándonos unos a otros. Les deseo el mejor de los éxitos en esta nueva etapa.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I

RESUMEN	1
---------------	---

Capítulo II

INTRODUCCIÓN	
2	

Capítulo III

JUSTIFICACIÓN	16
---------------------	----

Capítulo IV

HIPÓTESIS	
17	

Capítulo V

OBJETIVOS	18
-----------------	----

Capítulo VI

MATERIALES Y MÉTODOS	
19	

Capítulo VII	
RESULTADOS	25
Capítulo VIII	
DISCUSIÓN	40
Capítulo IX	
CONCLUSIÓN	45
Capítulo X	
BIBLIOGRAFÍA	
47	
Capítulo XI	
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	
53	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers para la amplificación por PCR	
23	
Tabla 2. Datos demográficos de <i>T. rubrum</i>	
26	
Tabla 3. Datos demográficos de <i>T. mentagrophytes</i>	27
Tabla 4. Datos demográficos de <i>T. tonsurans</i>	
28	
Tabla 5. Resultados de análisis por PCR de <i>T. rubrum</i>	
30	
Tabla 6. Resultados de análisis por PCR de <i>T.</i> <i>mentagrophytes</i>	
32	
Tabla 7. Resultados de análisis por PCR de <i>T. tonsurans</i>	
35	

Tabla 8. Resultados de análisis por RFLP con enzimas
de restricción *MvaI* y *AvaI* 38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de <i>T. rubrum</i> en medio de agar Sabouraud	
19	
Figura 2. Diagrama de extracción de ADN	
21	
Figura 3. Orígenes geográficos y tipificación NTS (TRS-1 y TRS-2) de cepas de <i>T. rubrum</i>	
31	
Figura 4. Orígenes geográficos y tipificación NTS (TmiS0, TmiS1 y TmiS2) e ITS de cepas de <i>T. mentagrophytes</i>	
34	
Figura 5. Orígenes geográficos y tipificación NTS e ITS de cepas de <i>T. tonsurans</i>	
36	
Figura 6. Electroforesis de productos PCR-RFLP de los primers L663 y R1145 digeridos con <i>MvaI</i> y <i>AvaI</i>	
37	

Figura 7. Orígenes geográficos y tipificación *Mval* y *Aval*

de cepas de *T. tonsurans*

39

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>T.</i>	<i>Trichophyton</i>
<i>spp.</i>	Especies
col.	Colaboradores
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
<i>M.</i>	<i>Microsporium</i>
<i>E.</i>	<i>Epidermophyton</i>
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
var.	Variedad
KOH	Hidróxido de potasio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
°C	Grado Celsius
mM	Milimol
Tris-HCl	Clorhidrato de Tris
SDS	Dodecilsulfato sódico
NaCl	Cloruro de sodio
M	Molar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
µl	Microlitro
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
rpm	Revoluciones por minuto
NTS	Espaciador no transcrito
ITS	Espaciador transcrito interno
pmol	Picomol
pb	Pares de bases

Capítulo I

RESUMEN

Los dermatofitos son hongos superficiales mundialmente distribuidos. Tienen la capacidad de invadir el tejido queratinizado de piel, cabello y uñas. Son responsables de variados cuadros clínicos infecciosos los cuales dependerán de su invasión topográfica. Los tres géneros de dermatofitos descritos son *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*.

Actualmente *T. rubrum* es el dermatofito antropofílico más aislado en el mundo, causando diversos tipos de tiñas. En México es el principal agente etiológico de la dermatofitosis, donde su frecuencia oscila entre el 23% y el 80.9%. En Monterrey, dentro de un estudio de 2,397 casos de dermatofitosis, *T. rubrum* fue la especie con mayor prevalencia, hasta en un 45% de los casos, seguido de *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*.

La genotipificación de dermatofitos, además de cumplir con fines epidemiológicos, es clínicamente relevante para establecer abordajes preventivos y terapéuticos apropiados y eficaces. En este estudio se realizó la identificación molecular y genotipificación de subespecies de *Trichophyton* utilizando el método PCR-RFLP y se compararon los resultados con los datos demográficos de los pacientes.

Capítulo II

INTRODUCCIÓN

Los dermatofitos son los principales causantes de las micosis superficiales en el mundo, afectando aproximadamente el 20% de la población mundial.¹ Estos son hongos que tienen la capacidad de invadir el tejido queratinizado como la piel, el cabello y las uñas de los humanos y otros animales.^{2,3} Están clasificados dentro del orden *Onygenales*, en la división *Ascomycota*. Los agentes etiológicos de las dermatofitosis se clasifican en tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. La descripción de cada género sigue el esquema de clasificación de Emmons en base a su morfología conidial y la formación de conidias. De acuerdo con su desarrollo en el suelo, en los animales o en los humanos, se clasifican en especies geofílicas, zoofílicas y antropofílicas, respectivamente.^{2,4} Actualmente, hay aproximadamente 41 especies de dermatofitos descritos, de los cuales 11 taxones son principalmente antropofílicos y responsables de la mayoría de las infecciones humanas.⁵ Al nombrar el cuadro clínico de una infección por dermatofitos, la palabra "tinea" precede al nombre del sitio del cuerpo afectado en latín.⁶

Epidemiología

La distribución mundial de los dermatofitos ha ido cambiando notablemente durante este último siglo. Esto se debe en gran parte a factores prevalentes como el cambio climático y la globalización. Algunos dermatofitos están

restringidos a ciertas áreas geográficas, sobretodo en ambientes tropicales, sin embargo, se pueden encontrar dispersos en todos los continentes. Actualmente *Trichophyton rubrum* es el dermatofito antropofílico más aislado en el mundo, causando diversos tipos de tiñas. Es el principal agente etiológico de la dermatofitosis en México desde 1940, y su frecuencia puede oscilar entre el 23% y el 80.9%. Según López-Martínez en el 2010, dentro de un análisis de dermatofitos en la Ciudad de México, las especies aisladas más frecuentes fueron: *T. rubrum* (71.2%), *T. tonsurans* (6.9%), *T. mentagrophytes* (5.5%), *M. canis* (4.5%) y *E. floccosum* (1.3%).⁷ En 2006 Welsh y col. describieron en Monterrey un estudio de 2,397 casos de dermatofitosis, de los cuales *T. rubrum* se aisló en 45% de los casos. Este mismo estudio reportó la frecuencia de las especies *Trichophyton mentagrophytes* (23.7%) y *Trichophyton tonsurans* (21%).⁸

Las infecciones por dermatofitos suelen ocurrir con mayor frecuencia en personas jóvenes o adultas, a excepción de la tinea capitis (tiña de piel cabelluda), la cual se presenta más en niños. Ciertos factores de riesgo incluyen padecer alguna inmunodeficiencia primaria (inmunodeficiencia común variable, candidiasis mucocutánea crónica) o secundaria (ej. VIH, diabetes mellitus). Así mismo, el uso de prendas, accesorios y calzado oclusivo predisponen a una infección por hongos superficiales. La tinea pedis, tinea cruris y onicomicosis afectan con mayor frecuencia a hombres que a mujeres.⁶

Biología

Las especies del género *Trichophyton* se caracterizan por presentar abundantes microconidios o microaleurioconidios de cerca de 2 a 4 µm de tamaño, con diversas formas, como piriformes, esféricos, claviformes. Sus especies más frecuentes son: *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* y *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*; y en menor proporción, *T. violaceum*, *T. verrucosum* y *T. concentricum*.⁹ *T. rubrum* causa la mayoría de los casos de onicomicosis de las uñas de los pies, tiña corporal, tiña crural y tiña del pie. *T. tonsurans* es el patógeno fúngico más común para la tinea capitis y *T. mentagrophytes*, es otra especie relevante que tiene distribución mundial.¹⁰

Patogenia

La transmisión de los dermatofitos dependerá del tipo de origen geofílico, zoofílico y antropofílico. La vía de entrada puede ser por contacto directo de las esporas o conidios o indirectamente, por contacto con fómites contaminados. En humanos, la infección por dermatofitos dependerá totalmente de su capacidad de adaptarse y sobrevivir en las capas queratinizadas. Las condiciones adecuadas favorecerán su progresión hacia las fases de adherencia y penetración.¹¹ En cuanto a la adherencia, se sabe poco sobre los factores mediadores. Se han descrito algunos mecanismos de defensa del huésped que impiden la unión entre el dermatofito y el tejido, entre ellos la flora cutánea natural, los ácidos grasos, una temperatura corporal baja, un pH elevado y un ambiente seco.^{12, 13} Si el hongo llega a superar estas condiciones,

sus esporas logran adherirse al tejido queratinizado, seguido de una germinación e invasión del estrato córneo por las hifas creciendo en múltiples direcciones.¹¹

Para la penetración de las capas córneas, el dermatofito secreta proteasas dirigidas a romper la red de queratina.^{13, 14} En esta fase, hay una importante secreción de subtilisinas y fungalisinas, ambas con actividad queratolítica, que se encuentran casi exclusivamente en los dermatofitos.¹² Hay una liberación de diversas citoquinas proinflamatorias y factores quimiotácticos causando reacciones inflamatorias, como eritema y edema.¹¹

La respuesta inmunológica del huésped es principalmente de hipersensibilidad de tipo retardado mediada por células T. En estos casos, la formación de anticuerpos no parece ser un componente protector apropiado. La activación adecuada de mecanismos de defensa inmunológica va a prevenir una mayor invasión por parte del dermatofito. La fuerza de esta respuesta inmunitaria y el grado de inflamación varía según la especie fúngica, el hospedero y el estado fisiopatológico.¹⁵

Cuadro clínico

Las infecciones producidas por estos hongos se denominan dermatofitosis, o también se le llaman tiñas, del latín *tinea* y que significa “gusano” o “polilla.”¹⁶ El

cuadro clínico varía dependiendo del sitio afectado. Estas manifestaciones incluyen lesiones en piel cabelluda, cuerpo, ingles, manos, pies y uñas.

Tinea capitis. Se denomina tinea capitis a la infección de piel cabelluda causada por hongos dermatofitos. Se presenta principalmente en niños, y es raro en adultos. A nivel mundial, existe una variación significativa en su epidemiología, ya que *T. tonsurans* se ha convertido en un agente importante en países del occidente. En segundo se encuentra *M. canis*. El cuadro clínico varía desde la presencia de pelos rotos con escamas hasta una masa inflamatoria dolorosa e intensa o Querión. El rasgo más característico es la pérdida parcial del cabello con cierto grado de inflamación.¹⁷ Un estudio tricoscópico nos permitirá apreciar los pelos en "coma", en "sacacorchos" y los pelos rotos distróficos característicos de esta entidad.¹¹

Tinea corporis y tinea cruris. La tiña del cuerpo o tinea corporis es una dermatofitosis superficial de la piel de tronco y extremidades. Su patógeno responsable más común en todo el mundo es *T. rubrum*, seguido por *T. mentagrophytes*. La tinea cruris incluye afección de ingles, genitales, área púbica, piel perineal y piel perianal. El ambiente cálido y húmedo crean un ambiente favorable para el crecimiento de hongos. Otros factores predisponentes incluyen la obesidad y la sudoración excesiva.¹¹ Sus tres agentes causales más comunes son *E. floccosum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. El periodo de incubación de ambas varía entre 1 a 3 semanas.

La tinea corporis y cruris pueden presentarse como placas anulares con bordes eritematosos y elevados, con ligera descamación.¹⁸ Presentan un blanqueamiento central característico y suelen acompañarse de prurito importante. La presencia de la escama en ocasiones resulta difícil de identificar sobretodo si el paciente se ha estado aplicando esteroides tópicos, resultando en una tinea incógnita.¹¹

La tinea corporis profunda o nodular es una variante clínica de la tinea corporis. Este implica una respuesta inflamatoria excesiva hacia el dermatofito. También puede presentarse como una perifoliculitis nodular granulomatosa, la cual implica una infección del folículo piloso, atravesando su pared y pasando hacia la dermis. Estas lesiones se pueden extender y tener una reacción de tipo granulomatosa, denominándose granuloma de Majocchi.¹¹

Tinea manuum. Las palmas tienen un cuadro clínico distinto relacionado con su falta de glándulas sebáceas. Los organismos causales típicos son los mismos que los de la tinea pedis y cruris: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *E. floccosum*.^{11,19} Principalmente se presenta como una hiperqueratosis no inflamatoria de las palmas, dedos y pliegues. Con frecuencia es unilateral y se puede acompañar de tinea pedis y onicomicosis.¹¹

Tinea pedis. La infección en los pies o tinea pedis se puede presentar como descamación interdigital, maceración y fisuras, así como lesiones pustulares,

vesiculares o hiperqueratósicas. El uso de calzado oclusivo y el andar descalzo en lugares públicos (ej. en vestidores, regaderas, baños) son factores predisponentes a esta condición.¹⁹

Onicomycosis. La tiña de las uñas, o también llamado onicomycosis, es una infección crónica que afecta las uñas con mayor frecuencia las uñas de los pies que de las manos. En estos casos se puede deber a una asociación con tinea pedis. En la mayoría de los casos, es causada por dermatofitos antropofílicos, en particular por *T. rubrum*, seguido de *T. mentagrophytes var. interdigitale*. Comúnmente se observa una placa ungueal opaca de color amarillo-blanco, acompañada de onicolísis, hiperqueratosis subungueal y leuconiquia. La presentación clínica varía dependiendo de la modalidad de invasión de la uña: subungueal, superficial, o total.^{11, 20} La variedad subungueal distal y lateral es la más frecuente. La placa ungueal aparece de color blanco amarillento, desprendida por la onicolísis, con hiperqueratosis. En la onicomycosis blanca superficial, el dermatofito invade la placa de la uña dorsal, sin penetrarla, y se forman colonias blancas opacas, que son fácilmente raspadas. La variedad subungueal proximal se observa más en paciente inmunosuprimidos. La infección comienza en el extremo proximal de la uña. En la onicomycosis endonix, el dermatofito invade distalmente el plato ungueal, pero no afecta al lecho. La onicomycosis total distrófica es la variedad más severa. La placa ungueal está completamente engrosada, friable y amarillenta. Se debe a una evolución crónica de cualquiera de los cuadros anteriores.²⁰

Diagnóstico

En el diagnóstico de las dermatofitosis, los síntomas clínicos deben ser confirmados por un método que muestre la presencia o ausencia del hongo además de identificar su especie específica. Es necesario realizar un diagnóstico definitivo antes de iniciar la terapia antifúngica debido a la larga duración, al alto costo, y a los posibles efectos adversos asociados a los medicamentos antifúngicos.^{21,22} El examen directo con hidróxido de potasio (KOH) es una técnica de detección eficiente para visualizar las hifas, con resultados falsos negativos en 5-15% de los casos. Esta técnica depende esencialmente de la habilidad del observador y de la calidad de la muestra.^{2,21} El cultivo es un complemento diagnóstico valioso. Las muestras se colocan en un medio sólido como el agar Sabouraud, el cual contiene peptonas y glucosa, favoreciendo el crecimiento de los hongos. Sin embargo, no contiene antibióticos y puede permitir el crecimiento excesivo de contaminantes fúngicos y bacterianos. Mycosel, un agar comúnmente utilizado, es similar al agar Sabouraud, pero tiene antibióticos como cicloheximida y cloranfenicol. Los cultivos de dermatofitos deben ser incubados a 25-30°C por al menos 3 semanas. Aunque este es un método diagnóstico sensible y específico, una de sus desventajas principales es que requiere de un largo período de incubación.²¹

Tratamiento

El tratamiento de las dermatofitosis se divide principalmente en dos grupos de medicamentos antifúngicos: los azoles y las alilaminas. Las presentaciones tópicas se indican con aplicaciones una o dos veces al día. Entre los más utilizados se encuentran el miconazol, ketoconazol, clotrimazol, terbinafina y naftifina. Hay disponible en distintas formulaciones de crema, gel, loción y champú. Los medicamentos tópicos están indicados para la tinea corporis, tinea cruris, tinea pedis y tinea manuum.²² Las infecciones no complicadas suelen resolver con 2 a 4 semanas de terapia tópica. Para la onicomicosis y la tinea capitis, las terapias sistémicas son las de elección. Para casos menos graves de infección por onicomicosis se han aprobado dos agentes tópicos: ciclopirox y amorolfina. Los principales agentes orales disponibles son terbinafina, itraconazol, fluconazol y griseofulvina.^{6,12} La hepatotoxicidad y la neutropenia se asocian con poca frecuencia con algunos agentes antimicóticos orales. Se deben realizar pruebas de función hepática y de hemograma completo antes de iniciar el tratamiento. La monitorización de laboratorio posterior a los de base no es necesaria para niños y adultos sanos menores de 65 años.²³ La recurrencia es común, especialmente en las uñas de los pies y cuando el grado de afectación es grave.²²

Métodos moleculares

Los dermatofitos cuentan con un pleomorfismo característico, variabilidad cultural y transposición en sus características morfológicas. El estudio fenotípico de estos hongos muchas veces no es suficiente para una correcta

clasificación taxonómica.²⁴ Estos factores representan un inconveniente significativo para el diagnóstico y tratamiento oportuno. Dadas las limitaciones inherentes a la identificación morfológica de los dermatofitos por métodos diagnósticos convencionales, se han desarrollado una serie de técnicas para la delimitación y la detección de sus variaciones genéticas.²⁵ Con estas expectativas, muchos autores han enfocado sus investigaciones en la identificación y análisis de los ácidos nucleicos de los dermatofitos, utilizando métodos moleculares. La genotipificación es útil para resolver problemas en la taxonomía de dermatofitos, así como para mejorar la fiabilidad y la velocidad diagnóstica y la diferenciación de cepas. Este método puede ser adoptado como una herramienta valiosa para análisis epidemiológicos de *Trichophyton* y para rastrear las fuentes infecciosas.^{24,25}

Técnica de PCR-RFLP

Las técnicas moleculares de identificación para dermatofitos se pueden dividir en PCR convencional y PCR en tiempo real. Estos métodos varían según la técnica de extracción de ADN, el ADN dirigido y los cebadores, y la forma de analizar los productos de la PCR.²⁶ El análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción del ADN mitocondrial (RFLP) es un método simple y confiable para la identificación y tipificación de muchos agentes microbianos, incluidas las especies de dermatofitos. Se reconocen secuencias específicas de nucleótidos en el ADN y son cortadas por enzimas de restricción. Esta

técnica es ampliamente utilizada como un medio para estudiar la filogenia de los dermatofitos, la taxonomía y la identificación de especies.²⁶⁻²⁸

Epidemiología molecular *Trichophyton spp.*

Actualmente, PCR-RFLP se utiliza para estudios de las relaciones filogenéticas y la epidemiología de las distintas especies de dermatofitos.^{24,28} En un estudio por Mochizuki y col., utilizaron esta técnica no solo para la determinación de las relaciones filogenéticas de los dermatofitos, si no también para la identificación de sus especies.³⁰ En el género *Trichophyton*, De Bievre y col. analizaron el ADN mitocondrial (ADNmt) de *T. rubrum* y demostraron que esta especie podría clasificarse en dos grupos (I y II), sin corresponder a su variación morfológica ni distribución geográfica. En este mismo estudio, el análisis RFLP de mtDNA de *T. mentagrophytes* no lo distinguió de *T. tonsurans*, a pesar de que estas dos especies se distinguen fácilmente con técnicas basadas en la morfología.³¹ Nishio et al., utilizando el análisis RFLP del ADNmt, demostraron que las especies de *Trichophyton* se pueden dividir en 7 grupos y concluyeron que esta técnica era útil para identificar cepas pleomórficas.³² En Latinoamérica contamos con pocos estudios que analicen la variabilidad entre las cepas de *Trichophyton spp.* en las distintas regiones del continente. Sería relevante publicar hallazgos sobre la genotipificación de los dermatofitos más prevalentes de una región y utilizar esta información como herramienta epidemiológica en los abordajes diagnósticos preventivos y terapéuticos.

Antecedentes

A continuación se enumeran algunos de los estudios de epidemiología molecular que se han realizado en distintos países para las especies de *Trichophyton*.

En India, Ramaraj y col. sometieron a 70 aislados clínicos de *T. rubrum* a una PCR dirigida a dos elementos de subrepetición: TRS-1 y TRS-2 de la región espaciadora no transcrita (NTS). Se observó polimorfismo específico de cepa en ambos loci de subrepetición. En total, se obtuvieron 9 cepas diferentes al combinar TRS-1 y TRS-2. Entre los cuales, el tipo A dominó con 49 (70%), aislamientos, seguido del tipo E con 8 (11.5%) aislamientos. El tipo C estuvo representado por 4 aislamientos (5.8%), 3 aislamientos (4.3%) fueron de tipo B, 2 (2.8%) fueron de tipo G y los otros cuatro tipos-D, F, H e I fueron representados por 1 cada uno. En este estudio no se estableció una relación distintiva entre la región demográfica y los tipos de cepas.³³

Jackson y col. también amplificaron los elementos de subrepetición TRS-1 y TRS-2 de la región NTS de *T. rubrum*. A partir de 101 aislados clínicos, se produjeron 21 tipos de patrones de bandas de PCR para TRS-1. Para TRS-2 se detectaron dos tipos, el tipo 1 amplificó un producto de 502 pb que representó dos copias completas de TRS-2 y representó el 86% de todos los aislamientos. En total, se reconocieron 23 tipos separados de PCR mediante amplificación de TRS-1 y TRS-2. No se realizó una categorización posterior de las distintas

cepas al combinar TRS-1 y TRS-2. Los tipos individuales de PCR no mostraron asociaciones estadísticamente significativas con regiones geográficas específicas. No hubo relaciones claras entre el tipo de PCR y el tipo de tejido o el sitio de una lesión clínica.³⁴

Para *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, Jackson y col., en el Reino Unido, amplificaron por PCR las regiones repetitivas individuales de 42 aislamientos aleatorios identificando polimorfismos de longitud de fragmentos en cada locus. La combinación de patrones de PCR de cada uno de los tres loci: TmiS0, TmiS1 y TmiS1, produjo un total de 19 perfiles de cepas individuales. En este estudio, no hubo asociaciones claras entre el tipo de PCR y el origen geográfico o el sitio clínico de los aislamientos.³⁵

Wakasa y col., en Japón, determinaron polimorfismos de longitud en cada uno de los tres loci variables: TmiS0, TmiS1 y TmiS2, de la región NTS para la subtipificación de 65 aislamientos clínicos de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. Obtuvieron 7 patrones para TmiS0, 6 patrones para TmiS1 y 3 patrones para TmiS2. Las combinaciones de estos patrones les permitieron clasificar los aislamientos en un total de 15 tipos. Once tipos eran combinaciones nuevas, mientras que los otros cuatro se habían descrito en estudios previos.³⁶

Ramaraj y col., en India, determinaron la combinación de tres loci (TmiS0, TmiS1, TmiS2) en la región NTS produciendo un total de 13 tipos entre 64 aislamientos, de los cuales 37 (57.8%) eran del tipo NTS IV, seis (9.3%) de cada NTS III y XI, cinco (7.7%) fueron NTS XIII, dos (3.1%) fueron VI y otros ocho tipos fueron producidos por aislados únicos.³⁷ Ninguno de los aislamientos de este estudio produjo patrones idénticos a los descritos en los estudios previos del Reino Unido o Japón.^{35,36}

Para *T. tonsurans*, Sakata y col. decidieron estudiar la epidemia de este dermatofito entre jugadores de deportes de contacto en Japón. Se analizaron 208 cepas y según los polimorfismos de longitud de la región NTS del gen del ARN ribosómico, estas cepas podrían dividirse en tres subtipos, NTS I (98.1%), II (1.4%) y III (0.5%). Además, los polimorfismos de un solo nucleótido y los perfiles de delección / inserción en la región NTS se determinaron en el grupo de 60 cepas de NTS I. Las 60 cepas se clasificaron dentro del mismo tipo molecular, tipo Ib, un tipo importante previamente reportado en los Estados Unidos. Estos resultados indicaron que las cepas de NTS I aisladas en Japón son clonales, independientemente del tipo de actividad deportiva.³⁸

Mochizuki y col. estudiaron a *T. tonsurans* como agente causante de una epidemia de tinea corporis y tinea capitis entre luchadores japoneses. Se aplicó un método PCR-RFLP dirigidos a la región NTS de genes de ARN ribosómico en núcleos fúngicos a un total de 232 cepas de *T. tonsurans* aisladas en Japón.

Se detectaron seis tipos moleculares, NTS tipos I, II, III, IV, V y VI, en el análisis de restricción de fragmentos digeridos con *MvaI* y *AvaI* juntos. De las 232 cepas, 199 se clasificaron como NTS I, 21 como NTS II, 7 como NTS III, 3 como NTS IV, 1 como tipo V y 1 como tipo VI. Mientras que las cepas NTS I se encontraron en todo el país, la mayoría de las cepas NTS II y NTS III se limitaron al centro de Japón. Se concluyó que la epidemia fue causada por al menos tres linajes (NTS I, NTS II y NTS III) de *T. tonsurans*.³⁹

Capítulo III

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, con el desarrollo de nuevas técnicas las descripciones taxonómicas se han actualizado con el descubrimiento de nuevas cepas. Los estudios moleculares, han logrado la diferenciación de múltiples especies y cepas de distintos agentes. La identificación del dermatofito es fundamental para establecer un abordaje preventivo y terapéutico apropiado y eficaz.²³ La diferenciación de las subespecies y de las cepas hace posible el seguimiento, la identificación de fuentes infecciosas comunes, la recurrencia o reinfección después del tratamiento, y el análisis de la virulencia de cepas y la resistencia a los medicamentos.²⁸

Capítulo IV

HIPÓTESIS

Es factible diferenciar las especies entre el grupo de cepas de *Trichophyton*, establecer las características similares entre ellos e identificar los brotes de infección en habitantes de Monterrey, México, utilizando métodos moleculares de PCR-RFLP.

Capítulo V

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los genotipos identificados del género *Trichophyton*, incluidas las especies más comunes *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*, en aislamientos clínicos en Monterrey, México, utilizando el método de PCR-RFLP.

Objetivos específicos

1. Seleccionar y cultivar aislamientos clínicos de dermatofitos de pacientes atendidos en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de Monterrey, México.
2. Extraer ADN de las cepas seleccionadas y llevar a cabo PCR-RFLP de cada muestra micológica.
3. Realizar el análisis filogenético de las cepas aisladas de *Trichophyton*.
4. Comparar los resultados de la genotipificación con los datos demográficos de los sujetos de dónde se obtuvieron las muestras clínicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

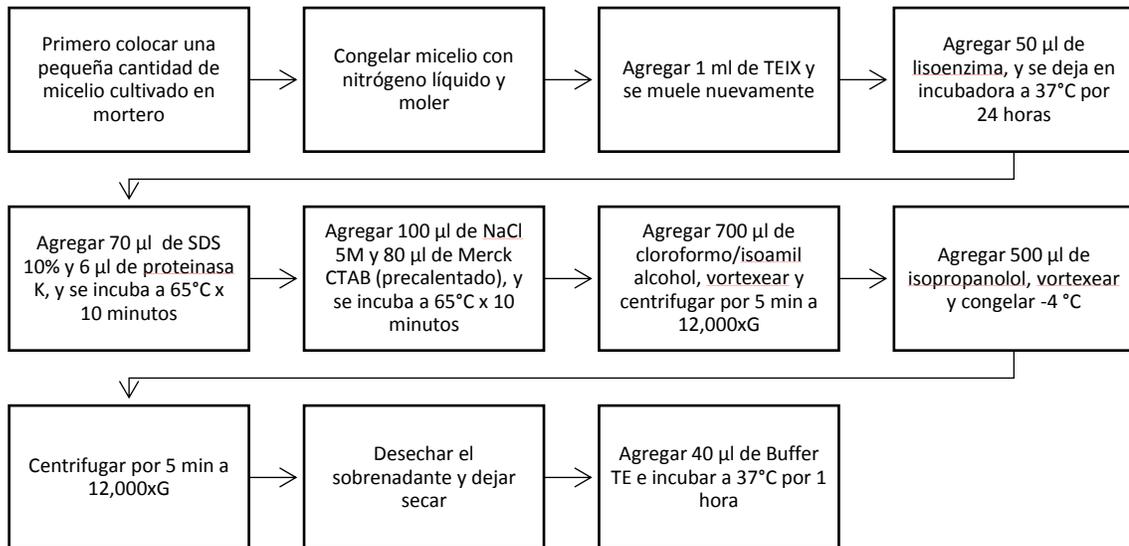
Material biológico: Las muestras fueron recolectadas del banco de cepas del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de Monterrey, México. Se seleccionaron muestras micológicas de pacientes con hallazgos clínicos que sugieren una infección cutánea superficial por dermatofitos, entre los años 2009 y 2019. Los datos demográficos revisados de cada sujeto incluyeron: edad, sexo, domicilio, diagnóstico clínico y ubicación topográfica de la infección cutánea. Las cepas seleccionadas se cultivaron en botellas de agar Sabouraud durante al menos 5 días a 30°C (Figura 1).

Figura 1. Cultivo de *T. rubrum* en medio de agar Sabouraud



Extracción de ADN. Para la extracción de ADN (Figura 1), se tomó suficiente cantidad de micelio de las colonias crecidas en Agar saboraud con un asa de cultivo y se colocaron en un mortero. Con la finalidad de romper la pared celular del hongo, se agregó nitrógeno líquido al micelio y se dejó evaporar. Utilizando el pilón del mortero se procedió a triturar el hongo congelado. Se le agregó 1 ml de buffer de lisis TE 1 X (Tris-HCl 200 mM, SDS al 0.5%, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM) y se molió nuevamente. Esta suspensión se trasladó a un tubo eppendorf de 2 ml. Al tubo se agregaron 50 µl de lisoenzima, y se dejó en incubadora a 37°C por 24 horas. Posteriormente se añadieron 70 µl de SDS 10% y 6 µl de proteinasa K, y se incubó a 65°C por 10 minutos. Se agregaron 100 µl de NaCl 5M y 80 µl de Merck CTAB (precalentado), y se incubó a 65°C por 10 minutos. Se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (700 µl), y se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm. La fase acuosa se extrajo cuidadosamente con una micropipeta y se trasladó a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml . Se precipitó el ADN con 500 µl isopropanol y se congeló a -4 °C. El pellet obtenido se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente para finalmente disolver en 50 µl de Buffer TE 1 X.

Figura 2. Diagrama de extracción de ADN



Reacciones de amplificación: Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclador de gradiente Eppendorf.

Trichophyton rubrum. Se realizó la amplificación por PCR de los elementos de sub-repetición TRS-1 y TRS-2 de la región espaciadora no transcrita (NTS). Se usaron para amplificar los primers TrNTSF-2 (5'-ACCGTATTAAGCTAGCGCTGC-3') y TrNTSR-4 (5'-TGCCACTTCGATTAGGAGGC-3') para la región TRS-1, y los primers TrNTSR-1 (5'-CTCAGTCGAACCGT-GAGGC-3') y TrNTSC-1 (5'-CGAGACCACGTGATACATGCG-3') para la región TRS-2 (Tabla 1). Cada mezcla de reacción contenía 25 µl de la mezcla maestra de PCR de goTaq Green Master mix® (Promega), 50 pmol de cada primer, 1 µl de ADN. El volumen se llevó hasta 50 µl con agua libre de nucleasas. La PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5 minutos. Las

condiciones fueron con un alineamiento a 58°C durante 30 segundos, extensión a 72°C por 90 segundos. El ciclo se repitió 35 veces con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Trichophyton mentagrophytes. Se realizó la amplificación por PCR individualmente de los elementos de sub-repetición TmiS0, TmiS1 y TmiS2 de la región NTS. Los primers TmiS0F (5'-CGAAGGATACTGTGGAAGATG-3') y TmiS0R (5'-GCAACATAAGTGTACAGCTG-3') se usarán para amplificar TmiS0. Los primers TmiS1F (5'-CAGCTGTACACTTATGTTGC-3') y TmiS1R (5'-TCGTTTCGCCTCGAAGACGCAC-3') se usarán para amplificar TmiS1 y los primers TmiS2F (5'-GACCTTCATTCTAGCTATG-3') y TmiS2R (5'-CCTATCGTACGAGAACGT TAG-3') amplificarán TmiS2 (Tabla 1). Además, se realizó la amplificación del espaciador transcrito interno (ITS) de *T. mentagrophytes* con los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Tabla 1). Cada mezcla de reacción contenía 25 µl de la mezcla maestra de PCR de goTaq Green Master mix® (Promega), 50 pmol de cada primer, 1 µl de ADN. El volumen se llevó hasta 50 µl con agua libre de nucleasas. Para los elementos de sub-repetición TmiS0, TmiS1 y TmiS2, así como para la región ITS, la PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 54°C durante 30 segundos, extensión a 72°C por 90 segundos, y una extensión final 72°C por 10 minutos.

Trichophyton tonsurans. Se amplificó por PCR la región NTS con los primers L663 (5'-TTCTAGGCTCCCAACCAC-3') y R1145 (5'-ACAAGGGCGGAACTATCAGAC-3') (Tabla 1). Además, se realizó la amplificación del espaciador transcrito interno (ITS) de *T. tonsurans* con los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Tabla 1). Cada mezcla de reacción contenía 25 µl de la mezcla maestra de PCR de goTaq Green Master mix® (Promega), 50 pmol de cada primer, 1 µl de ADN. El volumen se llevará hasta 50 µl con agua libre de nucleasas. Para la región NTS eITS, la PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, alineamiento a 57°C durante 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Tabla 1. Primers para la amplificación por PCR

Cepa	Región	Primer	Secuencia
<i>T. rubrum</i>	TRS-1	TrNTSF-2	5'-ACCGTATTAAGCTAGCGCTGC-3'
		TrNTSR-4	5'-TGCCACTTCGATTAGGAGGC-3'
	TRS-2	TrNTSR-1	5'-CTCAGTCGAACCGT-GAGGC-3'
		TrNTSC-1	5'-CGAGACCACGTGATACATGCG-3'
<i>T. mentagrophytes</i>	TmiS0	TmiS0F	5'-CGAAGGATACTGTGGAAGATG-3'
		TmiS0R	5'-GCAACATAAGTGTACAGCTG-3'

	TmiS1	TmiS1F	5'-CAGCTGTACACTTATGTTGC-3'
		TmiS1R	5'-TCGTTCGCCTCGAAGACGCAC-3'
	TmiS2	TmiS2F	5'-GACCTTCATTCTAGCTATG-3'
		TmiS2R	5'-CCTATCGTACGAGAACGT TAG-3'
<i>T. tonsurans</i>	NTS	L663	5'-TTCTAGGCTCCCAACCAC-3'
		R1145	5'-ACAAGGGCGGAACTATCAGAC-3'
<i>T. mentagrophytes</i> y <i>T. tonsurans</i>	ITS	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3'
		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Análisis de los productos amplificados: Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñidos el colorante GelRed® (Biotium) y se visualizaron bajo luz UV en un fotodocumentador. Se analizó la variabilidad en el patrón de bandas producidos por cada cepa con el programa GelAnalyzer® 19.1. Posteriormente se agruparon los clústers que mostraban el mismo patrón de bandas.

RFLP. Se realizó el análisis PCR-RFLP de las regiones NTS de *T. tonsurans*. Los amplicones resultantes se digirieron con las enzimas de restricción *MvaI* y *AvaI* (BioLabs®). Las enzimas se reconstruyeron con 0.5 µl de enzima, 2.5 µl de Buffer, y 12 µl de agua. Se agregó 10 µl de ADN amplificado a cada mezcla. Se incubó la mezcla de *MvaI* a 37°C y la de *AvaI* a 80°C, por 1 hora. Luego se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3%.

RESULTADOS

Datos demográficos

Se obtuvieron 55 muestras de pacientes obtenidas de distintos sitios como uñas, pelo y/o escama de piel de hombres y mujeres, entre las edades de 1 a 71 años, tomadas en un periodo de 2003 a 2019. De estos, 25 (45%) pacientes fueron mujeres y 30 (55%) fueron hombres. De las muestras obtenidas, 36 (65%) eran de *T. rubrum*, 13 (24%) de *T. tonsurans* y 6 (11%) de *T. mentagrophytes*. Todos los pacientes eran de la ciudad de Monterrey y su área metropolitana.

T. rubrum. El rango de edad fue de 67 años, con un mínimo de 4 y un máximo de 71. El promedio de edad fue de 38 años. 15 (42%) pacientes fueron del sexo femenino y 21 (58%) del sexo masculino. Se obtuvieron datos de pacientes de 9 municipios de Nuevo León. En la Tabla 2 mostramos el origen de cada uno de los aislamientos analizados de *T. rubrum*. Catorce (39%) de los pacientes fueron de Monterrey, 7 (19%) de Guadalupe, 4 (11%) de San Nicolás de los Garza, 4 (11%) de Apodaca, 2 (6%) de García, 2 (6%) de San Pedro Garza García, 1 (3%) de Escobedo, 1 (3%) de Cadereyta y 1 (3%) de Santa Catarina. Los pacientes tuvieron un solo diagnóstico con excepción de un masculino que presentó en conjunto onicomycosis y tinea pedis. 33 (89%) de los diagnósticos

fueron de onicomicosis, 2 (5%) de tinea capitis y 2 (5%) de tinea pedis. De los 33 casos de onicomicosis, 19 fueron en pacientes masculinos y 14 en femeninos. Los 2 casos reportados de tinea capitis se dividieron 1 en un paciente masculino y 1 en un paciente femenino. Los 2 casos de tinea pedis se dieron en pacientes masculinos.

Tabla 2. Datos demográficos de *T. rubrum*

NO.	FOLIO	ORGANISMO	SEXO	EDAD	MUNICIPIO	DIAGNÓSTICO
1	AL 167	<i>T. rubrum</i>	F	20	Monterrey	Onicomicosis
2	AP 020	<i>T. rubrum</i>	M	45	Monterrey	Onicomicosis
3	AP 027	<i>T. rubrum</i>	F	66	San Nicolás de los Garza	Onicomicosis
4	AP 035	<i>T. rubrum</i>	F	46	Monterrey	Onicomicosis
5	AP 092	<i>T. rubrum</i>	M	17	Escobedo	Onicomicosis
6	AP 116	<i>T. rubrum</i>	F	4	Monterrey	Onicomicosis
7	AP 125	<i>T. rubrum</i>	M	23	San Nicolás de los Garza	Onicomicosis
8	AP 158	<i>T. rubrum</i>	F	33	Apodaca	Onicomicosis
9	AP 173	<i>T. rubrum</i>	F	8	Santa Catarina	Onicomicosis
10	AP 188	<i>T. rubrum</i>	M	20	Guadalupe	Onicomicosis
11	AP 189	<i>T. rubrum</i>	F	56	Monterrey	Tinea capitis
12	AP 265	<i>T. rubrum</i>	F	65	Guadalupe	Onicomicosis
13	AP 276	<i>T. rubrum</i>	M	71	Apodaca	Onicomicosis
14	AP 284	<i>T. rubrum</i>	M	21	García	Onicomicosis
15	AP 291	<i>T. rubrum</i>	F	56	Monterrey	Onicomicosis
16	AP 294	<i>T. rubrum</i>	F	37	García	Onicomicosis
17	AP 295	<i>T. rubrum</i>	M	60	Cadereyta	Onicomicosis
18	AP 317	<i>T. rubrum</i>	M	35	Guadalupe	Onicomicosis
19	AP 328	<i>T. rubrum</i>	M	28	Monterrey	Onicomicosis
20	AQ 003	<i>T. rubrum</i>	F	48	Guadalupe	Onicomicosis
21	AQ 010	<i>T. rubrum</i>	M	32	San Pedro Garza García	Tinea capitis
22	AQ 016	<i>T. rubrum</i>	M	8	Monterrey	Onicomicosis
23	AQ 021	<i>T. rubrum</i>	F	28	Guadalupe	Onicomicosis
24	AQ 028	<i>T. rubrum</i>	M	68	Monterrey	Onicomicosis
25	AQ 032	<i>T. rubrum</i>	M	40	Guadalupe	Onicomicosis

26	AQ 038	<i>T. ruburm</i>	M	38	Monterrey	Onicomycosis
27	AQ 068	<i>T. ruburm</i>	M	40	Apodaca	Onicomycosis
28	AQ 072	<i>T. ruburm</i>	M	23	Monterrey	Onicomycosis
29	AQ 121	<i>T. ruburm</i>	F	55	San Nicolás de los Garza	Onicomycosis
30	AQ 348	<i>T. ruburm</i>	F	62	Monterrey	Onicomycosis
31	AQ 377	<i>T. ruburm</i>	M	53	Monterrey	Onicomycosis
32	AQ 398	<i>T. ruburm</i>	F	6	Monterrey	Onicomycosis
33	AQ 418	<i>T. ruburm</i>	M	56	Apodaca	Onicomycosis
34	AR 003	<i>T. ruburm</i>	M	16	Guadalupe	Onicomycosis
35	AR 040	<i>T. ruburm</i>	M	26	San Pedro Garza García	Onicomycosis Tinea pedis
36	AR 078	<i>T. ruburm</i>	M	58	San Nicolás de los Garza	Tinea pedis

T. mentagrophytes. Los datos demográficos de cada uno de los aislamientos analizados de *T. mentagrophytes* se muestran en la Tabla 3. El rango de edad fue de 40 años, con un mínimo de 17 y un máximo de 57. El promedio de edad fue de 38 años. Se reportaron 4 (67%) casos del sexo femenino y 2 (33%) del sexo masculino. Se obtuvieron datos de pacientes de 4 municipios de Nuevo León. Se encontró que 3 (50%) de los pacientes eran de Monterrey, 1 (17%) de San Nicolás de los Garza, 1 (17%) de García y 1 (17%) de Guadalupe. Del total de pacientes estudiados, 4 (67%) tuvieron diagnóstico de onicomycosis y 2 (33%) de tinea capitis. El diagnóstico de onicomycosis se dio en 1 paciente masculino y 3 femeninos, mientras que el de tinea capitis se dio en 1 paciente masculino y 1 femenino.

Tabla 3. Datos demográficos de *T. mentagrophytes*

NO.	FOLIO	TIPO	SEXO	EDAD	MUNICIPIO	DIAGNÓSTICO
1	AM 296	<i>T. mentagrophytes</i>	F	28	Monterrey	Tinea capitis
2	AP 180	<i>T. mentagrophytes</i>	M	48	Guadalupe	Onicomycosis

3	AP 186	<i>T. mentagrophytes</i>	F	21	San Nicolás de los Garza	Onicomycosis
4	AQ 008	<i>T. mentagrophytes</i>	M	17	Monterrey	Tinea capitis
5	AQ 062	<i>T. mentagrophytes</i>	F	57	Monterrey	Onicomycosis
6	AQ 356	<i>T. mentagrophytes</i>	F	56	García	Onicomycosis

T. tonsurans. En la Tabla 4 mostramos los datos demográficos de cada uno de los aislamientos analizados de *T. tonsurans*. El rango de edad fue de 61 años, con un mínimo de 1 y un máximo de 62. El promedio de edad fue de 16 años. Fueron 6 (46%) casos del sexo femenino y 7 (54%) del sexo masculino. Se obtuvieron datos de pacientes de 5 municipios de Nuevo León. Del total de los pacientes, 7 (54%) eran de Monterrey, 3 (23%) de Escobedo, 1 (8%) de García, 1 (8%) de Santa Catarina y 1 (8%) de Guadalupe. Todos los pacientes tuvieron un solo diagnóstico con excepción de un paciente que presentó onicomycosis y tinea pedis. En 8 (57%) casos se diagnosticó tinea capitis, en 3 (21%) onicomycosis, en 2 (14%) Querion y en 1 (7%) tinea pedis. De los 8 pacientes diagnosticados con tinea capitis, 5 fueron masculinos y 3 femeninos. Los 3 pacientes con onicomycosis se dividieron en 1 masculino y 2 femeninos. El diagnóstico de querion se dio en 1 paciente masculino y 1 femenino. El único caso con tinea pedis se dio en 1 paciente masculino.

Tabla 4. Datos demográficos de *T. tonsurans*

NO.	FOLIO	TIPO	SEXO	EDAD	MUNICIPIO	DIAGNÓSTICO
1	AP 070	<i>T. tonsurans</i>	F	8	Monterrey	Tinea capitis
2	AP 073	<i>T. tonsurans</i>	F	7	Escobedo	Tinea capitis
3	AP 074	<i>T. tonsurans</i>	F	58	Monterrey	Onicomycosis
4	AP 174	<i>T. tonsurans</i>	M	7	Escobedo	Tinea capitis

5	AP 201	<i>T. tonsurans</i>	M	5	Monterrey	Tinea capitis
6	AP 221	<i>T. tonsurans</i>	F	14	García	Querion
7	AP 290	<i>T. tonsurans</i>	M	8	Escobedo	Tinea capitis
8	AQ 209	<i>T. tonsurans</i>	M	62	Santa Catarina	Onicomycosis Tinea pedis
9	AQ 283	<i>T. tonsurans</i>	M	7	Monterrey	Tinea capitis
10	AQ 376	<i>T. tonsurans</i>	M	1	Monterrey	Querion
11	AQ 392	<i>T. tonsurans</i>	M	7	Guadalupe	Tinea capitis
12	AR 031	<i>T. tonsurans</i>	F	22	Monterrey	Onicomycosis
13	AR 068	<i>T. tonsurans</i>	F	4	Monterrey	Tinea capitis

Caracterización molecular

T. rubrum. Se amplificaron TRS-I y TRS-II en todos los aislamientos de *T. rubrum* produciendo patrones de bandas distintos con cada cepa. La PCR dirigida al TRS-I produjo 5 distintos patrones de bandas con tamaños de producto variables de aproximadamente 350 a 1500 pb. Se observaron múltiples bandas en cada tipo. Los aislamientos se clasificaron según los patrones de bandas (Tabla 5.1). La PCR dirigida al TRS-II produjo un solo patrón. Todos presentaron una banda única de tamaño aproximadamente de 350 a 450 pb (Tabla 5.2). La variación en toda la región NTS se estudió combinando los patrones de bandas de ambos loci TRS-I y TRS-II. Cuando se combinaron ambos patrones de PCR, se observaron un total de 5 tipos del total de aislamientos (Tabla 5.3). En la Figura 3 mostramos la distribución geográfica de los genotipos encontrados.

Tabla 5.1. Tamaño del amplicón y distribución de las cepas con referencia a los loci TRS-1 de *T. rubrum*

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
1	350	7	19.4%
2	500	13	36.1%
3	150, 300	3	8.3%
4	350, 500	6	16.7%
5	Patrón complejo	7	19.4%
Total		36	100.0%

Tabla 5.2. Tamaño del amplicón y distribución de las cepas con referencia a los loci TRS-2 de *T. rubrum*

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
I	350-450	36	100.0%
Total		36	100.0%

Tabla 5.3. Perfil de PCR de toda la región NTS (TRS-1 y TRS-2) de *T. rubrum*

No. serie	TRS-1	TRS-2	Tipo combinado	No. de aislamientos	Porcentaje
1	1	I	A	7	19.4%
2	2	I	B	13	36.1%
3	3	I	C	3	8.3%
4	4	I	D	6	16.7%
5	5	I	E	7	19.4%
Total				36	100.0%

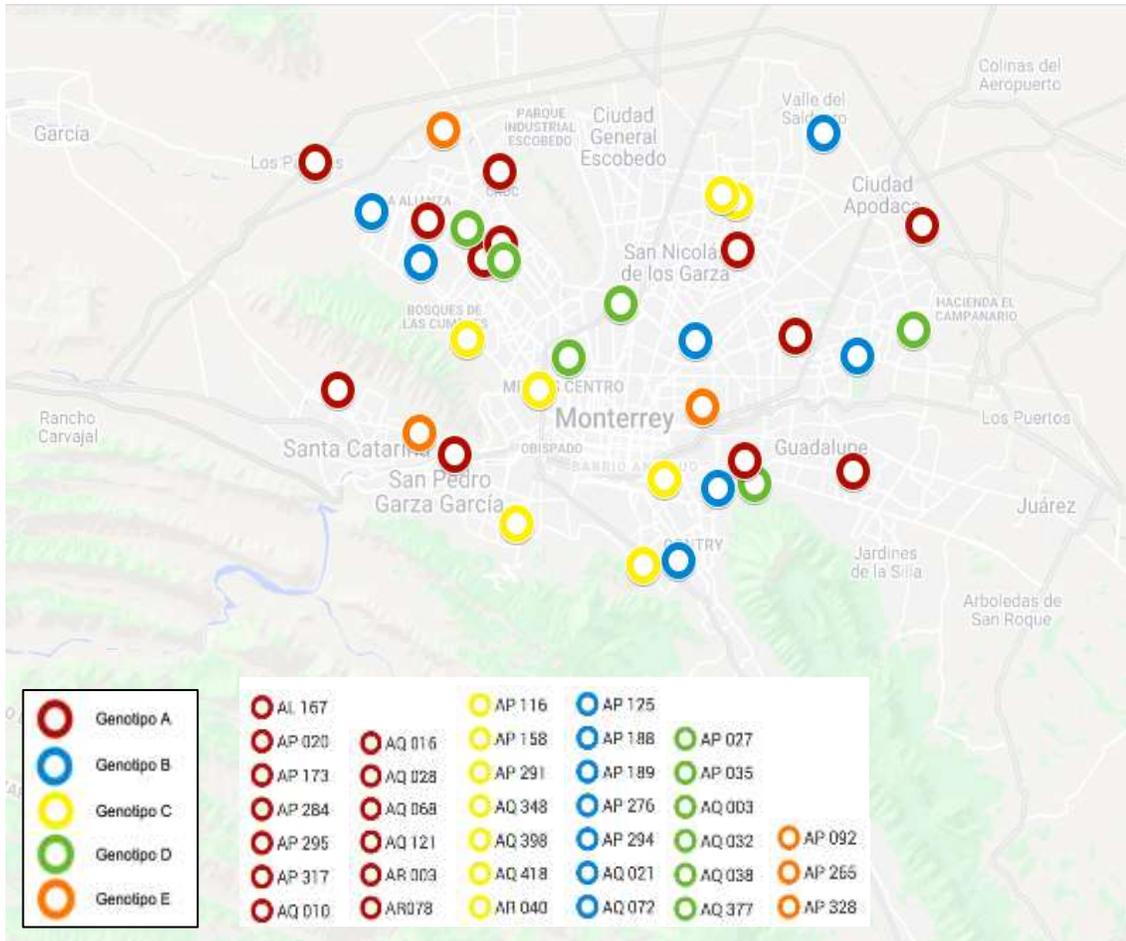


Figura 3. Distribución geográfica de genotipo de *T. rubrum* utilizando NTS en el área metropolitana de Monterrey N.L.

T. mentagrophytes. Se amplificaron TmiS0, TmiS1 y TmiS2 de la región NTS en los aislamientos de *T. mentagrophytes* produciendo distintos patrones de bandas. La PCR dirigida a la región NTS produjo 3 patrones de bandas con tamaños que variaron entre 150 a 1000 pb. (Tabla 6.1, 6.2, 6.3) Los aislamientos se clasificaron según su patrón. La PCR dirigida a la región ITS produjo un sólo patrón de banda de tamaño aproximadamente de 670 pb (Tabla 6.4). La variación en toda la región NTS e ITS se estudió combinando los

patrones de bandas de ambos. Cuando se combinaron los dos patrones de PCR, se observaron un total de 4 genotipos de *T. mentagrophytes*. En la Figura 4 mostramos la distribución geográfica de los genotipos encontrados.

Tabla 6.1. Tamaño del amplicón y distribución de las cepas con referencia del loci TmiS0 de *T. mentagrophytes*

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
1	120, 180	3	50.0%
2	Patrón complejo	3	50.0%
Total		6	100.0%

Tabla 6.2. Tamaño del amplicón y distribución de las cepas con referencia del loci TmiS1 de *T. mentagrophytes*

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
1	160	4	66.7%
2	860	2	33.3%
Total		6	100.0%

Tabla 6.3. Tamaño del amplicón y distribución de las cepas con referencia del loci TmiS2 de *T. mentagrophytes*

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
1	250-350	2	33.3%
2	860	4	66.7%

Total	6	100.0%
--------------	---	--------

Tabla 6.4. Tamaño del amplicón y distribución de las cepas con referencia del loci ITS de *T. mentagrophytes*

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
1	670	6	100.0%
Total		6	100.0%

Tabla 6.5. Perfil de PCR de toda la región NTS (TmiS0, TmiS1, TmiS2) e ITS de *T. mentagrophytes*

No. serie	TmiS0	TmiS1	TmiS2	ITS	Tipo combinado	No. de aislamientos	Porcentaje
1	1	1	2	I	A	2	33.3%
2	2	1	2	I	B	2	33.3%
3	1	2	1	I	C	1	16.7%
4	2	2	1	I	D	1	16.7%
Total						6	100.0%

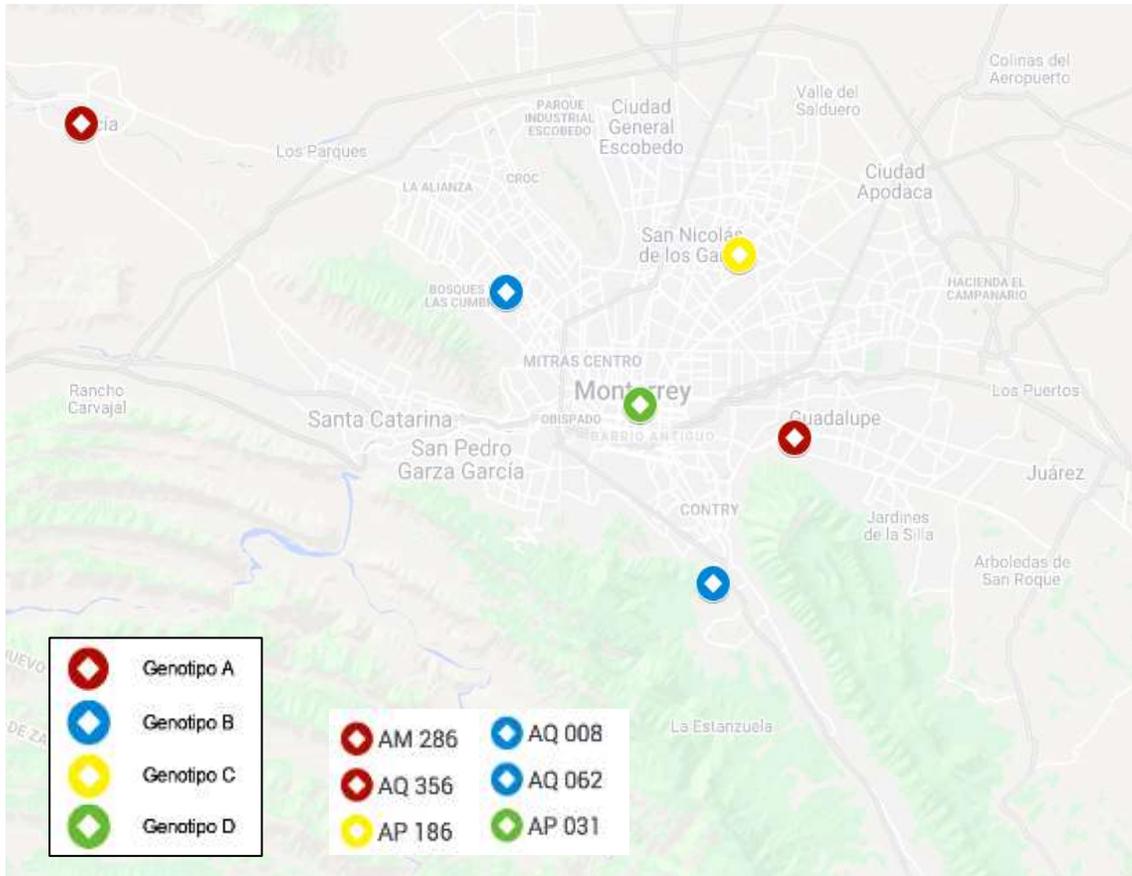


Figura 4. Distribución geográfica de genotipo de *T. mentagrophytes* utilizando NTS e ITS en el área metropolitana de Monterrey N.L.

T. tonsurans. Se amplificaron por PCR las regiones NTS e ITS en todos los aislamientos de *T. tonsurans* produciendo patrones de bandas característicos de cada cepa. La PCR dirigida a la región NTS produjo 3 patrones de bandas con tamaños que variaron entre 170 a 1100 pb (Tabla 7.1). Los aislamientos se clasificaron según su patrón. La PCR dirigida a la región ITS produjo un sólo patrón de banda de tamaño aproximadamente de 670 pb (Tabla 7.2). La variación en toda la región NTS e ITS se estudió combinando los patrones de bandas de ambos. Cuando se combinaron los patrones de PCR, se observaron

un total de 3 tipos de *T. tonsurans* (Tabla 7.3). En la Figura 5 mostramos la distribución geográfica de los genotipos encontrados.

Tabla 7.1. Tamaño del amplicón y distribución de las cepas con referencia del loci NTS de *T. tonsurans*

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
1	190, 500	7	53.8%
2	170, 750	2	15.4%
3	Patrón complejo	4	30.8%
Total		13	100.0%

Tabla 7.2. Tamaño del amplicón y distribución de las cepas con referencia del loci ITS de *T. tonsurans*

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
I	680	13	100.0%
Total		13	100.0%

Tabla 7.3. Perfil de PCR de toda la región NTS e ITS de *T. tonsurans*

No. serie	NTS	ITS	Tipo combinado	No. de aislamientos	Porcentaje
1	1	I	A	7	53.8%
2	3	I	B	4	30.8%
3	2	I	C	2	15.4%
Total				13	100.0%

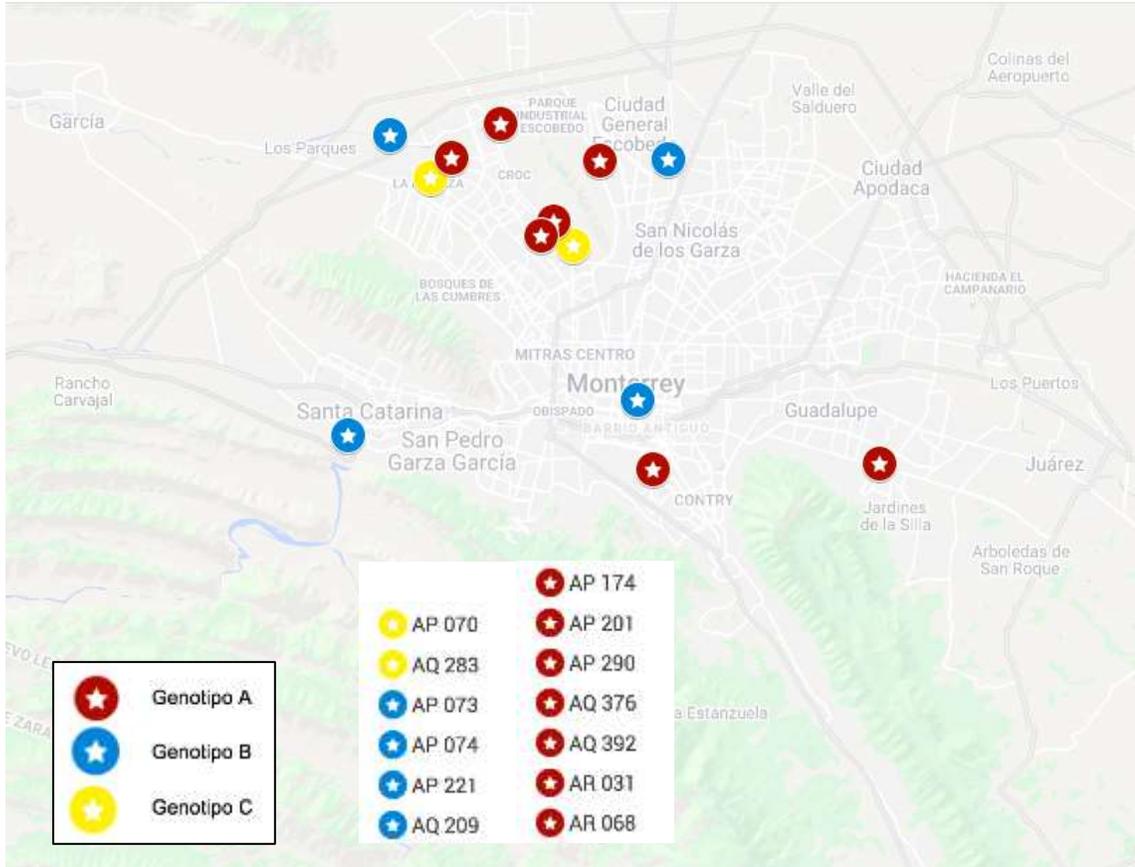


Figura 5. Distribución geográfica de genotipo de *T. tonsurans* utilizando NTS e ITS en el área metropolitana de Monterrey N.L.

RFLP NTS de *T. tonsurans*. Para una mayor discriminación de la región NTS de aislamientos de *T. tonsurans*, intentamos encontrar diferencias entre los aislamientos que muestran los patrones más prevalentes con enzimas de restricción *MvaI* y *AvaI*. La enzima *MvaI*, la cual mostró fragmentos entre 400 y 900 pb, presentó claramente 2 tipos moleculares, 1 y 2 (Figura 6.1). *MvaI* 1 con 6 tamaños de bandas de 400, 450, 500, 600, 700 y 900 pb. *MvaI* 2 presentó 3 tamaños de banda 400, 600 y 800 pb (Tabla 8.1). También se utilizó la enzima *AvaI*, la cual mostró 2 tipos moleculares, entre fragmentos de 200 a 350 pb

(Figura 6.2). El tipo 1 de *AvaI* presentó 3 bandas de 200, 250 y 300 pb. Mientras que *AvaI* 2 mostró un patrón de 4 bandas de longitudes 200, 250, 300 y 350 pb (Tabla 8.2). Cuando se combinaron los dos patrones de cada enzima de PCR-RFLP, se observaron un total de 4 tipos de NTS para *T. tonsurans*. En la Figura 7 se especifican los orígenes geográficos de estos aislamientos

Figura 6.1 Electroforesis de productos PCR-RFLP de los primers L663 y R1145. digeridos con *MvaI*. 1: AP070, 2: AP073, 3: AP074, 4: AP174, 5: AP201, 6: AP221, 7: AP290, 8: AQ209, 9: AQ376, 10: AR068.

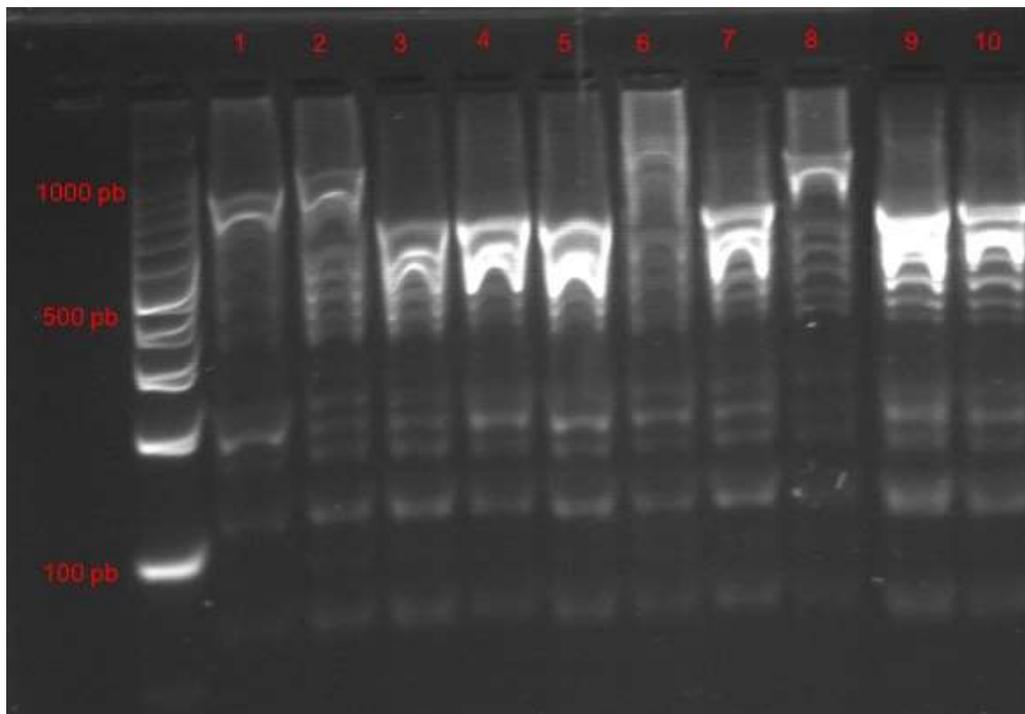


Figura 6.2 Electroforesis de productos PCR-RFLP de los primers L663 y R1145 digeridos con *AvaI*. 1: AP070, 2: AP073, 3: AP074, 4: AP174, 5: AP201, 6: AP221, 7: AP290, 8: AQ209, 9: AQ376, 10: AR068.

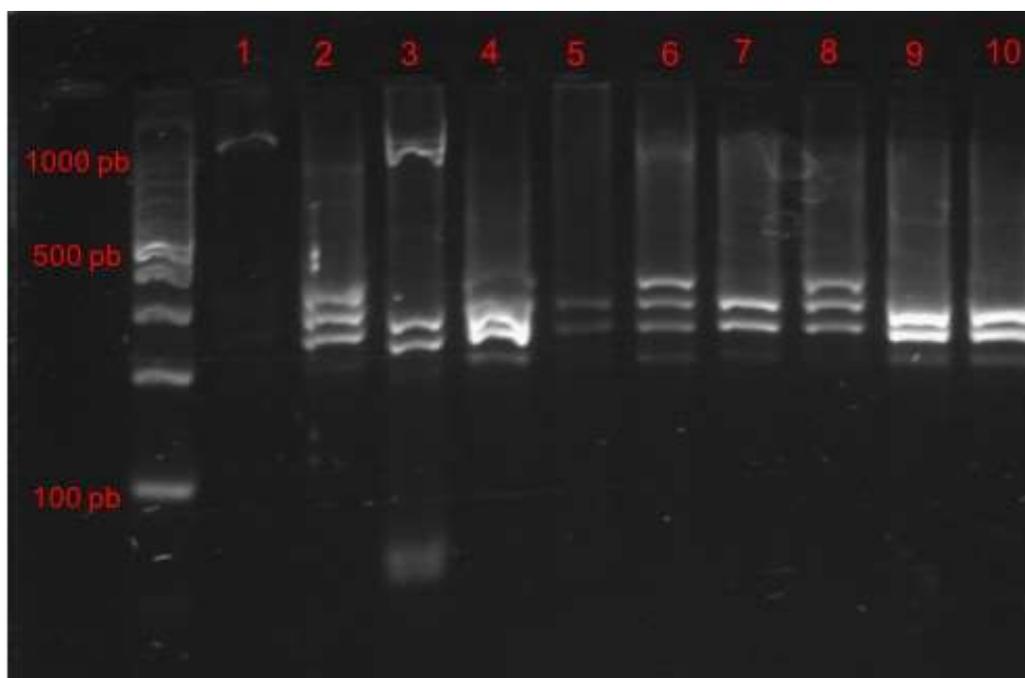


Tabla 8.1. Definición de tipificación molecular de *MvaI*.

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
1	400, 450, 500, 600, 700, 900	5	38.5%
2	400, 600, 800	8	61.5%
Total		13	100.0%

Tabla 8.2. Definición de tipificación molecular de *AvaI*.

Tipo	Tamaño de banda PCR (pb)	No. de aislamientos	Porcentaje
1	200, 250, 300	9	69.2%
2	200, 250, 300, 350	4	30.8%
Total		13	100.0%

Tabla 8.3. Definición de tipificación molecular con la combinación de las enzimas *MvaI* y *AvaI*.

No. serie	<i>MvaI</i>	<i>AvaI</i>	Tipo combinado	No. de aislamientos	Porcentaje
1	1	1	I	2	15.4%
2	1	2	II	3	23.1%
3	2	1	III	7	53.8%
4	2	2	IV	1	7.7%
Total				13	100.0%

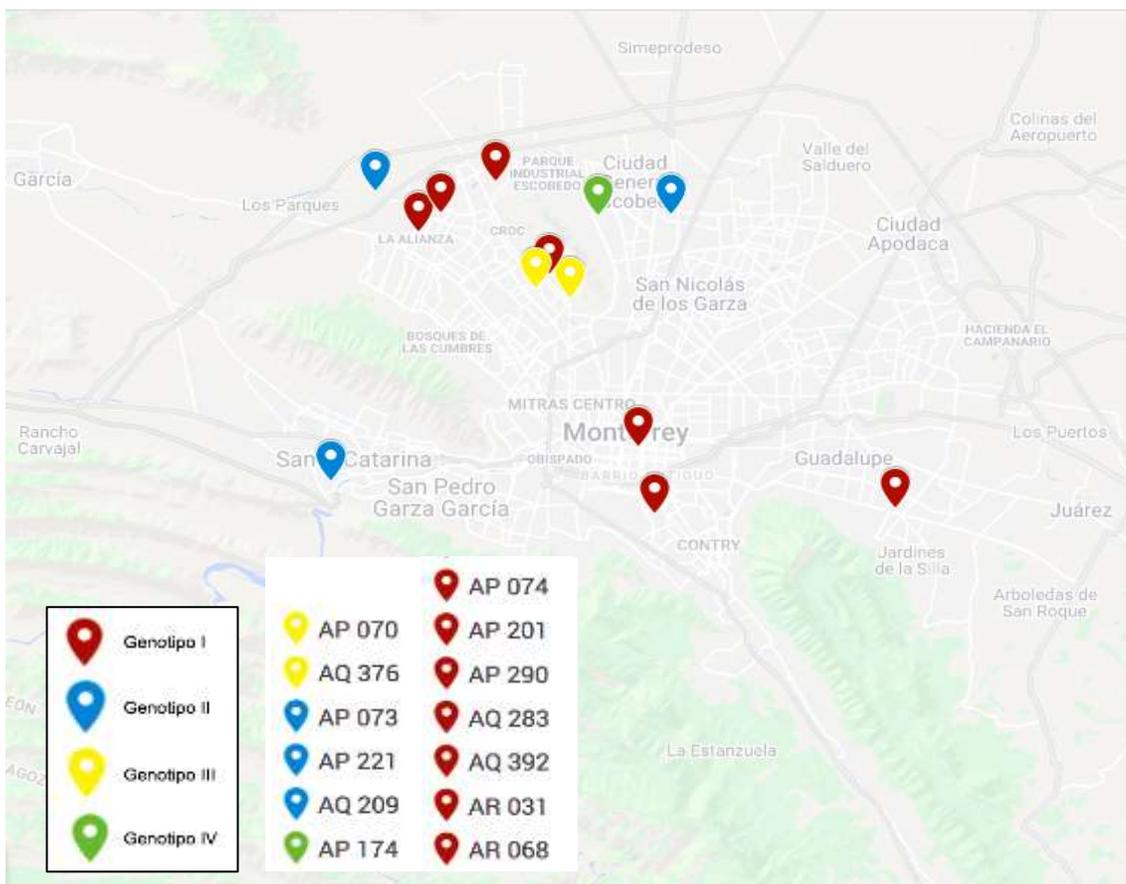


Figura 7. Distribución geográfica de genotipo de *T. tonsurans* utilizando las enzimas de restricción *MvaI* y *AvaI* en el área metropolitana de Monterrey N.L.

Capítulo VIII

DISCUSIÓN

Los avances en los métodos moleculares han proporcionado varias técnicas para identificar variaciones intraespecies y diferenciar entre especies de dermatofitos. En este estudio nos apoyamos con estas técnicas para realizar una clasificación según el número de repeticiones, varía el tamaño del producto de PCR y el patrón de bandas. Este es un método simple y confiable para determinar los genotipos del género *Trichophyton*.

En este estudio, para *T. rubrum*, la amplificación por PCR de TRS-I mostró 4 tipos. El tipo 1 fue representado por un total de 7 (19.4%) de 36 aislamientos y tenía un tamaño de banda de aproximadamente de 350 pb. El tipo 2, fue el más frecuente con 13 (36.1%) muestras, y tenía una banda de aproximadamente 500 pb. El tipo 3, fue el menos frecuente, presentando 3 (8.3%) aislamientos, con un patrón de doble banda de 150 y 300 pb. El tipo 4 estuvo representado por 6 (16.7%) muestras con dos bandas de 350 y 500 pb. Siete (19.4%) aislamientos estuvieron representado en el tipo 5, con patrones de bandas complejos. La amplificación por PCR de TRS-2 mostró un solo tipo, tipo I, representado por un total de 36 (100%) aislamientos con un tamaño de banda única de aproximadamente 350-450 pb. Ninguno de nuestros aislamientos produjo patrones idénticos a los descritos en el estudio del India.³³ Sin

embargo, el tipo 1 de TRS-2 del estudio por Jackson y col., el cual incluía a distintos países en su mayoría europeos, es igual a nuestro TRS-2 tipo I reportado.³⁴

Al combinar loci TRS-1 y TRS-2 en la región NTS, se mostró un total de 5 tipos entre 36 aislamientos clínicos. Entre los cuales, el tipo A dominó con 13 de 36 aislamientos (36.1%), seguido del tipo B y C cada uno con 7 aislamientos (19.4%). El tipo D estuvo representado por 6 aislamientos (16.7%). Tres (8.3%) muestras fueron de tipo E.

Para *T. mentagrophytes*, la amplificación por PCR de TmiS0 de la región NTS mostró 2 tipos. El tipo 1, representado con dos bandas de 120 y 180 pb, se demostró en 2(33.3%) de las 6 muestras. El tipo 2 se presentó en la mayoría de las muestras, en 4 (66.7%) aislamientos. La amplificación por PCR de TmiS1 se dividió equitativamente en 2 tipos. El tipo 1, representado con una banda de 160 pb y el tipo 2 con una banda única de 850 pb, representando a 3 (50%) muestras cada uno. La región TmiS2 amplificada mostró 2 tipos también. El tipo 1 de una banda entre 250 y 350 pb en 2 (33.3%) aislamientos, y el tipo 2 de una banda de 850 pb en 4 (66.7%). La amplificación de la región ITS de *T. mentagrophytes* dio como resultado solo un tipo, tipo I, de una banda única de aproximadamente 670 pb. El patrón de TmiS1 tipo 2 fue equivalente al tipo 1 tanto del estudio inglés como del japonés.^{35,36} Por el otro lado, los dos patrones de TmiS2 fueron idénticos a los reportados en India.³⁷

Al combinar los loci TmiS0, TmiS1 y TmiS2 de NTs con los de ITS, se mostró un total de 4 tipos entre 6 aislamientos clínicos. Entre los cuales, el tipo A y B fueron los más frecuentes con 2 (33.3%) aislamiento cada uno. Fue seguido de los tipos tipo C y D solamente cada uno con un (16.7%) aislamiento cada uno.

Para *T. tonsurans*, la amplificación por PCR de la región NTS mostró 3 tipos. El tipo 1, siendo el más frecuente con dos bandas de 190 y 500 pb, se demostró en 7(53.8%) de los 13 aislamientos. Le siguió el tipo 2 en 4 (30.8%) muestras con un patrón doble de 170 y 750 pb. El tipo 3, fue el menos frecuente, presentando 3 (23%) aislamientos, con patrones de bandas complejos. La amplificación de la región ITS de *T. tonsurans* dio como resultado solo un tipo, tipo I, de una banda única de aproximadamente 670 pb.

Al combinar loci NTS e ITS de *T. tonsurans*, se mostró un total de 3 tipos entre 13 aislamientos clínicos. Entre los cuales, el tipo A fue el más frecuente con 7 (53.8%) aislamientos. Fue seguido de los tipos tipo B con 4(30.8%), y el tipo C con 2 (15.4%) muestras.

El primer directo L663 unido a la plantilla 2 bases corriente arriba de NTS 13 y el primer reverso R1145 unidas 40 bases corriente arriba de NTS 16, y los amplicones tenían aproximadamente 170 a 700 pb de longitud. Se realizó un

análisis de enzimas de restricción a los fragmentos amplificados derivados de las regiones NTS. La digestión con las enzimas de restricción *MvaI* y *AvaI* juntas mostró 4 tipos moleculares: NTS I, II, III y IV. De las 13 cepas, 2 fueron NTS I, 3 fueron NTS II, 7 fueron NTS III y 1 fue NTS IV. Las definiciones de tipificación molecular y las correlaciones entre estudios previos mostraron un perfil de exhibición de bandas con longitudes para *AvaI* similares nuestras cepas.^{40,41} Sin embargo, fueron distintas para *MvaI*.^{39,40,41}

No hubo una distinción en la prevalencia de dermatofitosis según el género. En cuanto la edad, el grupo de *T. rubrum* y de *T. mentagrophytes* tienen una misma edad media de 38 años. A diferencia de *T. tonsurans* donde se obtuvo una edad media menor, de 16 años, debido a que la tinea capitis causada en gran parte por este microorganismo se presenta más en niños. No hubo una relación distintiva entre la región geográfica y los genotipos encontrados para *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, y *T. tonsurans*. La gran mayoría de las muestras fueron obtenidas de habitantes de Monterrey y su área metropolitana, siendo éste el municipio con mayor densidad poblacional. La cepa tipo A de *T. tonsurans* fue la más prevalente y parece tener una predilección por áreas cercanas a montañas. Sin embargo, se requieren un mayor número de aislamientos para establecer esta comparación.

Limitaciones

La gran mayoría de los casos de onicomicosis y tinea capitis son enviados a nuestro centro de referencia para realizar un examen directo y con cultivo. Motivo por el cual un porcentaje alto de nuestras muestras tienen estos diagnósticos. Se reciben menos muestras con diagnósticos de tinea corporis, cruris, mannum y pedis.

La tipificación de las cepas se realizó con un pequeño número de aislamientos. Para conocer la prevalencia real de cepas en una región en particular, se requiere un estudio multicéntrico, en otras ciudades de México, con mayor número de aislamientos. Estos factores serían importantes para observar las distintas variaciones de genotipos de *Trichophyton spp.*

CONCLUSIONES

En conclusión, la identificación del dermatofito es fundamental para establecer un abordaje preventivo y terapéutico apropiado y eficaz. En este estudio, el hallazgo de muchos aislamientos diversos obtenidos de un solo centro de referencia indica que este método podría ser una herramienta útil para estudios epidemiológicos adicionales y de población en infecciones por *Trichophyton*.

La diferenciación de las subespecies y de las cepas hace posible el seguimiento, la identificación de fuentes infecciosas comunes, la recurrencia o reinfección después del tratamiento, y el análisis de la virulencia de cepas y la resistencia a los medicamentos.

En este trabajo se logró la distinción de distintos genotipos de cepas de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans* pero no se pudo establecer la presencia de un brote o la predominancia de algún genotipo en algún área geográfica determinada. Este es el primer estudio epidemiológico a nivel molecular que se realiza en México para *Trichophyton spp.* Será importante que se realicen estudios similares en otros estados del país y comparar esta diversidad, así como la predominancia de ciertos genotipos.

Perspectivas

Aumentar el número de muestras y realizar estudios en otras ciudades de México para observar estas variaciones de genotipos (si son propios de cada región).

Capítulo X

BIBLIOGRAFÍA

1. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008; 51(Suppl 4): 2–15. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x
2. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8(2): 240–259. doi: 10.1128/CMR.8.2.240-259.1995
3. Garber G. An overview of fungal infections. *Drugs*. 2001; 61(Suppl 1): 1–12. doi: 10.2165/00003495-200161001-00001
4. Ajello L. A taxonomic review of the dermatophytes and related species. *Sabouraudia*. 1968; 6(2): 147–159. doi: 10.1080/00362176885190271
5. Rippon J. (1988). Dermatophytosis and Dermatomycosis. In J. Rippon, *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes* (pp. 169-185). Philadelphia: WB Saunders Co.
6. Elewski B, Hughey L, Marchiony Hunt K, et al. (2018). Fungal Diseases. In J. Bolognia, J. Schaffer, & L. Cerroni, *Dermatology (Vol. II)*. Philadelphia: Elsevier.
7. López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, et al. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. *Med mycol*. 2010; 48(3): 476–479. doi: 10.3109/13693780903219006

8. Welsh O, Welsh, E, Ocampo-Candiani J, *et al.* Dermatophytoses in Monterrey, México. *Mycoses*. 2006; 49(2): 119–123. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01199.x
9. Bonifaz A. (2012). Dermatofitosis. In *Micología médica básica* (pp. 93-134). México: McGraw-Hill.
10. Foster KW, Ghannoum MA, Elewski BE. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 50(5): 748–752. doi: 10.1016/s0190-9622(03)02117-0
11. Tainwala R, Sharma Y. Pathogenesis of dermatophytoses. *Indian J Dermatol.*, 2011; 56(3): 259–261. doi: 10.4103/0019-5154.82476
12. Schieke S, Garg A. (2012). Superficial fungal infection. In L. Goldsmith, S. Katz, B. Gilchrest, A. Paller, D. Leffell, & K. Wolff, *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine 8e*. New York: McGraw-Hill.
13. Martinez-Rossi NM, Persinoti GF, Peres NT, *et al.* Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. *Mycoses*. 2012; 55(5): 381–387. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02162.x
14. Vermout S, Tabart J, Baldo A, *et al.* Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008; 166(5-6): 267–275. doi: 10.1007/s11046-008-9104-5
15. Brasch J. Pathogenesis of tinea. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2010; 8(10): 780–786. doi: 10.1111/j.1610-0387.2010.07481.x

16. Dahl MV. Dermatophytosis and the immune response. *J Am Acad Dermatol.* 1994; 31(3 Pt 2): S34–S41. doi: 10.1016/s0190-9622(08)81265-0
17. Hay RJ. Tinea Capitis: Current Status. *Mycopathologia.* 2017; 182(1-2): 87–93. doi: 10.1007/s11046-016-0058-8
18. Leung AK, Lam JM, Leong KF, *et al.* Tinea corporis: an updated review. *Drugs Context.* 2020; 9: 2020-5-6. doi: 10.7573/dic.2020-5-6
19. Kane J, Summerbell R. (1997). Dermatological mycology: examination of skin, nails, and hair. In J. Kane, R. Summerbell, L. Sigler, S. Kraiden, & G. Land, *Laboratory Handbook of Dermatophytes: A Clinical Guide and Laboratory Handbook of Dermatophytes and Other Filamentous Fungi from Skin, Hair, and Nails* (pp. 33-44). Belmont: Star Publishing Company.
20. Piraccini BM, Alessandrini A. Onychomycosis: A Review. *J Fungi (Basel).* 2015; 1(1): 30–43. doi: 10.3390/jof1010030
21. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia.* 2008; 166(5-6): 295–306. doi: 10.1007/s11046-008-9106-3
22. Gupta AK, Cooper EA. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia.* 2008; 166(5-6): 353–367. doi: 10.1007/s11046-008-9109-0

23. Roberts DT, Taylor WD, Boyle J, *et al.* Guidelines for treatment of onychomycosis. *Br J Dermatol.* 2003; 148(3): 402–410. doi: 10.1046/j.1365-2133.2003.05242.x
24. Tartabini ML, Bonino GS, Racca L, *et al.* Estudio taxonómico de aislamientos clínicos de Trichophyton en Rosario, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2013; 45(4): 248–253.
25. Jackson CJ. Molecular identification and strain typing of dermatophyte fungi. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2001; 42(1): 7–10. doi: 10.3314/jjmm.42.7
26. Kanbe T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia.* 2008; 166(5-6): 307–317. doi: 10.1007/s11046-008-9107-2
27. Cafarchia C, Iatta R, Latrofa M, *et al.* Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol.* 2013; 20: 336–351. doi: 10.1016/j.meegid.2013.09.005
28. Verrier J, Monod M. Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology. *Mycopathologia.* 2017; 182(1-2): 193–202. doi: 10.1007/s11046-016-0038-z
29. Mochizuki T, Takada K, Watanabe S, *et al.* Taxonomy of Trichophyton interdigitale (Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale) by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. *J Med Vet Mycol.* 1990; 28(3): 191–196. doi: 10.1080/02681219080000251

30. Mochizuki T, Takada K, Watanabe S, *et al.* Taxonomy of *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*) by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. *J Med Vet Mycol.* 1990; 28(3): 191–196. doi: 10.1080/02681219080000251
31. de Bièvre C, Dauguet C, Nguyen VH, *et al.* Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1987; 138(6): 719–727. doi: 10.1016/0769-2609(87)90149-9
32. Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia.* 1992; 117(3): 127–132. doi: 10.1007/BF00442772
33. Ramaraj V, Vijayaraman RS, Elavarashi E, *et al.* Molecular Strain Typing of Clinical Isolates, *Trichophyton rubrum* using Non Transcribed Spacer (NTS) Region as a Molecular Marker. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(5): DC04-09. doi: 10.7860/jcdr/2017/21994.9843.
34. Jackson CJ, Barton RC, Evans EGV. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal dna nontranscribed spacer. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 4527-34. doi: 10.1128/JCM.38.12.4527-4534.2000.
35. Jackson CJ, Mochizuki T, Barton R. PCR fingerprinting of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* using polymorphic subrepeat loci in the rDNA nontranscribed spacer. *J Med Microbiol.* 2006; 55(10): 1349–55. doi:10.1099/jmm.0.46691-0.

36. Wakasa A, Anzawa K, Kawasaki M, Mochizuki T. Molecular typing of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* isolated in a university hospital in Japan based on the non-transcribed spacer region of the ribosomal RNA gene. *J Dermatol.* 2010; 37 : 431-40. doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.00809.x.
37. Ramaraj V, Vijayaraman RS, Hemanth V, et al. Molecular strain typing of *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) using non-transcribed spacer region as a molecular marker. *Indian J Med Res.* 2017; 146(5): 636-41. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_51_15.
38. Sakata Y, Ushigami T, Anzawa K, et al. Molecular Epidemiology of *Trichophyton tonsurans*, the Causative Dermatophyte of the Tinea Gladiatorum Epidemic in Japan between 2011 and 2015. *Jpn J Infect Dis.* 2018; 71(2): 140–144. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.449
39. Mochizuki T, Kawasaki M, Tanabe H, et al. Molecular epidemiology of trichophyton tonsurans isolated in Japan using RFLP analysis of non-transcribed spacer regions of ribosomal RNA genes. *Jpn J Infect Dis.* 2007; 60(4): 188–192.
40. Sugita T, Shiraki Y, Hiruma M. Genotype Analysis of the Variable Internal Repeat Region in the rRNA Gene of *Trichophyton tonsurans* Isolated from Japanese Judo Practitioners. *Microbiol Immunol.* 2006; 50(1): 57–60. doi: 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03771.x

41. Gaedigk A, Gaedigk R, Abdel-Rahman SM. Genetic Heterogeneity in the rRNA Gene Locus of *Trichophyton tonsurans*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(12): 5478–5487. doi: 10.1128/jcm.41.12.5478-5487.2003.

Capítulo XI

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Anabella Watts Santos

Candidato para el grado de Especialidad en Dermatología

Tesis: Epidemiología molecular de aislamientos clínicos de *Trichophyton spp.* en Monterrey, México

Campo de Estudio: Ciencias de la salud

Biografía: Nacida el 1 de octubre de 1991 en Monterrey, Nuevo León México. Hija de Lorenzo Luis Watts Villarreal y Anabella Santos Cañamar. Hermanos: Lorena Watts Santos y Ana Catalina Watts Santos. Abuelos paternos: Lorenzo Watts Montemayor y Carmen Villarreal Pérez. Abuelos maternos: Rafael Santos Martínez y Olga Cañamar Bazán.

Educación: Primaria y secundaria realizada en el Colegio Inglés, en Monterrey, N.L. El bachillerato realizado en la Prepa Tec, Campus Santa Catarina. Egresada de la Escuela de Medicina Ignacio A. Santos del Tecnológico de Monterrey, grado obtenido Médico Cirujano (2010-2016).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado
Presente. -

14 de diciembre de 2020

Por medio de la presente, me permito saludarlo y a su vez informar que el trabajo de tesis de la **Dra. Anabella Watts Santos**, con matrícula **1887399**, titulado "*Epidemiología molecular de aislamientos clínicos de Trichophyton spp en Monterrey, México*" fue evaluado mediante la herramienta **Turnitin** para la detección de similitud y plagio.

Los resultados fueron los siguientes:

- Porcentaje de similitud: 10%
- Similitud máxima con documentos existente: 1%

En base a lo anterior y a la reglamentación de no superar un 30% de similitud, me permito dictaminar que no considero que exista evidencia de plagio en el trabajo.

Se adjunta el dictamen de Turnitin en caso de ser requerido para su verificación

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente,
"Alere Flamman Veritatis"
Monterrey, N.L., 14 diciembre 2020.

Dra. Med. Minerva Gómez Flores
Coordinador de Enseñanza de Posgrado del
Programa de Especialización en Dermatología

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA

Av. Francisco I. Madero Pta. sin y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460, Monterrey, N.L., México. Tel.: (81) 8348 1465,
Conmutador: (81) 8389 1111, ext. 3198, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologiauanl.com



DERMATOLOGÍA
HOSPITAL UNIVERSITARIO

Visualizador de documentos

Turnitin Informe de Originalidad

Procesado el: 14-dic.-2020 8:38 a. m. CST
 Identificador: 1434703443
 Número de palabras: 10497
 Entregado: 1

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS... Por Anabela Watts Santos

Índice de similitud	Similitud según fuente
10%	Internet Sources: 8% Publicaciones: 9% Trabajos del estudiante: 3%

[Incluir citas](#) [Incluir bibliografía](#) [Excluyendo las coincidencias < 5 de las palabras](#) modo: [ver informe en vista quickview \(vista clásica\)](#) [Change mode](#) [imprimir](#) [actualizar](#) [descargar](#)

1% match (Internet desde 17-nov.-2020) https://doc.pub/documents/bonifaz-140528234218-ghnaqo01-ynd5vdl0ajlx	■
1% match () https://doi.org/10.35537/10915/78667	■
< 1% match (Internet desde 03-abr.-2019) http://encinta.uani.mx	■
< 1% match (Internet desde 18-jul.-2020) https://docplayer.es/57301570-Universidad-de-san-carlos-de-guatemala-facultad-de-ciencias-quimicas-y-farmacia.html	■
< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 02-jul.-2020) Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2020-07-02	■
< 1% match (Internet desde 29-abr.-2016) http://docslide.us	■
< 1% match (Internet desde 03-abr.-2019) http://ancuniguada.com	■
< 1% match (Internet desde 14-may.-2020) https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924646020300562	■
< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 29-abr.-2014) Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2014-04-29	■
< 1% match (Internet desde 14-abr.-2020) https://cd.dgb.uani.mx/handle/201504211/6386?locale-attribute=en	■
< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 21-oct.-2019) Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA on 2019-10-21	■
< 1% match (Internet desde 11-dic.-2017)	■