

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA E IDENTIFICACIÓN
MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO
Sporothrix schenckii”.

POR

CHRISTIAN LISBET CAMPOS CORTÉS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN TERMINAL EN
MICROBIOLOGÍA MÉDICA

ENERO, 2011

**"CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO *Sporothrix schenckii*"**

Aprobación de la Tesis:



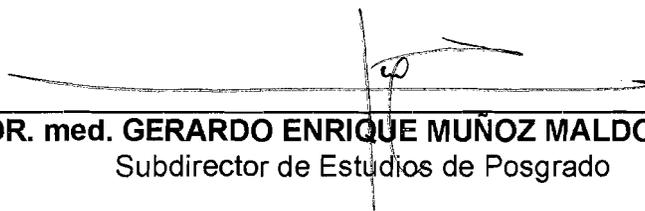
DRA. GLORIA MARÍA GONZÁLEZ GONZÁLEZ
Director de Tesis



DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ
Co-Director de Tesis



DRA. RAQUEL GPE. BALLESTEROS ELIZONDO
Co-Director de Tesis



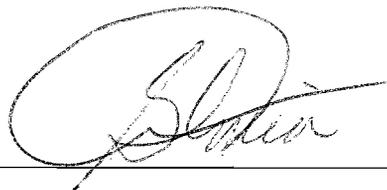
DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO *Sporothrix schenckii*”.

PRESENTADO POR:

CHRISTIAN LISBET CAMPOS CORTÉS

Este estudio fue realizado en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Gloria María González González.



DRA. GLORIA MARÍA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS

RESUMEN

CHRISTIAN LISBET CAMPOS CORTÉS.

Fecha de graduación: Enero, 2011.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Título de estudio: "Caracterización fenotípica en identificación molecular de aislamientos clínicos del complejo *Sporothrix schenckii*"

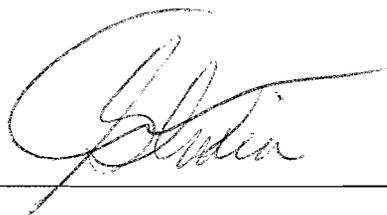
Número de páginas: 58.

Candidata al grado de Maestro en Ciencias con Orientación Terminal en Microbiología Médica.

Área de estudio: Microbiología.

Objetivo y Método del estudio: Ante la nueva descripción de nuevas especies del complejo *Sporothrix schenckii*, se requiere hacer una correcta identificación del agente etiológico de la esporotricosis. El principal objetivo de este estudio fue caracterizar fenotípicamente y realizar la identificación molecular de 34 aislamientos clínicos identificados morfológicamente como *Sporothrix schenckii*. Para realizar el estudio se realizaron estudios morfológicos a nivel microscópico y macroscópico, pruebas de asimilación de carbohidratos, pruebas de termotolerancia y pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Para la identificación molecular se llevó a cabo la secuenciación del gen de calmodulina.

Conclusiones y contribuciones: Se identificaron los 34 aislamientos como *Sporothrix schenckii*. Sin embargo, 3 de los aislamientos presentaron discrepancias en su identificación fenotípica y molecular. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se demostró que para la identificación precisa de especie del complejo *Sporothrix schenckii*, se requieren estudios adicionales a los realizados rutinariamente en los laboratorios clínicos.



DR. C. GLORIA MARÍA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes históricos

En 1898, Benjamin Schenck describió por primera vez la esporotricosis y a su agente etiológico, al cual denominó *Sporotrichia*. Smith lo clasificó como un hongo del género *Sporotrichum*. Hektoen y Perkins, en 1900, informaron el segundo caso de esporotricosis y reportaron al agente etiológico como *Sporothrix schenckii*, el hongo fue aislado de una lesión cutánea en un paciente (1,2). En 1903, Berumann y Ramond describieron la enfermedad en Francia y el microorganismo aislado fue nombrado *Sporotrichum berumannii* por Martruchot y Ramond debido a que las características morfológicas de la colonia del aislamiento eran diferentes a las reportadas por Schenck. Davis en 1921, demostró que los 2 microorganismos eran el mismo y los llamó *Sporotrichum schenckii*. En 1961, Howard describió el dimorfismo del hongo. En 1962, Carmichael destacó las diferencias entre los géneros *Sporotrichum* y *Sporothrix* y

estableció el nombre de *Sporothrix schenckii*, para el microorganismo causante de la esporotricosis.

El primer caso de esporotricosis en México, fue reportado por Gayón y Aguirre-Pequeño en 1913; y en 1947, González Ochoa y Soto Figueroa dieron a conocer el método de obtención de los polisacáridos de *Sporothrix schenckii* en fase micelial, el cual es utilizado como antígeno para la intradermorreacción, para fines de diagnóstico y de investigación epidemiológica. En 1955, Lavalle presentó una clasificación alternativa de la enfermedad; en 1983 él y Mariat publicaron una revisión de 240 casos estudiados, que se presentaron en un período de 22 años en el Centro Dermatológico Pascua (2,3). En 2003, de Beer y colaboradores, propusieron a *Ophiostoma stenoceras* como la fase teleomórfica de *Sporothrix schenckii* y sugirieron que este último pudiera representar un complejo de 2 especies diferentes (4). Marimon y colaboradores reordenaron la etiología de la enfermedad, proponiendo el complejo *Sporothrix schenckii*, que incluye cinco especies filogenéticamente relacionadas (5).

1.2 Esporotricosis

Es una micosis subcutánea o profunda de curso subagudo o crónico, producida por hongos dimórficos comprendidos dentro del complejo *Sporothrix schenckii*. Afecta principalmente piel y vasos linfáticos en forma de nódulos y gomas; en raras ocasiones es extracutánea o sistémica y entonces afecta pulmones, huesos o articulaciones. En pacientes inmunosuprimidos el hongo tiene tendencia a diseminarse a huesos y articulaciones, así como a otros órganos, incluso sistema nervioso central (1,2,3).

1.2.1 Aspectos epidemiológicos

1.2.1.1 Distribución geográfica

La esporotricosis es una enfermedad cosmopolita, se ha reportado en los 5 continentes, pero en zonas restringidas. Se han comunicado epidemias en Sudáfrica, Japón y Australia, sin embargo, el mayor número de casos se presenta en América intertropical, en lugares como México, Perú, Colombia, Uruguay y Guatemala. Entre 1998 al 2004, se reportó un

incremento significativo en el número de casos de esporotricosis en Río de Janeiro, Brasil, siendo el principal vector del hongo, el gato doméstico (6).

En México, la estadística coloca a la esporotricosis como el segundo lugar dentro de las micosis subcutáneas (19.5%), después del micetoma. Los estados que reportan la enfermedad con mayor frecuencia son: Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala y el Distrito Federal (7).

Se han registrado algunas epidemias familiares u ocupacionales. Las más importantes en Monterrey, fueron reportadas en 1967 por González-Benavides en un grupo de alfareros; Medina-Ramírez y Lavalle, en San Luis Potosí y Puebla, en familias dedicadas a la excursión que contrajeron la enfermedad mediante astillas (1,2).

1.2.1.2 Hábitat

Las especies del complejo *Sporothrix schenckii* habitan en lugares con clima templado con temperaturas entre 20 – 25°C y humedad relativa superior a 90%. La enfermedad se presenta en todas las épocas del año. El hongo vive en el suelo, detritus vegetal, madera, hojas y ramas. En México se asocia a la paja y zacate utilizados para envolver la loza. La enfermedad también se puede contraer mediante vectores indirectos, los

animales relacionados son los roedores: ratas, ratones y ardillas; de manera más reciente se ha asociado a gatos domésticos, de los cuales se ha aislado el hongo de dientes, pezuñas, entre otros. Existen reportes de transmisión de la enfermedad por picaduras de insectos y mordeduras de reptiles (8,9).

1.2.1.3 Ocupación

La esporotricosis se considera una enfermedad ocupacional, siendo los grupos de población más afectados los campesinos, agricultores, jardineros, mineros, empaques de vidrio y loza, vendedores de flores, amas de casa y niños en edad escolar que habitan en áreas rurales (1,2,8).

1.2.1.4 Vía de entrada

La principal vía de entrada del agente etiológico es la cutánea, mediante traumatismos y excoiaciones con material contaminado. Se ha reportado que individuos que viven en zonas altamente endémicas, el hongo puede ingresar por vía respiratoria, por la inhalación de las conidias de la fase micelial y provocar casos pulmonares de esporotricosis (8,10).

1.2.1.5 Período de incubación

En los casos de esporotricosis cutánea, el período de incubación es variable, fluctúa entre 1 y 4 semanas. En la esporotricosis pulmonar es desconocido, debido a que la mayoría de los casos se presentan asintomáticos (1,2,3,10).

1.2.1.6 Sexo y edad

El sexo no influye en el desarrollo de la enfermedad, se reporta una relación 1:1. Aproximadamente el 30% de los casos de esporotricosis, se presentan en niños en edad escolar, entre 5 y 15 años, que habitan en el medio rural; el 50% de los casos, se presenta en adultos jóvenes entre 18 y 35 años. Sin embargo, la enfermedad puede presentarse en cualquier etapa de la vida. Barba-Rubio reportó 2 casos polares, uno de un niño de 2 días de nacido mordido por una rata y una semana después desarrolló esporotricosis cutánea fija, el otro caso, de un anciano de 100 años de edad (1).

1.2.1.7 Factores predisponentes

El principal factor de riesgo es la ocupación, la desnutrición, el alcoholismo y padecimientos que debilitan el sistema inmune, exacerbando la enfermedad (1,10).

1.2.1.8 Clasificación clínica de la esporotricosis

La esporotricosis presenta diversas manifestaciones clínicas, por lo cual existen diferentes clasificaciones de la enfermedad, lo que ha causado controversia entre los investigadores.

1.2.1.8.1 Esporotricosis cutánea linfangítica

Es la forma clínica más frecuente de la enfermedad, se presenta hasta en el 75% de los casos y afecta principalmente a miembros superiores e inferiores y cara. Aproximadamente 2 semanas posteriores a la inoculación del hongo, se forma el chancro esporotricósico constituido por una lesión nodular o gomosa ulcerada, seguido por una cadena de gomas eritematovioláceas, no dolorosas que siguen el trayecto de los vasos linfáticos de manera ascendente, estas lesiones tienden a ulcerarse y drenar exudado purulento (10).

1.2.1.8.2 Esporotricosis cutánea fija

Esta forma clínica se presenta en aproximadamente el 24% de los casos y se caracteriza por una lesión única en el sitio de inoculación

(chancro esporotricósico), es vegetante o verrugosa, tiene bordes bien definidos, con un halo eritematovioláceo, cubierta por escamas y costras.

La lesión puede adoptar las siguientes formas: placa, úlcera, úlcero-verrucosa y acneiforme. En esta forma clínica la lesión solo crece en extensión pero no se disemina, además tiende a la curación espontánea (2, 10).

1.2.1.8.3 Esporotricosis extracutánea

Las formas extracutáneas de la esporotricosis se presentan en baja frecuencia, cercana al 1% de los casos y afecta pulmones, huesos y articulaciones principalmente (2,3).

1.2.1.8.4 Esporotricosis pulmonar

Las manifestaciones de esta infección son similares a las de la tuberculosis pulmonar. Es un cuadro clínico de baja frecuencia. Se adquiere por la inhalación de las conidias de la fase micelial del hongo. Se presenta principalmente en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y alcoholismo. Los signos y síntomas incluyen fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna, anorexia, fatiga, tos productiva con esputo purulento, hemoptisis y disnea. En estudios radiológicos, se

observan lesiones cavitarias similares a las que se presentan en la tuberculosis (10).

1.2.1.8.5 Esporotricosis osteoarticular

Esta forma clínica suele presentarse posterior a una diseminación hematológica de los pulmones o de una forma cutánea. La esporotricosis osteoarticular ocurre en sitios cercanos a lesiones cutáneas o en estructuras óseas distantes a la lesión cutánea inicial. Es más común la artritis séptica que la osteomielitis y la articulación afectada con mayor frecuencia es la rodilla, seguida del codo, muñeca, tobillo y articulaciones de la mano (1,2, 10).

1.3 Diagnóstico de laboratorio

1.3.1 Examen directo

El examen directo con KOH realizado del material obtenido de las lesiones, como exudado, escamas, tejido o esputo, no es útil debido a que en raras ocasiones es positivo (cerca del 2%). Cuando el KOH es positivo pueden observarse células de levadura de forma alargada u ovoide (1,2).

1.3.2 Cultivo

Es el método definitivo para el diagnóstico de la esporotricosis. Debido a que el complejo *Sporothrix schenckii* incluye hongos dimórficos, si el material tomado de las lesiones se siembra en medios como el agar Sabouraud y el agar papa dextrosa y se incuba a 30°C, se obtienen colonias de aspecto membranoso, de color blanquecino o beige, que con el tiempo desarrollan micelio aéreo, después de 10 días de incubación en algunas cepas, el color de la colonia de torna café oscuro. Dependiendo de

la especie de *Sporothrix*, puede no producirse pigmentos melánicos, como es el caso de *Sporothrix albicans* (1,5).

En el examen microscópico, se observan hifas delgadas, septadas y ramificadas. Presentan conidióforos de diferentes tamaños y conidias que se disponen alrededor de él dando aspecto de flor de durazno o margarita.

La forma y la disposición de las conidias varían entre especies (1,2,3).

Si el material de las lesiones se cultiva en medios nutritivos, como el agar infusión cerebro-corazón y se incuba a 37°C, durante 4 a 6 días, se obtendrán colonias levaduriformes de color blanquecino o crema.

Microscópicamente, se observan blastoconidias ovoides o alargadas que miden en promedio 3 a 5 μm (1,2).

1.3.3 Examen histopatológico

La histopatología no es característica de la infección, usualmente muestra una reacción inflamatoria piógena y granulomatosa. Pueden observarse células gigantes multinucleadas y en las lesiones de piel puede presentarse hiperplasia pseudoepiteliomatosa. En raras ocasiones se observan blastoconidias o células gemantes con tinciones especiales, como Grocott y PAS y cuando se observan se confunden con otros tipos de levaduras (1).

Puede observarse en algunos casos, cuerpos asteroides formados por células gemantes en el centro y un halo de radiación compuesto por materia eosinófila. Los cuerpos asteroides se presentan también en procesos infecciosos producidos por otros hongos, como es el caso de *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii* y *Aspergillus* spp (2,11).

1.3.4 Pruebas inmunológicas

La intradermorreacción con esporotricina M (fase micelial), que contiene la fracción metabólica polisacarídica de *Sporothrix schenckii*, se inyecta intradérmicamente 0.1 mL del antígeno a una dilución de 1: 2 000 en el antebrazo o espalda. La lectura se realiza con los mismos criterios del derivado proteico purificado (PPD); se puede presentar una respuesta inmediata (5-10 min) caracterizada por eritema y prurito, ésta sólo indica liberación de histamina y carece de valor diagnóstico. La prueba positiva se obtiene entre 24 y 48 horas, formándose una zona indurada, eritematosa y dolorosa de más de 5 mm de diámetro. La intradermorreacción con esporotricina es útil en estudios epidemiológicos y como método auxiliar en la detección de formas atípicas de la enfermedad. Esta prueba no se utiliza en la rutina del laboratorio clínico para el diagnóstico de la esporotricosis debido a que puede dar resultados

falsos positivos en pacientes que han tenido la enfermedad y falsos negativos, en pacientes anérgicos e inmunosuprimidos (1,10).

1.3.5 Otras pruebas

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la esporotricosis no han progresado como en el caso de histoplasmosis y coccidioidomicosis. En laboratorios de referencia, se realizan pruebas de aglutinación en tubo y con látex. Sin embargo, no se han realizado estudios para medir la sensibilidad y la especificidad de estos ensayos.

Los rayos X y tomografías pueden ser útiles en casos de esporotricosis pulmonar y osteoarticular. Sin embargo, las alteraciones son inespecíficas.

En la actualidad, se puede hacer la identificación de aislamientos clínicos en muestras de tejidos por medio de la amplificación de fragmentos de DNA, de genes como quitina-sintetasa, calmodulina y 26S rDNA (1).

1.4 Tratamiento

Las diversas formas clínicas de la esporotricosis requieren tratamiento con agentes antifúngicos y otras medidas locales.

En los casos de esporotricosis linfocutánea, la infección en raras ocasiones se resuelve espontáneamente, lo que hace necesario el tratamiento. El yoduro de potasio es el tratamiento de primera elección debido a su excelente eficacia, bajo costo, mínimos efectos secundarios y fácil administración. El itraconazol se ha convertido en el antifúngico de elección para los casos de esporotricosis linfocutánea, con una tasa de éxito en el tratamiento del 90% al 100% (12).

En casos cutáneos no complicados o en mujeres embarazadas, el tratamiento recomendado es la hipertermia local (1).

En casos de esporotricosis pulmonar, los fármacos de elección son la anfotericina B o el itraconazol. Sin embargo, en estos pacientes la recuperación es rara y por lo general fallecen por la infección. En

pacientes con esporotricosis meníngea o con esporotricosis diseminada, el tratamiento recomendado es anfotericina B, además de tratamiento de soporte con itraconazol (10, 12).

1.5 Variabilidad genética de *Sporothrix schenckii*

A nivel mundial existen diversos reportes acerca de la variabilidad genética de *Sporothrix schenckii*, como el realizado en 1996, por Ishizaki y colaboradores, en el cual analizaron aislamientos clínicos provenientes de diferentes países e hicieron la comparación de los patrones de restricción del ADNmt obtenidos del corte con diferentes enzimas. Los resultados mostraron 2 grupos: A y B. En el grupo A, se incluían aislamientos provenientes de América y África, mientras que el grupo B los aislamientos procedentes de Asia y Europa. En base a esto los autores concluyeron que el genotipo de *Sporothrix schenckii* variaba con la localización geográfica (13).

Basados en el estudio anterior, en México, en 2002, Mesa-Arango y colaboradores, analizaron las características genotípicas y fenotípicas de aislamientos clínicos y ambientales de *Sporothrix schenckii*, provenientes de México, Colombia y Guatemala, así como su correlación con la forma

clínica de la esporotricosis y su origen geográfico. Los resultados obtenidos de la genotipificación, mostraron 4 grupos: el primero formado por aislamientos procedentes de México, el segundo integrado por los aislamientos de Colombia y Guatemala y los grupos tercero y cuarto ambos integrados por 1 aislamiento clínico de México cada uno respectivamente. En el estudio fenotípico, los aislamientos procedentes de Colombia, presentaron la termotolerancia más baja, siendo su diámetro menor a 37°C y un mayor tamaño de conidias. Se encontró relación entre el genotipo y la localización geográfica, sin embargo, no se encontró asociación con la forma clínica de la enfermedad (14).

En el 2003, de Beer y colaboradores, realizaron un estudio en el cual determinaron la secuencia de la región ITS 1, de 11 aislamientos clínicos y ambientales de *Sporothrix schenckii*. En el análisis de los resultados de la secuenciación los investigadores observaron 2 grupos de aislamientos, lo que les permitió concluir que *Sporothrix schenckii* podría representar un complejo de 2 especies diferentes (4).

En base a este hallazgo, en el 2006, Marimon y colaboradores, realizaron un estudio en el cual, analizaron la secuencia de los genes de calmodulina, quitina sintetasa y β -tubulina, de 60 aislamientos de *Sporothrix schenckii*,

provenientes de Sudáfrica, España y algunos países de Sudamérica. En los resultados obtenidos de las secuencias de los genes observaron 3 grupos de aislamientos. El primero contenía a todos los aislamientos de Brasil, el segundo los aislamientos provenientes de Sudáfrica y de los países de Sudamérica, este grupo se subdividió en 4 grupos de aislamientos y el tercer grupo con los aislamientos de España. Por lo que, se sugirió que *Sporothrix schenckii* podría ser un complejo de especies 6 con diferente distribución geográfica (15).

Con los resultados obtenidos en el estudio anterior, el mismo grupo de investigadores, realizaron la caracterización genotípica y fenotípica de 125 aislamientos clínicos y ambientales de *Sporothrix schenckii*, procedentes de países de Asia, Europa, África y América. Para la caracterización genotípica analizaron la secuencia del gen de calmodulina, la cual les permitió observar 5 grupos de aislamientos. El primer grupo integrado por los aislamientos de Brasil, el segundo formado por los aislamientos de México, el tercero por aislamientos de E.U.A., y algunos países de Europa y Asia, el cuarto grupo que incluía aislamientos procedentes de Francia, Sudáfrica y algunos países de América y el quinto formado por aislamientos de Inglaterra y Alemania.

Para la caracterización fenotípica se realizaron estudios morfológicos que incluyeron las descripciones a nivel macroscópico y microscópico, pruebas fisiológicas de crecimiento a diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C) y pruebas de asimilación de 35 diferentes carbohidratos y 7 fuentes de nitrógeno. Además realizaron pruebas de licuefacción de la gelatina, producción de ureasa, tolerancia al cloruro de sodio, cloruro de magnesio y cicloheximida. Encontraron diferencias en tamaño y forma de las conidias, en termotolerancia y en asimilación de algunos carbohidratos, tales como rafinosa y sacarosa.

Los hallazgos obtenidos de este estudio permitieron la descripción de tres nuevas especies. *Sporothrix brasiliensis* y *Sporothrix mexicana*, nombradas así por su origen y *Sporothrix globosa*, nombrada así por la forma de sus conidias y que junto con las especies anteriormente descritas *Sporothrix albicans* y *Sporothrix schenckii*, integran el complejo *Sporothrix schenckii* (5).

Con las nuevas especies definidas, en 2008, Marimon y colaboradores, llevaron a cabo un estudio en el cual, realizaron pruebas de susceptibilidad a diferentes antifúngicos, entre ellos, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, albaconazol y anfotericina B. Encontraron diferencias en los rangos de concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenidos

dependiendo de la especie del complejo evaluada, por ejemplo, el itraconazol presentó una buena actividad antifúngica frente a *Sporothrix brasiliensis*; sin embargo, *Sporothrix mexicana* y *Sporothrix albicans* presentaron CMI's altas. En el caso de anfotericina B, ésta presentó una buena actividad antifúngica contra *Sporothrix schenckii*, al contrario de lo observado con *Sporothrix mexicana* (16).

En México, en el 2009, Madrid y colaboradores, identificaron 32 aislamientos clínicos y ambientales, provenientes de Colombia, Guatemala y México, por medio de la secuenciación del gen de calmodulina. De los 25 aislamientos de México, uno fue identificado como *S. globosa*, el resto fueron identificados como *S. schenckii*. De los 7 aislamientos restantes procedentes de Guatemala y Colombia, 1 y 2 aislamientos respectivamente fueron identificados como *S. globosa* y el resto fueron identificados como *S. schenckii*. Este fue el primer reporte de la presencia de *S. globosa* en México, Colombia y Guatemala (17).

1.6 Características microbiológicas de las especies del complejo

***Sporothrix schenckii*.**

La morfología colonial de las especies del complejo *Sporothrix schenckii*, es similar y depende del medio en que hayan sido sembradas. Después de 21 días de incubación a 30°C en agar papa dextrosa, las colonias se observan desde color naranja pálido hasta negro. Sin embargo, *Sporothrix albicans* y algunas cepas de *Sporothrix schenckii* no presentan color.

Microscópicamente, las 5 especies del complejo *Sporothrix schenckii*, presentan grupos de conidias terminales o intercaladas en conidióforos menos diferenciados. Las conidias simpodiales son hialinas o poco pigmentadas, de forma ovoide o piriforme y miden de 2 a 8 µm de largo por 1.5 a 2.5 µm de ancho.

Las conidias sésiles presentan una pared gruesa y pigmentada por la melanina. La forma y el tamaño de las conidias sésiles varían

dependiendo la especie. Las conidias sésiles de *Sporothrix albicans* son de forma ovoide, miden 2 - 6 μm de largo por 2 - 3.5 μm de ancho y no son pigmentadas. En el caso de *Sporothrix mexicana*, también presenta conidias ovoides, pero miden 3 - 4 μm de largo por 2 - 3.5 μm de ancho y son pigmentadas.

Las conidias sésiles de *Sporothrix brasiliensis* y *Sporothrix globosa* son de forma globosa, miden 2.5 -5 μm de largo por 2 - 3 μm de ancho y 3 - 4 μm de largo por 2 - 3.5 μm de ancho respectivamente. En el caso de las conidias sésiles de *Sporothrix schenckii* su forma varía entre triangular y cuneiforme dependiendo de la cepa y miden 2 -6 μm de largo por 2 - 3.5 μm de ancho.

Las especies del complejo también presentan diferencias en el crecimiento a diferentes temperaturas, siendo *Sporothrix globosa* la única que no crece a 37°C, además de tener diferentes patrones de asimilación de los carbohidratos rafinosa y sacarosa. Las especies *Sporothrix mexicana* y *Sporothrix schenckii* son capaces de asimilar ambos carbohidratos, *Sporothrix albicans* y *Sporothrix globosa* son capaces de asimilar sólo la sacarosa y *Sporothrix brasiliensis* es la única que no asimila ninguno de los 2 carbohidratos (5).

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la esporotricosis es una micosis subcutánea reportada frecuentemente y su identificación se basa en estudios morfológicos tradicionales.

Recientemente, se demostró que *Sporothrix schenckii* es un complejo que requiere estudios adicionales para la identificación precisa de sus especies.

En nuestro país existe escasa información de la frecuencia de especies del complejo *Sporothrix schenckii*.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar aislamientos clínicos del complejo *Sporothrix schenckii* por medio de estudios fenotípicos y moleculares.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar las características morfológicas y fisiológicas de aislamientos clínicos identificados previamente como *Sporothrix schenckii*.
2. Determinar la susceptibilidad de los aislamientos frente a distintos antifúngicos.
3. Identificar los aislamientos clínicos por estudios moleculares.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general

Para cumplir con los objetivos específicos del presente estudio se planteó la siguiente estrategia general. A partir de 34 aislamientos clínicos identificados morfológicamente como *S. schenckii* se realizó la caracterización fenotípica, la cual incluyó el estudio de la morfología a nivel macroscópico y microscópico, pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas, así como pruebas de asimilación de diferentes carbohidratos. Además dentro de la caracterización fenotípica se realizaron pruebas de susceptibilidad a diferentes antifúngicos.

Para la identificación molecular, a partir de los aislamientos clínicos, se extrajo el ADN utilizando el método de lisis enzimática y CTAB. Se amplificó el gen de calmodulina y el producto obtenido se purificó utilizando el método de precipitación con alcohol etílico. El producto

purificado se envió a secuenciar y posteriormente se realizó el alineamiento de secuencias nucleotídicas.

4.2 Aislamientos Clínicos del complejo *Sporothrix schenckii*

Se analizaron 34 aislamientos clínicos del complejo *Sporothrix schenckii*, las cepas fueron enviadas al Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los aislamientos fueron identificados morfológicamente macroscópicamente y microscópicamente. Las cepas se mantuvieron en suspensión en agua estéril a temperatura ambiente hasta que se llevaron a cabo los ensayos.

Los aislamientos fueron recolectados de 1999 al 2009, 20 de los aislamientos procedentes de Nuevo León y 14 de San Luis Potosí. De la población de pacientes de los cuales se obtuvieron los aislamientos, 20 pertenecían al sexo masculino y 14 al sexo femenino, el rango de edad de los pacientes es de 9 a 77 años, presentándose con mayor frecuencia entre 30 y 40 años.

La forma clínica que presentaron con mayor frecuencia los pacientes fue la esporotricosis cutánea linfangítica en 20 de los pacientes.

4.2 Caracterización fenotípica

4.2.1 Estudio de la morfología a nivel macroscópico

Para evaluar las características de la morfología a nivel macroscópico, los aislamientos clínicos del complejo *Sporothrix schenckii*, se sembraron en agar papa dextrosa y se incubaron durante 21 días a 30°C, cada aislamiento se sembró por triplicado. Los parámetros que se tomaron en cuenta para la descripción fueron: color, textura y topografía colonial, del anverso y reverso de la placa (5).

4.2.2 Estudio de la morfología a nivel microscópico

Para determinar las características microscópicas, los aislamientos clínicos del complejo *Sporothrix schenckii*, se sembraron de manera inicial en agar papa dextrosa y se incubaron durante 7 días a 30°C. En una placa de agar papa dextrosa se le colocó un bloque del mismo medio de cultivo de 1 cm² aproximadamente y a partir del cultivo inicial se inoculó el bloque de agar, con un aplicador de madera estéril. Posteriormente se le colocó un cubreobjetos, previamente enjuagado con alcohol etílico al 70%

y flameado, se presionó suavemente el cubreobjetos para asegurar el contacto con el bloque de agar. La placa con el bloque de agar se incubó durante 12 días a 30°C. Después, se retiró el cubreobjetos del bloque de agar y se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. Las laminillas fueron selladas con resina para evitar la desecación. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado.

Para evaluar las características microscópicas, se empleó un microscopio de contraste de fases (Nikon 50i). Se tomaron en cuenta los parámetros de pigmentación, forma y tamaño de las conidias sésiles. Para evaluar la pigmentación y forma de las conidias sésiles se observaron 20 campos por laminilla. Para el análisis morfométrico, se midió el largo y ancho de 50 conidias sésiles y se promediaron las medidas para establecer el tamaño. El software empleado fue NIS-Elements BR 2.30 (5).

4.2.2 Estudios fisiológicos

4.2.2.1 Pruebas de termotolerancia

Para llevar a cabo las pruebas de termotolerancia, los aislamientos clínicos del complejo *Sporothrix schenckii*, se sembraron en agar papa dextrosa y se incubaron durante 7 días a 30°C. Para preparar el inóculo, se agregaron aproximadamente 2 mL de solución salina 0.85% estéril a cada

placa y se cubrieron las colonias, se hizo un raspado y la suspensión resultante se transfirió a un tubo limpio y estéril de 13 × 100 con tapón de rosca y se dejó reposar durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y estéril de 13 × 100 con tapón de rosca, se agregó solución salina y se colocó el tubo en el vórtex por 15 segundos. Se ajustó la concentración de la suspensión a un rango de 80 a 82% de transmitancia a una longitud de onda de 530 nm en el espectrofotómetro Sequoia-Turner modelo 340, el cual corresponde a una concentración de inóculo de $0.4-5 \times 10^4$ UFC/mL. De esta suspensión se inocularon 100 µL en la parte central de una placa de agar papa dextrosa. Las placas para cada aislamiento se incubaron de manera independiente durante 15 días a 30, 35 y 37 °C. Posteriormente se midió el diámetro de la colonia en milímetros. Las pruebas de termotolerancia se realizaron por triplicado (5,14).

4.2.2.2 Pruebas de asimilación de carbohidratos

Para llevar a cabo las pruebas de asimilación de carbohidratos, los aislamientos clínicos del complejo *Sporothrix schenckii*, se sembraron en agar papa dextrosa y se incubaron durante 7 días a 30°C. Para preparar el inóculo para la galería de API 20C AUX, se agregaron aproximadamente

2 mL de solución salina 0.85% estéril a cada placa y se cubrieron las colonias, se hizo un raspado y la suspensión resultante se transfirió a un tubo limpio y estéril de 13 × 100 con tapón de rosca y se dejó reposar durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró con gasa estéril y la suspensión resultante se transfirió a un tubo limpio y estéril de 13 × 100 con tapón de rosca, se agregó solución salina y se agitó el tubo en el vórtex por 15 segundos. Se ajustó la concentración de la suspensión conidial a una turbidez comparable con la del tubo #2 en la escala de Mc Farland y posteriormente se añadió medio API C y se inoculó la galería API 20C AUX. Se incubó durante 7 días a 30°C y se realizó la asimilación de carbohidratos (18).

Las galerías de API 20 C AUX empleadas para este trabajo fueron obtenidas de la compañía Biomérieux, Marcy l'Etoile-France. Los carbohidratos utilizados para esta prueba se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Carbohidratos incluidos en la galería API 20C AUX

Sustratos API 20 C AUX	
Glucosa	D-sorbitol
Glicerol	Metil-αD-glucopiranosida
2-ceto-glucoronato cálcico	N-acetil-glucosamina
L-arabinosa	D-celobiosa
D-xilosa	D-lactosa

Adonitol	D-maltosa
Xylitol	D-sacarosa
D-galactosa	D-trehalosa
Inositol	D-melezitosa
D-rafinosa	

4.2.3 Pruebas de susceptibilidad *in vitro*

4.2.3.1 Agentes antifúngicos

Los agentes antifúngicos empleados en este trabajo fueron obtenidos de sus respectivas compañías farmacéuticas, las cuales fueron las siguientes: anfotericina B (Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), posaconazol (Schering-Plough Reseach Institute, Kenilworth, N.J.), voriconazol (Pfizer, Inc., New York, NY).

Para el método de macrodilución, se llevó a cabo una serie de diluciones de los antifúngicos y se colocaron 0.1 mL de cada concentración en tubos estériles de 13 × 150 con tapón de rosca, los cuales se mantuvieron en congelación a -20°C hasta que se realizaron las pruebas de susceptibilidad. El rango de concentración utilizado para los antifúngicos fue de 0.0313 – 16 µg/mL, su diluyente fue dimetilsulfóxido, excepto la anfotericina B,

cuyo diluyente fue agua y el medio utilizado fue el RPMI 1640 para determinar la susceptibilidad *in vitro* (19).

4.2.3.2 Preparación del inóculo

Los aislamientos del complejo *Sporothrix schenckii*, fueron evaluados empleando el método de referencia M38-A2 del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Cada aislamiento se sembró en agar papa dextrosa durante 7 días a 30°C. Para preparar el inóculo, se agregaron aproximadamente 2 mL de solución salina 0.85% estéril a cada placa y se cubrieron las colonias, se hizo un raspado y la suspensión resultante se transfirió a un tubo limpio y estéril de 13 × 100 con tapón de rosca y se dejó reposar durante 5 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y estéril de 13 × 100 con tapón de rosca, se agregó solución salina y se colocó el tubo en el vórtex por 15 segundos. Se ajustó la concentración de la suspensión a un rango de 80 a 82% de transmitancia a una longitud de onda de 530 nm en el

espectrofotómetro (Sequoia-Turner modelo 340), lo que corresponde a una concentración de inóculo de $0.4-5 \times 10^4$ UFC/mL (16,19).

4.2.3.3 Prueba de Macrodilución

Para llevar a cabo la prueba de macrodilución, se preparó una dilución de 1:100 con solución salina estéril y la suspensión del inóculo previamente ajustado (9.9 mL de solución salina + 0.1 mL del inóculo) y posterior a esta dilución, se realizó una dilución 1:20 con el medio RPMI 1640 en tubos Falcon estériles (11.4 mL del medio RPMI 1640 + 0.6 mL de la dilución 1:100). Se agregaron 0.9 mL de esta dilución a los tubos con las diferentes concentraciones del fármaco. Se añadió un tubo control libre de fármaco y un tubo control que contenía solo inóculo y DMSO. Los tubos se incubaron por 72 horas a 30°C y se realizaron lecturas cada 24 horas.

La CMI se definió como la concentración más baja en la que no se presentó crecimiento.

Para el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad, se emplearon las cepas de *Candida krusei* ATCC6258 y *Candida parapsilosis* ATCC22019. Los límites de las CMI's recomendados para las cepas control en las

pruebas de susceptibilidad para los antifúngicos correspondientes se muestran en la Tabla 2 (16,19).

Tabla 2. Límites de las CMI's recomendados para las cepas control en las pruebas de susceptibilidad para los antifúngicos anfotericina B, itraconazol, posaconazol y voriconazol.

Cepas control	Anfotericina B ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Itraconazol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Posaconazol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Voriconazol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Paecilomyces variotti</i> ATCC MYA-3630	1-4	0.06-0.5	0.03-0.25	0.015-0.12
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	0.5-4.0	0.12-0.5	0.06-0.25	0.03-0.25

Se determinó el rango, media geométrica (MG), CMI_{50%} y CMI_{90%} de los resultados obtenidos con las pruebas de susceptibilidad.

4.3 Identificación molecular

4.3.1 Extracción del ADN

Para llevar a cabo la identificación molecular, los aislamientos clínicos del complejo *Sporothrix schenckii*, se sembraron en agar papa dextrosa y se incubaron durante 14 días a 30°C. Se hizo un raspado de colonias con un aplicador de madera estéril y la masa fúngica obtenida se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 2.0 mL. A cada tubo se le agregaron 200 µL de solución de lisis enzimática, se agitó en el vórtex por 30 segundos y se incubó en un termomixer durante 2 horas a 37°C, en agitación constante a 850 rpm. Posteriormente se agregaron 390 µL de TE 1X con SDS al 1% y 4 µL de proteinasa K, se agitó en el vórtex por 30 segundos y se incubó nuevamente en el termomixer durante 1 hora a 55°C, en agitación constante a 850 rpm. Se agregaron 100 µL de cloruro de sodio 5M, 80 µL de CTAB/NaCl, se agitó en el vórtex por 30 segundos y se incubó en el termomixer durante 10 minutos a 65°C, en agitación constante a 850 rpm. Después de la incubación, se agregaron 250 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), 250 µL de fenol saturado y 100 µL de TE 1X, se agitó en el vórtex por 30 segundos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 8 minutos. Se separó la fase acuosa y se agregaron nuevamente 250 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), 250 µL de fenol saturado y 100 µL de TE 1X, se agitó en el vórtex por 30 segundos y

se centrifugó a 14,000 rpm durante 8 minutos. A la fase acuosa obtenida, se le agregaron 300 μ L de alcohol isopropílico y 80 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.2 ± 2 y se incubó a -20°C durante 15 minutos. A la pastilla resultante, se le agregó 1 mL de alcohol etílico al 70% y se centrifugó durante 8 minutos a 14,000 rpm, posterior a la centrifugación se desechó el sobrenadante por decantación y se lavó la pastilla nuevamente con alcohol etílico. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y una vez seca, se resuspendió en 50 μ L de TE 1X, se incubó en un termomixer durante 15 minutos a 65°C , en agitación constante a 850 rpm.

Posteriormente se realizó la cuantificación del ADN obtenido en un espectrofotómetro y se verificó la calidad del ADN obtenido mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El ADN se almacenó en congelación a -20°C hasta su uso (20,21).

4.3.2 Amplificación del gen de calmodulina

Para amplificar el gen de calmodulina, se estandarizó una PCR de punto final utilizando los primers reportados por O' Donnell y colaboradores en el 2000, cuyas secuencias son: CL1 5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3' y CL2A 5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3' (22).

Las condiciones estandarizadas para la PCR fueron las siguientes: un ciclo de 3 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 50°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. La extensión final fue a 72°C por 5 minutos. Las condiciones estandarizadas de la mezcla de reacción de volumen final de 25 µL fueron los siguientes: 80 a 100 ng de ADN genómico, buffer 5 mM Tris HCl (pH: 8), 25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP's, 12.5 pmol CL1, 12.5 pmol CL2A y 1.5 U *Taq* polimerasa.

Posterior a la PCR, se verificó la calidad del producto obtenido mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El producto obtenido de la amplificación fue de aproximadamente 850 pares de bases (5,15).

4.3.3 Purificación de los productos de PCR

Los productos obtenidos de la PCR, fueron purificados utilizando la técnica de precipitación con alcohol etílico. A un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril, se le agregaron 5 µL de acetato de sodio 3M pH 4.6 y 100 µL de alcohol etílico al 95%. Se pipetearon los productos de PCR en la mezcla, se agitó en vórtex por 30 segundos y se incubaron a -20°C durante 30 o 40 minutos. Se centrifugaron los tubos durante 20 minutos a 14,000 rpm. Se aspiró con una micropipeta el sobrenadante, el cual se descartó y

la pastilla obtenida se lavó con 300 μ L de alcohol etílico al 70%, se agitó en vórtex y se centrifugó en frío durante 10 minutos a 14,000 rpm, se separó el sobrenadante y se descartó. El sedimento se secó a vacío por 3 minutos sin sobresecar. Posteriormente se resuspendió en 50 μ L de TE 1X, y se verificó la calidad del producto purificado mediante una electroforesis en gel de agarosa 1.5% (5,15).

Los productos de la PCR purificados, se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Posteriormente se realizó el alineamiento de secuencias nucleotídicas y se compararon con las secuencias depositadas en el Gen Bank, tomando en cuenta solo secuencias que contaran con respaldo de estudios fenotípicos.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

Los resultados de los estudios de la morfología a nivel macroscópico y microscópico de los aislamientos reportados previamente como *Sporothrix schenckii* se muestran en las tablas 3, 4 y 5. En los resultados de la morfología a nivel macroscópico se muestran el número de aislamientos y las características que presentan para los parámetros de color, textura y topografía colonial. Los resultados de la descripción de la morfología microscópica, se muestran en comparación con los datos reportados, para las especies del complejo *Sporothrix schenckii*, de la medición del diámetro, la descripción de la forma y la pigmentación de las conidias sésiles (5).

En las tablas 6 y 7, se muestran los resultados de las pruebas de asimilación de carbohidratos. Los resultados se muestran en comparación con los datos reportados, de asimilación de los carbohidratos sacarosa y rafinosa, para las especies del complejo *Sporothrix schenckii* (5); así como los patrones de asimilación que se presentaron para los carbohidratos arabinosa, galactosa, lactosa, sacarosa y rafinosa.

Los resultados obtenidos de las pruebas de termotolerancia, se muestran en la tabla 8, los datos se presentan en comparación con los valores reportados, de crecimiento a 30°C, 35°C y 37°C, para las especies del complejo *Sporothrix schenckii* (5).

En la tabla 9, se muestran los resultados de la caracterización fenotípica, de acuerdo a los datos obtenidos en los estudios morfológicos y fisiológicos y en comparación con los valores reportados para las especies del complejo *Sporothrix schenckii* (5).

En la tabla 10, se muestran los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, por el método de macrodilución, para los 34 aislamientos clínicos del complejo *Sporothrix schenckii*. Los datos están presentados como rango, media geométrica, y CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$), necesarios

para inhibir el 50% y 90% de los aislamientos del complejo *Sporothrix schenckii* ensayados.

Los resultados de la identificación genotípica, y su comparación con los datos obtenidos de la caracterización fenotípica, se muestran en la tabla 11.

Tabla 3. Características de color, textura y topografía colonial de 34 aislamientos del complejo *Sporothrix schenckii* cultivados en agar papa dextrosa incubados durante 21 días a 30°C.

Característica	Descripción	Número de aislamientos
Color	Kaki	21
	Negro	6
	Blanco	3
	Gris	3
	Salmón	1
Textura	Cérea	34
Topografía	Rugosa	23
	Lisa	9
	Verrucosa	2

Tabla 4. Características de forma y tamaño de las conidias sésiles reportadas para las especies del complejo y de los 34 aislamientos del complejo *Sporothrix schenckii* ensayados.

Especie del complejo	Forma/Tamaño	Número de aislamientos
<i>S. brasiliensis</i>	Globosa/ 2.5 - 5 µm 2 - 3 µm	2
<i>S. globosa</i>	Globosa / 3 - 4 µm 2 - 3.5 µm	3
<i>S. albicans</i>	Ovoide / 2 - 6 µm 2 - 3.5 µm	0
<i>S. mexicana</i>	Ovoide / 3 - 4 µm 2 - 3.5 µm	0
<i>S. schenckii</i>	Triangular / 2 - 6 µm 2 - 3.5 µm	31

Tabla 5. Características de pigmentación reportada para las especies del complejo y de los 34 aislamientos del complejo *Sporothrix schenckii* evaluados.

Especie del complejo	Pigmento	Número de aislamientos
<i>S. albicans</i>	Ausencia	0
<i>S. brasiliensis</i>	Presencia	34
<i>S. globosa</i>	Presencia	34
<i>S. mexicana</i>	Presencia	34
<i>S. schenckii</i>	Presencia	34

Tabla 6. Asimilación de sacarosa y rafinosa, reportados para las especies del complejo y de los 34 aislamientos del complejo *Sporothrix schenckii* ensayados.

Especie del complejo	Sacarosa	Rafinosa	Número de aislamientos
<i>S. albicans</i>	+	-	3
<i>S. brasiliensis</i>	-	-	0
<i>S. globosa</i>	+	-	3
<i>S. mexicana</i>	+	+	31
<i>S. schenckii</i>	+	+	31

Tabla 7. Asimilación de arabinosa, galactosa, lactosa, sacarosa y rafinosa en los 34 aislamientos del complejo *Sporothrix schenckii*.

Sacarosa	Rafinosa	Arabinosa	Galactosa	Lactosa	Número de aislamientos
+	+	-	-	-	10
+	+	-	+	+	8
+	+	-	+	-	7
+	+	+	-	+	3
+	+	+	+	-	3
+	-	+	+	-	3

Tabla 8. Diámetros de las colonias, en agar papa dextrosa a los 21 días, reportados para las especies del complejo y de 34 aislamientos del complejo *S. schenckii* ensayados.

Especies del complejo	Crecimiento en mm			Número de aislamientos
	30°C	35°C	37°C	
<i>S. albicans</i>	67±4.2	28±1.4	4.2±1.4	0
<i>S. brasiliensis</i>	24.7±5.5	16.6±5.9	7.6 ±1.6	0
<i>S. globosa</i>	30.9±5.0	11.5±5.3	-----	3
<i>S. mexicana</i>	67.5±2.1	10.8±0.4	1.8±0.4	0
<i>S. schenckii</i>	36.0±5.5	21.3±7.0	6.1±3.0	31

Tabla 9. Identificación fenotípica de los 34 aislamientos del complejo

Sporothrix schenckii, mediante estudios morfológicos y fisiológicos.

Forma/ Tamaño de conidias sésiles	Crecimiento 37°C	Asimilación de carbohidratos		Número de aislamientos	Identificación fenotípica
		Sacarosa	Rafinosa		
Triangular/ 2 - 6 µm 2 - 3.5 µm	Sí	+	+	31	<i>S. schenckii</i>
Globosa/ 3 - 4 µm 2 - 3.5 µm	No	+	-	3	<i>S. globosa</i>

Tabla 10. Actividad antifúngica *in vitro* de anfotericina B, itraconazol, posaconazol y voriconazol en contra de los 34 aislamientos del complejo *S. schenckii*.

Hongo (n)	Antifúngico	CMI (µg/mL)			
		Rango	MG	50%	90%
<i>S. schenckii</i> (31)	AMB	0.5- 4	2.57	4	4
	ITR	1-8	4	4	8
	PSC	0.5-8	1.75	1	8
	VRC	2-16	10.4	16	16
<i>S. globosa</i> (3)	AMB	2-8	4.2	---	---
	ITR	1-16	8.33	---	---
	PSC	1-16	3.13	---	---
	VRC	8-16	12.2	---	---

^aMedia geométrica.

^b CMI en cual el 50% de los aislamientos fueron inhibidos.

^c CMI en el cual el 90% de los aislamientos fueron inhibidos.

Tabla 11. Comparación de resultados de la identificación fenotípica y molecular de los 34 aislamientos del complejo *S. schenckii* estudiados.

Número de aislamientos	Identificación fenotípica	Identificación molecular (> 98% de homología)
31	<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>
3	<i>S. globosa</i>	<i>S. schenckii</i>

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

La esporotricosis, una de las micosis subcutáneas más frecuentemente reportadas en México (1,2,3,10), se atribuía a *Sporothrix schenckii*, como único agente causal. Sin embargo, en el 2007, se describieron 3 nuevas especies: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* y *Sporothrix mexicana* y que

junto con las especies descritas anteriormente, *Sporothrix albicans* y *Sporothrix schenckii*, integran actualmente el complejo *Sporothrix schenckii* (5). Recientemente, se han hecho descripciones de nuevas especies en algunos otros hongos patógenos, como ejemplo, *Pneumocystis carinii* (23), *Coccidioides immitis* (24), *Candida parapsilosis* (25) y *Pseudallescheria boydii* (26).

En el caso del complejo *Sporothrix schenckii*, cabe señalar, existen pocos estudios que le den soporte a las diferencias fenotípicas y genotípicas descritas para cada una de las nuevas especies (5). En el presente estudio, se encontraron discrepancias en la identificación fenotípica y genotípica de 3 de aislamientos, los cuales coincidían con las características fenotípicas descritas para *Sporothrix globosa*. Sin embargo, la identificación genotípica mostró una homología superior al 99% con *Sporothrix schenckii*.

Los 3 aislamientos que mostraron discrepancia en la identificación, presentaban conidias sésiles de forma globosa, coincidiendo con lo reportado para *Sporothrix globosa*. Cabe destacar, que dentro de la especie *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto*) se han reportado diferencias en la forma de las conidias sésiles, la cual está descrita como de forma triangular a cuneiforme. La medida de las conidias sésiles de estos aislamientos

ensayados, concuerdan con las medidas reportadas, tanto para *Sporothrix globosa*, como para *Sporothrix schenckii* (5).

En las pruebas de asimilación de carbohidratos, los 3 aislamientos que fueron identificados fenotípicamente como *Sporothrix globosa*, fueron capaces de asimilar la sacarosa, pero no la rafinosa. La rafinosa es el carbohidrato que permite, diferenciar a *Sporothrix globosa* de *Sporothrix schenckii*, ya que esta última es capaz de asimilarla (5).

Otra de las pruebas que permite diferenciar algunas de las especies del complejo *Sporothrix schenckii*, es el crecimiento a 37°C, ya que se ha descrito, que *Sporothrix globosa* es la única especie del complejo, incapaz de crecer a esta temperatura. Los 3 aislamientos ensayados en el presente estudio, no presentaron crecimiento a 37°C. Oliveira y colaboradores (27), reportaron el primer caso de esporotricosis, causada por *Sporothrix globosa* en Brasil, en este caso, el aislamiento presentó un crecimiento superior a los 7 mm, después de 21 días de incubación a 37°C, siendo la medida de crecimiento mayor a la esperada incluso, para la especie del complejo que tiene el mayor crecimiento a esta temperatura, la cual es *Sporothrix brasiliensis* (5).

Las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos: anfotericina B, itraconazol, posaconazol y voriconazol, mostraron valores similares tanto para los aislamientos ensayados que fenotípicamente fueron identificados como *Sporothrix schenckii*, como para los identificados fenotípicamente como *Sporothrix globosa*. Los resultados de CMI's obtenidos para itraconazol, muestran una baja actividad antifúngica *in vitro*, contra los 34 aislamientos ensayados, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (28,29,30). Sin embargo, se ha demostrado la eficacia del itraconazol, en el escenario clínico. Conti Díaz y colaboradores (31) trataron satisfactoriamente a 18 pacientes con esporotricosis cutánea con itraconazol. Incluso se ha reportado como tratamiento efectivo en casos de esporotricosis osteoarticular (1,30).

Los antifúngicos anfotericina B, posaconazol y voriconazol, presentaron CMI's altas, sin embargo, de los antifúngicos mencionados, el posaconazol fue el antifúngico que presentó una mejor actividad en contra de los 34 aislamientos. El posaconazol, se ha convertido en una alternativa terapéutica, en los casos de esporotricosis sistémica, debido a los resultados que ha mostrado en las pruebas *in vitro*, sin embargo, es necesario que se realicen más estudios *in vivo*, para confirmar su actividad antifúngica.

Es importante mencionar, que los patrones de susceptibilidad obtenidos en éste estudio, no muestran diferencias significativas, entre los aislamientos identificados fenotípicamente como *Sporothrix schenckii*, como para los identificados como *Sporothrix globosa*.

Ante los escasos reportes de caracterizaciones fenotípicas y genotípicas de aislamientos del complejo *Sporothrix schenckii* y al no existir cepas ATCC de las nuevas especies del complejo, e incluso las diferencias encontradas en éste y otros estudios, sugieren la necesidad de evaluar las características fenotípicas propuestas para la diferenciación de las especies del complejo, así como incluir nuevas pruebas fenotípicas que, puedan ser útiles para hacer la diferenciación entre especies, sin hacer uso de técnicas moleculares. Incluso la búsqueda de nuevos marcadores moleculares, que permitan hacer la discriminación entre especies, podría brindar una mayor información en el comportamiento de aislamientos que presenten características fenotípicas que no concuerden con su identificación molecular, ya que estos aislamientos atípicos, podrían representar variantes de estas especies. Es importante destacar, que en el caso de la especie *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto*), se han reportado 2 grupos, los cuales presentan diferencias en el color de las colonias, forma de conidias, asimilación del ribitol, así como diferencias en las secuencias del gen de

calmodulina, el cual es empleado para la discriminación de las especies de este complejo (5).

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

1. La identificación fenotípica y molecular de los 34 aislamientos evaluados en este estudio presentaron discrepancias en 3 aislamientos.

2. En base a la identificación molecular, el 100% de los aislamientos corresponde a *Sporothrix schenckii*.

3. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se demostró que para la identificación precisa de especie del complejo *Sporothrix schenckii*, se requieren estudios adicionales a los realizados rutinariamente en los laboratorios clínicos.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

- 1.- Arenas R. Esporotricosis en: Micología médica ilustrada. 2nda Edición. México. Mc Graw Hill Interamericana. 2003; 129-38.
- 2.- Bonifaz A. Esporotricosis en: Micología médica básica. 2da. Edición. México. Méndez Editores. 2000; 185-206.
- 3.- Arenas R. Esporotricosis en: Atlas de dermatología diagnóstico y tratamiento. 3era Edición. México. Mc Graw Hill Interamericana. 2005; 416-21.
- 4.- de Beer, Z. W., T. C. Harrington, H. F. Vismer, B. D. Wingfield, and M. J. Wingfield. 2003. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* 95:434–441.
- 5.- Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix*

brasiliensis, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical

interest. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3198–206.

6.- Bastos M, Oliveira A, Gallardo MC, Schubach T y cols. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol.* 2003; 42(9):677-81.

7.- Mayorga JA, Barba J, Muñoz VF, Rangel A, Garcia A, Magaña I. Esporotricosis en el estado de Jalisco, estudio clínico-epidemiológico (1960-1996). *Dermatología Rev. Mex.* 1997; 41(3):105-8.

8.- Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Ann Brazil Acad Sciences* 2006; 78: 293-308.

9.- Barros MBL, Schubach A, Francesconi-Dovalle AC, Gutierrez Galhardo MC, Conceição-Silva F, Schubach TMP, Reis RS, Marzochi KBF, Wanke B, Conceição MJ. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic

in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 529-535.

10.- Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Inf Dis* 1999; 29: 231-237.

11.- Gezuele E, Da Rosa D. Relevancia del cuerpo asteroide esporotricósico en el diagnóstico rápido de la esporotricosis. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 147-150.

12.- Kaufman CA, Hajjeh R, Chapman SW. Practice guidelines for the management on patients with sporotrichosis. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 684-687.

13.- Ishizaki, H., M. Kawasaki, M. Aoki, T. Matsumoto, A. A. Padhye, M. Mendoza, and R. Negroni. 1998. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathologia*, 142:115–118.

14.- Mesa-Arango, A. C., M. R. Reyes-Montes, A. Pérez-Mejía, H. Navarro- Barranco, V. Souza, G. Zuñiga, and C. Toriello. 2002. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to

geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* 40:3004–3011.

15.- Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazera M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:3251–6.

16.- Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:732–4.

17.- Madrid H, Cano J, Gené J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26(3): 218–22.

18.- Espinel-Ingroff, A, Mc Ginnis, M.R., Pincus, D.H., Goldson, P.R. and T.M. Kerkering. 1989. Evaluation of the API 20C yeast identification system for the differentiation of some dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:2565-2569.

19.- Clinical Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

20.- Cullings, K.W. 1992. Design and testing of testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1:233-240.

21.- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of the fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.

22.- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 2000; 41:61–78.

23.- Beard, C. B., J. L. Carter, S. P. Keely, L. Huang, N. J. Pieniazek, I. N. Moura, J. M. Roberts, A. W. Hightower, M. S. Bens, A. R. Freeman, S. Lee, J. R. Stringer, J. S. Duchin, C. del Rio, D. Rimland, R. P. Baughman, D. A. Levy, V. J. Dietz, P. Simon, and T. R. Navin. 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 6:265–272.

24.- Koufopanou, V., A. Burt, T. Szaro, and J. W. Taylor. 2001. Gene genealogies, cryptic species and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol. Biol. Evol.* 18:1246–1258.

25.- Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. R. Gow, and M. C. J. Maiden. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* 43:284–292.

26.- Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* 43:4930–4942.

27.- de Oliveira, M.M.E., de Almeida-Paes, R., de Medeiros Muniz, M., de Lima Barros, M.B., Gutierrez Galhardo, M.C. and M. Zancope-Oliveira. 2010. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia*; 169: 359-363.

28.- Johnson, E. M., A. Szekely, and D. W. Warnock. 1998. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:741–745.

29.- McGinnis, M. R., N. Nordoff, R. K. Li, L. Pasarell, and D. W. Warnock. 2001.

Sporothrix schenckii sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med. Mycol.* 39:369–371.

30.- Trilles, L., B. Fernández-Torres, M. Dos Santos Lazera, B. Wanke, A. de Oliveira Schubach, R. de Almeida Paes, I. Inza, and J. Guarro. 2005. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3952–3954.

31.- Conti Diaz, I. A., E. Civila, and E. Gezuele. 1992. Treatment of human cutaneous sporotrichosis with itraconazole. *Mycoses* 35:153–156.