

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



“DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS CLÍNICAS DE *Sporothrix schenckii* PROCEDENTES DE LA MICOTECA DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, PERIODO 2000-2015”

Presentada por:

LIZBETH SALLY VILCA MACHACA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Lima – Perú

2022

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS CLÍNICAS DE *Sporothrix
schenckii* PROCEDENTES DE LA MICOTECA DEL INSTITUTO
NACIONAL DE SALUD, PERIODO 2000-2015”**

Presentada por:

LIZBETH SALLY VILCA MACHACA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila
PRESIDENTE

Mg. Sc. César Fernando López Bonilla
MIEMBRO

Blgo. Roberto Raúl Ramos Chaupín
MIEMBRO

Blgo. Juan Gabriel Juscamaita Morales
ASESOR

Dra. Susana Rosa Zurita Macalupú
Co Asesora

DEDICATORIA

*A mi mamá, a mis hermanas y a mi esposo,
por brindarme su apoyo incondicional,
comprensión, motivación
y ser mi soporte en todo momento.*

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a la Blga. Flor Urcia y a la Téc. Lab. Alida Navarro por toda su ayuda y por brindarme su valiosa amistad, mil gracias.

A la Dra. Susana Zurita, mi co-patrocinadora externa, por los valiosos comentarios y por permitirme desarrollar esta tesis en el Laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Salud.

Al Blgo. Nyshon Rojas del Laboratorio de Leishmania – Instituto Nacional de Salud, por sus valiosos comentarios y apoyo en la parte técnica.

Te agradezco Dios, por tu amor y bondad que no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta que son lecciones de vida para mejorar y crecer como ser humano.

Gracias por ser mi luz y guiar mis pasos día a día.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. La esporotricosis	3
2.1.1. Manifestaciones clínicas	3
2.2. Esporotricosis en el Perú: Epidemiología y factores de riesgo	4
2.3. <i>Sporothrix spp.</i>	7
2.3.1. Clasificación taxonómica: Beer <i>et al.</i> (2016)	8
2.4. Características macroscópicas y microscópicas	8
2.5. Factores de virulencia del complejo <i>Sporothrix schenckii</i>	11
2.5.1. Termotolerancia y dimorfismo	12
2.5.2. Melanina.....	14
2.5.3. Producción de gelatinasas	15
2.5.4. Producción y secreción de ureasa	16
2.6. Marcadores de ADN: Técnicas basadas en PCR.....	17
2.7. Análisis de agrupamiento mediante taxonomía numérica.....	18
2.7.1. Matriz básica de datos (MBD) y coeficientes de similitud	18
2.7.2. Método de agrupamiento UPGMA y representación gráfica	20
2.7.3. Coeficiente de correlación cofenética (r)	20
2.7.4. Análisis de variancia molecular (AMOVA).....	21
2.8. Diversidad genética de <i>Sporothrix schenckii</i>	21
2.8.1. Antecedentes de estudios de diversidad genética mediante técnicas basadas en la PCR.....	22
2.8.2. Estudios nacionales	24
III. METODOLOGÍA	26
3.1. Materiales	26
3.1.1. Lugar de ejecución.....	26

3.1.2. Material biológico: cepas de <i>Sporothrix schenckii</i>	26
3.1.3. Materiales de uso rutinario	27
3.1.4. Medios de cultivo.....	27
3.1.5. Reactivos	28
3.1.6. Equipos.....	29
3.2. Métodos.....	29
3.2.1. Reactivación y recuperación de cepas clínicas de <i>S. schenckii</i>	29
3.2.2. Control de calidad	30
3.2.3. Extracción de ADN genómico.....	33
3.2.4. Verificación de la calidad del ADN.....	34
3.2.5. Condiciones RAPD-PCR	36
3.2.6. Análisis del polimorfismo RAPD	37
3.2.7. Análisis de agrupamiento	38
3.2.8. Análisis estadístico: AMOVA	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. Reactivación y recuperación de cepas clínicas de <i>S. schenckii</i>	40
4.2. Control de calidad	41
4.2.1. Microscopía	41
4.2.2. Ensayo de termotolerancia y dimorfismo.....	44
4.2.3. Producción de melanina	46
4.2.4. Producción de gelatinasas	49
4.2.5. Actividad ureasa	52
4.3. Extracción de ADN genómico.....	53
4.4. Verificación de la calidad de ADN	54
4.5. Análisis de polimorfismo RAPD	55
4.6. Análisis de agrupamiento	58
4.7. Análisis de estructura genética poblacional (AMOVA)	62
V. CONCLUSIONES	65
VI. RECOMENDACIONES	66
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	67
VIII. ANEXOS	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Primers</i> utilizados en el estudio	36
Tabla 2: Variables estadísticas del análisis AMOVA.....	39
Tabla 3: Resultados de la recuperación de cepas reactivadas de Apurímac y Cajamarca.....	41
Tabla 4: Resumen de la morfología de las conidias según origen.....	42
Tabla 5: Resumen de la disposición de conidias según origen	42
Tabla 6: Resumen de medidas promedio (μm^2) del área conidial	43
Tabla 7: Resultados del ensayo de producción de melanina según pigmentación de cepas de Apurímac y Cajamarca.....	46
Tabla 8: Resumen de ensayo de licuefacción de la gelatina	50
Tabla 9: Cepas de <i>S. schenckii</i> gelatinasa positiva	51
Tabla 10: Parámetros de descripción de los <i>primers</i> utilizados	56
Tabla 11: Resumen del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los aislados de <i>Sporothrix schenckii</i>	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la esporotricosis y otras micosis subcutáneas de acuerdo a su incidencia y prevalencia a nivel nacional.....	6
Figura 2: Morfología macroscópica de <i>Sporothrix</i> spp. A) Cultivo de la fase micelial en APD a 25°C. B) Cultivo de la fase levaduriforme en agar BHI a 37°C	9
Figura 3: Microscopía de <i>S. schenckii</i>	10
Figura 4: Morfología de las conidias del complejo <i>Sporothrix schenckii</i>	10
Figura 5: Forma asexual de representantes del orden Ophiostomatales.....	11
Figura 6: Estresores medioambientales que promueven la virulencia de <i>S. schenckii</i>	12
Figura 7: Tinción Gram de <i>S. schenckii</i>	13
Figura 8: Producción de melanina	15
Figura 9: Conservación de cepas de <i>S. schenckii</i> por el método de Castellani	27
Figura 10: Morfología microscópica de las conidias A) globosa, B) triangulares, C) elongadas y D) subglobosas. Tinción con azul de lactofenol. Microscopio óptico G.A. 1000X.....	42
Figura 11: Medidas promedio (μm^2) del área conidial de las cepas según origen.	43
Figura 12: Cultivos de <i>S. schenckii</i> en medio agar infusión cerebro corazón BHI 30 días de incubación a 37°C.	44
Figura 13: Subcultivos de la fase levaduriforme en agar infusión cerebro corazón suplementado con sangre de carnero al 10%, quinto repique con 7 días de incubación a 37°C.....	45
Figura 14: Microscopía de levaduras de <i>S. schenckii</i> . Tinción con azul de lactofenol. Microscopio óptico G.A. 1000X.....	45
Figura 15: Grado de pigmentación y origen geográfico	47
Figura 16: Colonias albinas (-) de <i>S. schenckii</i> en agar corn meal, incubadas 30.....	48

Figura 17: Colonias de <i>S. schenckii</i> con pigmentación marrón pálido (+), en agar corn meal, incubadas 30 días a temperatura ambiente. A. anverso. B. reverso	48
Figura 18: Colonias de <i>S. schenckii</i> con pigmentación marrón oscuro (++), en agar corn meal, incubadas 30 días a temperatura ambiente. A. anverso. B. reverso	49
Figura 19: Colonias de <i>S. schenckii</i> con pigmentación negra (+++), en agar corn meal, incubadas 30 días a temperatura ambiente. A) anverso. B) reverso	49
Figura 20: Gelatinasa positiva: Control positivo <i>Nocardia</i> S/C e INS-01-06803-11.....	50
Figura 21: Gelatinasa negativa: Cepa control 10-10198-09 y 05-07166-11	50
Figura 22: Ensayo de la ureasa en medio agar urea de Christensen con inóculos de las cepas en estudio, con dos días de incubación a 37°C.	52
Figura 23: Ensayo de la ureasa en medio agar urea de Christensen con inóculos de las cepas en estudio, con siete días de incubación a 37°C.....	52
Figura 24: Integridad del ADN extraído. Geles de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio	55
Figura 25: Patrón de marcadores RAPD con el primer OPBG-01 de 18 cepas de <i>Sporothrix schenckii</i> de acuerdo al Anexo 1. Las flechas indican bandas polimórficas, (MP) es el marcador de peso molecular 100 pb.	57
Figura 26: Patrón de marcadores RAPD con el primer OPBG-14 de 16 cepas de <i>S. schenckii</i> . Las flechas indican bandas polimórficas. (C+) Control positivo <i>S. schenckii</i> 10-10198-09. (C-) control negativo <i>Aspergillus</i> sp. INS-05-00991-15. (B) blanco. (MP) marcador de peso molecular 100 pb.....	57
Figura 27: Dendograma generado por análisis UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard de perfiles RAPD obtenidos de aislados de <i>S. schenckii</i>	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Información de origen de las cepas	84
Anexo 2: Características microscópicas de las cepas evaluadas	90
Anexo 3: Producción de melanina	92
Anexo 4: Galería fotográfica del ensayo de pigmentación de la melanina	95
Anexo 5: Resultados del ensayo de producción de enzimas gelatinasas	96
Anexo 6: Producción de ureasa	98
Anexo 7: Galería fotográfica del ensayo de producción de ureasa	100
Anexo 8: Cuantificación y pureza del ADN extraído	101
Anexo 9: Matriz básica de datos de presencia y ausencia (Parte 1)	103
Anexo 10: Matriz de similaridad en base al Coeficiente de Jaccard	105
Anexo 11: Coeficiente de correlación cofenética	107
Anexo 12: Preparación de medios de cultivo	108
Anexo 13: Preparación de reactivos	115

RESUMEN

Se evaluó 87 cepas de *Sporothrix schenckii* procedentes de dos zonas hiperendémicas de esporotricosis: Cajamarca y Apurímac mediante RAPD-PCR, utilizando cuatro *primers* OPBG-1, OPBG-14, OPBG-19 y OPD-18. De los cuales el primer OPBG-1 resultó más informativo. La utilización de estos marcadores permitió detectar un alto porcentaje de polimorfismo entre 86.7% y 100%, indicando un alto nivel de variación genética existente entre los individuos analizados. El análisis de agrupamiento revela que a bajo porcentaje de similitud se forma el Grupo I y II. El Grupo I se divide en tres genotipos, correspondientes a subgrupo I.1, I.2 y I.3, además se diferencian cinco aislados con genotipos únicos. El Grupo II se divide en dos genotipos, correspondientes al subgrupo II.1 y II.2, en donde también se distinguen dos aislados únicos. El coeficiente de correlación cofenética indica un buen ajuste y una baja distorsión entre la matriz de similitud y la matriz cofenética que dio origen al dendograma. Además, indica que el método de agrupamiento UPGMA es el adecuado para los datos. La hipótesis de que las poblaciones de *Sporothrix schenckii* se encuentren genéticamente estructuradas por origen geográfico (Cajamarca y Apurímac) no fue apoyada por el AMOVA, ya que los resultados indican que la variabilidad genética de estos aislados se debe al componente individual mas no a la variación interpoblacional.

Palabras clave: *Sporothrix schenckii*, diversidad genética, RAPD-PCR, AMOVA

ABSTRACT

Eighty-seven *Sporothrix schenckii* strains from two hyperendemic sporotrichosis areas: Cajamarca and Apurímac were evaluated by RAPD-PCR, using four *primers* OPBG-1, OPBG-14, OPBG-19, and OPD-18. OPBG-1 was more informative. The use of these markers allowed the detection of a high percentage of polymorphism between 86.7% and 100%, indicating a high level of genetic variation existing among the analyzed individuals. Clustering analysis reveals that at a low percentage of similarity, Group I and II are formed. Group I is divided into three genotypes, corresponding to subgroups I.1, I.2, and I.3, in addition, five isolates with unique genotypes are differentiated. Group II is divided into two genotypes, corresponding to subgroup II.1 and II.2, where two unique isolates are also distinguished. The cophenetic correlation coefficient indicates a good fit and a low distortion between the similarity matrix and the cophenetic matrix that gave rise to the dendrogram. In addition, indicates that the UPGMA clustering method is appropriate for the data. The hypothesis that the populations of *Sporothrix schenckii* are genetically structured by geographic origin (Cajamarca and Apurímac) was not supported by the AMOVA, since the results indicate that the genetic variability of these isolates is due to the individual component but not to the variation interpopulation.

Keywords: *Sporothrix schenckii*, genetic diversity, RAPD-PCR, AMOVA

I. INTRODUCCIÓN

La esporotricosis es una enfermedad fúngica subcutánea crónica y con alto índice de recidiva, es de amplia distribución mundial y se reconoce diversos focos endémicos: USA, Canadá, Europa, Asia, Europa y Australia. En Latinoamérica la encontramos en Colombia, México, Perú, Venezuela, Uruguay y principalmente en Brasil.

Los resultados de investigaciones epidemiológicas de esporotricosis sugieren que es la micosis subcutánea de mayor importancia en la sierra del Perú, siendo dos importantes áreas endémicas: Cajamarca y Apurímac (Oyarce *et al.*, 2016 y Pappas *et al.*, 2000). La provincia de Abancay, capital de Apurímac, es una zona hiperendémica de esporotricosis (Ramírez-Soto, 2015) debido a la alta incidencia anual que presenta (98 casos por cada 100 000 habitantes) y donde la infección se asocia principalmente al factor socioeconómico (Lyon *et al.*, 2003).

Durante muchas décadas la esporotricosis era atribuida a una única especie: *Sporothrix schenckii*, sin embargo, las diferencias basadas en la morfología microscópica de las conidias y en las características de los cultivos, motivaron que se realicen estudios utilizando marcadores moleculares para describir la diversidad genética de este hongo. Los resultados indicaron alta diversidad genética y la presencia de diversos genotipos que se agrupaban de acuerdo a diversos orígenes geográficos (Mesa-Arango *et al.*, 2002); a la forma clínica (Kong *et al.*, 2006), susceptibilidad antifúngica (Oliveira *et al.*, 2011, Espinel-Ingroff *et al.*, 2017) y virulencia (Fernandes *et al.*, 2013; Della Terra *et al.*, 2017).

En el 2006 y 2007, en Brasil, Marimon y colaboradores mediante el secuenciamiento de regiones de genes, describieron que en realidad se trata del complejo *Sporothrix* conformado por las especies de importancia clínica: *S. schenckii* (*sensu stricto*); *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. luriei*. Debido a que es una enfermedad emergente, actualmente se realizan estudios sobre la identificación de genotipos circulantes, el estudio de la epidemiología molecular y la estructura poblacional de este hongo.

En el Perú, aún se considera a *Sporothrix schenckii* como único agente causal de esporotricosis, basado en las características del cultivo y en las referencias previas (Marimon

et al., 2007). Además del estudio reciente donde se realizó el secuenciamiento del gen parcial de la calmodulina de seis cepas procedentes de Abancay-Apurímac y se clasificaron como *S. schenckii sensu stricto* (Ramírez-Soto *et al.*, 2021). Sin embargo, existen diferencias fenotípicas que incluyen: morfología microscópica de las conidias y pigmentación de los cultivos de *Sporothrix schenckii* procedentes de Apurímac y Cajamarca (Datos del Instituto Nacional de Salud), lo cual indicaría que en el Perú circula más de un genotipo de este hongo patógeno e incluso la posibilidad de encontrar más de una especie.

Dos investigaciones de diversidad genética y epidemiología molecular de *S. schenckii* realizados por Neyra *et. al.* en 2005 y Holechek *et. al.* en 2004 usando AFLP y RAPD respectivamente, coinciden en la existencia de la diversidad genética de este hongo y la dificultad de asociar los genotipos obtenidos con la procedencia geográfica y formas clínicas, debido probablemente a la reducida muestra utilizada. De tal manera, el conocimiento de la diversidad genética de *Sporothrix* en el país podría constituir un área activa de investigación y la base de estudios futuros sobre susceptibilidad antifúngica, de modo que diferentes genotipos podrían corresponderse con diferentes patrones de susceptibilidad, y los resultados ayudarían a desarrollar terapias eficaces, lo cual beneficiaría directamente a las poblaciones de alto riesgo de contraer la esporotricosis.

En este sentido, la micoteca del Laboratorio Referencial de Micología del Instituto Nacional de Salud pone a disposición su colección de 111 cepas de *Sporothrix schenckii* procedentes de dos importantes áreas endémicas de esporotricosis en el Perú: Cajamarca y Apurímac correspondientes al período: 2000-2015, con el objetivo principal de evaluar la diversidad genética mediante 1) la determinación del porcentaje de polimorfismo obtenido con marcadores RAPD, 2) identificación de genotipos circulantes, 3) determinación del coeficiente de correlación co-fenética y 4) determinación del porcentaje de variabilidad mediante AMOVA, buscando generar evidencia científica y un precedente para estudios futuros en beneficio de la salud pública.

Asimismo, la hipótesis de investigación es: En Cajamarca y Apurímac circulan diferentes genotipos de *Sporothrix schenckii* los cuales se corresponden con el origen geográfico evidenciando una estructuración genética poblacional lo cual será comprobado con el AMOVA.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. La esporotricosis

Es una micosis crónica, subcutánea y cosmopolita causada por las especies del complejo *Sporothrix schenckii*, con una alta prevalencia en áreas tropicales y subtropicales (Almeida-Paes *et al.*, 2015). En América Latina, es endémica en Brasil, Perú y Colombia (Schubach *et al.*, 2008; Ramírez-Soto y Málaga, 2017). También se reportan casos en México, India, China, Japón, USA, Sudáfrica (Barros *et al.*, 2011); Italia (Criseo *et al.*, 2008), Portugal (Oliveira *et al.*, 2014), Grecia (Xirotagaros *et al.*, 2014) y en Australia (Barros *et al.*, 2011), casos esporádicos de esporotricosis han sido reportados.

La infección ocurre generalmente a través de una inoculación traumática con tierra, plantas o material orgánico contaminado con el hongo (Kauffman *et al.*, 2007). La floricultura, agricultura, minería y explotación de la madera son actividades tradicionalmente asociadas con esta micosis (Carrada-Bravo y Olvera Macias, 2013). La transmisión zoonótica asociada a los arañazos y mordeduras de gatos también ha sido descrita en brotes importantes en Malaysia, USA y principalmente en Brasil; de tal modo que actualmente es un área activa de investigación (Gremião *et al.*, 2017).

2.1.1. Manifestaciones clínicas

La esporotricosis es una infección micótica crónica que progresa por vía cutánea y subcutánea y/o en infecciones profundas que involucran la vía linfática, tejido conectivo, músculo, cartílagos y huesos (Orofino-Costa *et al.*, 2017).

La esporotricosis cutánea fija, se presenta como un nódulo o placa localizada, a menudo con una apariencia granulomatosa o verrugosa, frecuentemente en la cara, el cuello, el tronco o las piernas (Mahlberg *et al.*, 2009). Las lesiones de la esporotricosis linfática, inicialmente tienen una apariencia papulonodular que progresan a lo largo de los canales linfangíticos después de algunas semanas. Más tarde, estos nódulos pueden ulcerarse, fistulizar y sanar, caracterizando un granuloma (Orofino-Costa *et al.*, 2017). La esporotricosis diseminada es inusual y ocurre en pacientes inmunosuprimidos, incluyendo pacientes con SIDA con bajos

niveles de CD4+, receptores de transplantes de órganos y aquellos que reciben quimioterapia, corticoesteroides puede presentarse en variedad de formas que incluye: cutánea diseminada, fungemia e infección visceral diseminada (Kauffman *et al.*, 2007).

2.2. Esporotricosis en el Perú: Epidemiología y factores de riesgo

En los estudios realizados a nivel nacional, diversos autores consideran la esporotricosis con un historial relacionado a la exposición ocupacional o recreativa en el campo; ya que el riesgo de adquirirla se incrementa significativamente con la duración de trabajo con la tierra, vegetales y contacto con gatos (García-Izquierdo *et al.*, 2004; Pappas *et al.*, 2000; Lyon *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2010).

Oyarce *et al.*, 2016, muestra un estudio descriptivo - epidemiológico para la esporotricosis, a partir de información retrospectiva de pacientes de una institución de referencia de enfermedades infecciosa y tropicales, en el cual entre los años 1991 y 2014, el mayor número de pacientes adquirió la enfermedad en los departamentos de Cajamarca (32%) y Apurímac (19%), lugares donde existen los niveles de pobreza extrema más altos del país y donde previamente ya han sido reportados casos con esta enfermedad (Pappas *et al.*, 2000; Lyon *et al.*, 2003; García-Izquierdo *et al.*, 2014).

Posteriormente, Ramírez-Soto y Málaga (2017), realizaron una revisión sistemática de literatura sobre casos de micosis subcutáneas en Perú, publicados desde 1965 hasta el 2015 (Figura 1), en tal sentido, hallaron que la más alta prevalencia de esporotricosis y el mayor número de casos reportados por año fue procedente de Apurímac (15 casos/100,000 habitantes; 57 casos/año), seguido por Cajamarca (3 casos/100,000 habitantes; 30 casos/año), Cusco (0.5 casos/100,000 habitantes; 4 casos/año), y La Libertad (0.2 casos/100,000 habitantes; 2 casos/año). En este sentido, hay evidencia suficiente para afirmar que Cajamarca y Apurímac son regiones endémicas de esporotricosis.

2.2.1 Zonas endémicas de esporotricosis: Cajamarca y Apurímac

La esporotricosis ha sido reportada en Cajamarca, en zonas cuya altitud varía entre 890 a 3129 m.s.n.m. y entre 4.9°C a 22 °C de temperatura (Galarza, 1996; SENAMHI). Cajamarca presenta niveles intermedios de humedad entre 63-69%, precipitación promedio anual es de 729.6 mm y en el mes de Agosto presenta altos niveles de radiación UV (SENAMHI). La flora predominante consta de eucaliptos, sauces, molles, árboles con espinas, cactus diversos y abundantes rosales en los jardines de las casas (García-Izquierdo *et al.*, 2004) lo cual

configura a Cajamarca como una zona propicia para que el suelo sea reservorio natural de *S. schenckii*.

Cajamarca es el departamento con incidencia de pobreza más alta del Perú, donde la tierra es el material predominante en los pisos, gran parte de las viviendas tiene paredes de adobe o tapia, madera, piedra con barro y quincha (INEI, 2019). Se identifican zonas de riesgo de esporotricosis, tanto en la zona urbana como en la zona rural, en donde las viviendas de los pacientes se encuentran ubicadas en calles, pasajes o callejones con hacinamiento con bajas condiciones de higiene, con plantas como rosales que fácilmente pueden ocasionar pinchazos y presencia intradomiciliaria de diversos animales: perros, gatos, aves, cuyes (García-Izquierdo *et al.*, 2001). Además, en la zona rural, gran parte de la población adulta labora en la agricultura (INEI, 2019), por ello, el contacto frecuente con la tierra y plantas originan una fuente inadvertida de infección para adultos y niños. (García Izquierdo *et al.*, 2004).

Desde el año 1996, se observó un incremento de pacientes que consultaban por esporotricosis en el Hospital Regional de Cajamarca (HRC); por ello García y colaboradores entre 2001 y 2004 realizaron dos estudios prospectivos-longitudinales: donde incluyeron a 85 pacientes con diagnóstico de esporotricosis, con una edad media de 24,33 años y a 82 pacientes niños menores de 14 años, con una edad promedio de 6,93 años. En tal sentido, García y colaboradores (2001), concluyen que Cajamarca es zona endémica de esporotricosis, probablemente por un cambio en el clima, humedad, periodicidad de lluvias y otros factores, que origina que el hongo se desarrolle fácilmente, esté cerca de la población y con ello se incremente el número de casos.

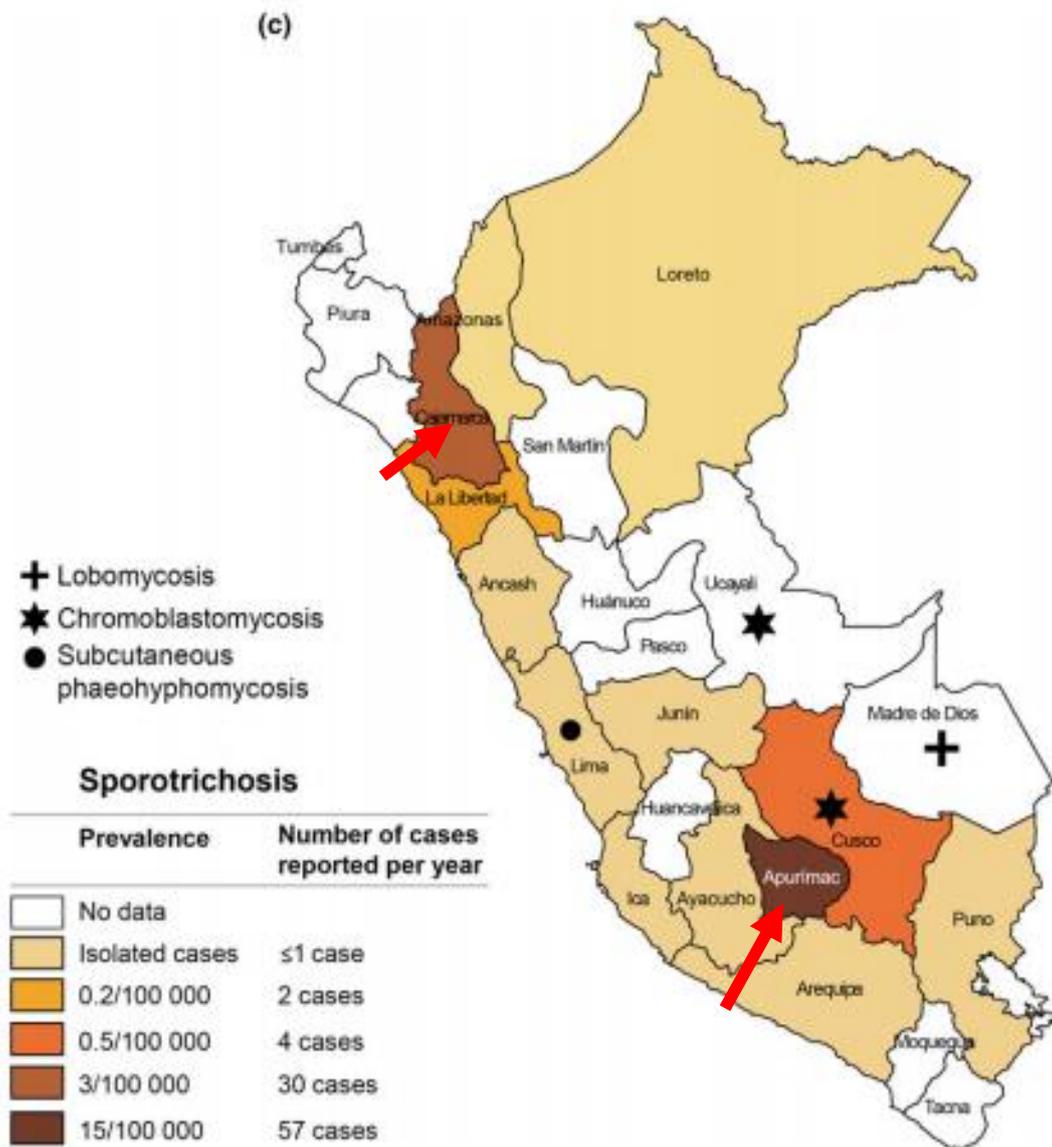


Figura 1. Distribución de la esporotrichosis y otras micosis subcutáneas de acuerdo a su incidencia y prevalencia a nivel nacional.

FUENTE: Ramírez-Soto y Málaga (2017).

Por otro lado, el departamento de Apurímac se ubica en la parte sur oriental del Perú y la mayoría de sus provincias están ubicadas a una altitud que van desde 2,000 y 4,500 m.s.n.m. En esta región hay niveles más altos de humedad entre 80-88% según INEI, periodos intensos de lluvias de 700 mm hasta 2142 mm de precipitación por año en las zonas con mayor altitud y presencia de heladas (SENAMHI). La temperatura promedio entre 9-17°C (datos de dos estaciones metereológicas) y presenta niveles altos de radiación UV (SENAMHI). Es uno de los departamentos con mayor tasa de pobreza y las viviendas al igual que en Cajamarca tienen paredes de material de adobe tanto en zonas urbanas y rurales, la tierra es el material predominante en los pisos; en más del 70% de hogares y la leña es el combustible utilizado en la cocina. En tanto, la actividad económica predominante en la

población rural es principalmente la agricultura de maíz, trigo, cebada, papa y frutales (INEI, 2019).

Las investigaciones previas sobre esporotricosis, realizadas en la provincia de Abancay, confirmaron la hiperendemicidad de la infección con una incidencia anual de 98 casos por 100 000 habitantes entre 1998-1999 (Lyon *et al.*, 2003) y de 48-60 casos por 100 000 habitantes entre 1995- 1997; asimismo, la incidencia en niños menores de 14 años ascendía aproximadamente al 60% (Pappas *et al.*, 2000).

En el estudio de Ramírez-Soto y Málaga (2017), señala que entre los años 1965-2015, a nivel de departamento de Apurímac, la prevalencia promedio de esporotricosis entre niños menores de 15 años fue de 22.5 casos por 100,00 habitantes (33 casos/año) y 6 casos por 100,00 habitantes mayores o iguales a 15 años (21 casos /año). En tal sentido, la prevalencia de esporotricosis fue aproximadamente 5 veces mayor en los niños de Apurímac comparado con los niños de Cajamarca.

2.3. *Sporothrix* spp.

Es un hongo saprófito común del suelo, madera en descomposición, heno y musgo *Sphagnum*. Es endémico en áreas tropicales y subtropicales; y es ampliamente conocido como el agente etiológico de la esporotricosis (Romeo y Criseo, 2013). Durante más de un siglo se le ha considerado como el único agente etiológico de la esporotricosis, sin embargo, en el 2007, Marimon *et al.* describieron que en realidad la enfermedad es causada por varias especies crípticas patógenas que conformaban el complejo *Sporothrix schenckii*: *S. schenckii* (*S. schenckii sensu stricto*), *S. globosa*, *S. brasiliensis* y *S. mexicana*; y un año después, Marimon *et al.* (2008) presentan a una especie más: *S. luriei*. En el 2016, Beer y colaboradores publicaron el estudio “The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship”, donde sugieren una clasificación taxonómica para las especies de importancia médica, basada en estudios filogenéticos y de secuenciamiento.

2.3.1. Clasificación taxonómica: Beer *et al.* (2016)

Reino - Fungi

División - Ascomycota

Clase – Sordariomycetes

Subclase - Sordariomycetidae

Orden - Ophiostomatales

Familia - Ophiostomaceae

Genero - *Sporothrix*

Especie –

Clado patogénico:

Sporothrix schenckii sensu stricto

Sporothrix globosa

Sporothrix brasiliensis

Sporothrix luriei

Sporothrix pallida complex:

Sporothrix pallida

Sporothrix mexicana

Sporothrix chilensis

2.4. Características macroscópicas y microscópicas

El gold estándar para el diagnóstico de esporotricosis es el cultivo positivo del aspirado de los nódulos cutáneos, pus, exudado y material de curación de lesiones expuestas, en agar Sabouraud dextrosa, agar papa dextrosa APD o en agar Mycosel incubados a temperatura ambiente durante siete días (Bonifaz *et al.*, 2018); y deben ser incubados por lo menos cuatro semanas, antes de ser descartadas como negativos (Barros *et al.*, 2011).

El cultivo de la fase micelial muestra al principio coloración blanquecina a crema; de textura coriácea y con superficie surcada. Sin embargo, la coloración no es constante, mientras que algunas muestras permanecen con una tonalidad crema, otras se tornan de color castaño oscuro a negro con el transcurso de los días debido a la producción de melanina (Fig. 2a), por ello la morfología macroscópica de las colonias de la fase micelial es realmente variable (Rodrigues AM, 2015). Mientras que, las colonias de la fase levaduriforme (Fig. 2b).

muestran consistencia blanda, lisa, de color blanco a crema y con superficie irregular (Lacaz, 2002).

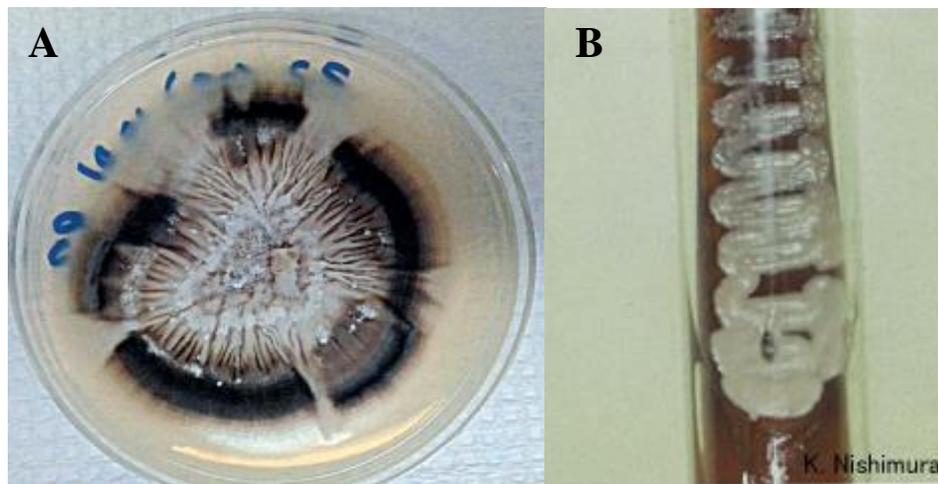


Figura 2: Morfología macroscópica de *Sporothrix* spp. A) Cultivo de la fase micelial en APD a 25°C. B) Cultivo de la fase levaduriforme en agar BHI a 37°C
FUENTE: Nishimura (1999)

La micromorfología de la fase micelial de *Sporothrix* spp., se caracteriza por el desarrollo de hifas hialinas, delgadas, septadas y con conidióforos erectos (Fig. 3a). La morfología de las conidias es variable y pueden ser redondas o globosas, triangulares y cuneiformes, elongadas o; subglobosa u obo-ovoide con dimensiones entre 2-4 x 2-6 μm (Fig. 4), las mismas que pueden ser hialinas o pigmentadas de color marrón y con el transcurso de los días pueden tornarse de color negro (Fig. 3a). La disposición de las conidias puede asemejarse a una margarita (simpodial) o pueden aparecer innumerables conidias laterales sésiles a lo largo de las hifas no diferenciadas (raduloporas) (Figura 3a) (de Aguiar Cordeiro, 2019, Rodrigues AM *et al.*, 2015, Larone, 2011).

Mientras que, las levaduras (Fig. 3b) pueden ser redondas, ovaladas o fusiformes con uno o varios brotes; con tamaño promedio de 1-3 μm x 3-10 μm (Rodrigues AM, 2015, Larone, 2011; Barros *et al.*, 2011).

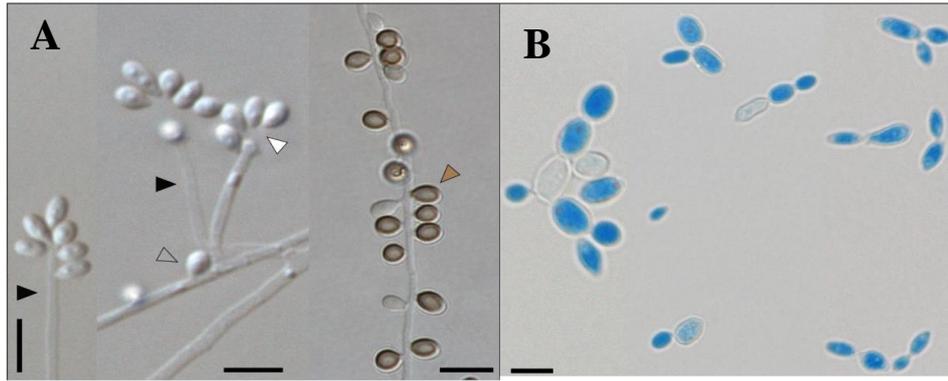


Figura 3: Microscopía de *S. schenckii*.

A) Fase micelial a 25°C. Conidias primarias dispuestos simpodialmente y a lo largo de hifas no diferenciadas, hialinas y pigmentadas. B) Fase levaduriforme a 37 °C, levaduras ovaladas o esféricas, se presentan alargadas y/o con brotes. Barra = 5 µm.

FUENTE: Rodrigues AM (2015)

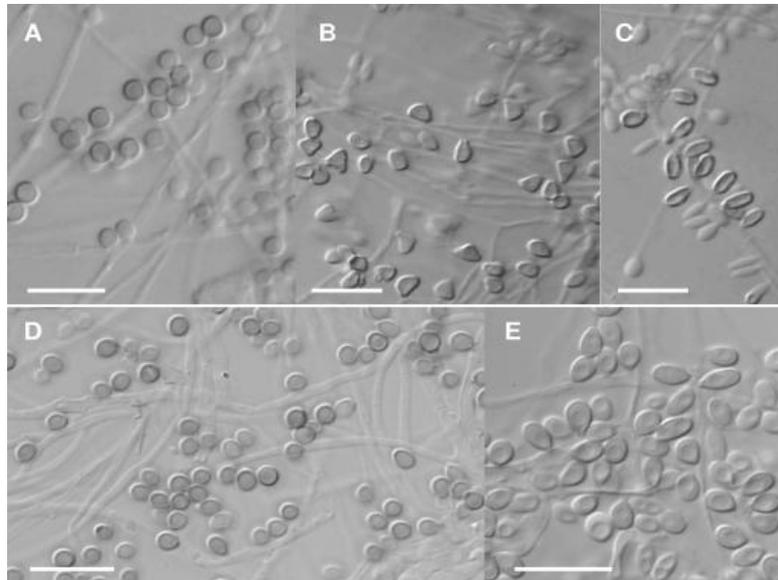


Figura 4: Morfología de las conidias del complejo *Sporothrix schenckii*

(A y D) Redondas o globosas; *S. brasiliensis* CBS 120339 (clado I) y *S. globosa* CBS 120340 (clado III). (B) Triangulares y cuneiformes; *S. schenckii* (*S. schenckii* sensu stricto) FMR 8608 (clado IIa) y (C) Elongadas; *S. schenckii* FMR 8677 (clado IIb). (E) Subglobosa u obo-ovoide; *S. mexicana* CBS 120341 (clado IV). Barra, 10 µm.

FUENTE: Marimon *et al.* (2007)

Sin embargo, la micromorfología de la fase micelial de *Sporothrix schenckii* es observada en numerosas especies de Ophiostomatales (Fig. 5), incluyendo a los géneros *Ophiostoma*, *Hyalorhinocladiella*, e *Pesotum* y también en hongos sin parentesco, clínicamente relevantes tales como el basidiomiceto *Quambalaria* (Rodrigues AM, 2015). Debido a la diversidad en la micromorfología, la caracterización de este hongo, tomando en cuenta sólo las características morfológicas, podría inducir al error; por lo que, el estudio y la descripción de la diversidad genética de este hongo basado en herramientas moleculares y exploración

del genoma, es indispensable para descartar que estas diferencias son el resultado de las interacciones con el medio ambiente (Rodrigues AM, 2015).

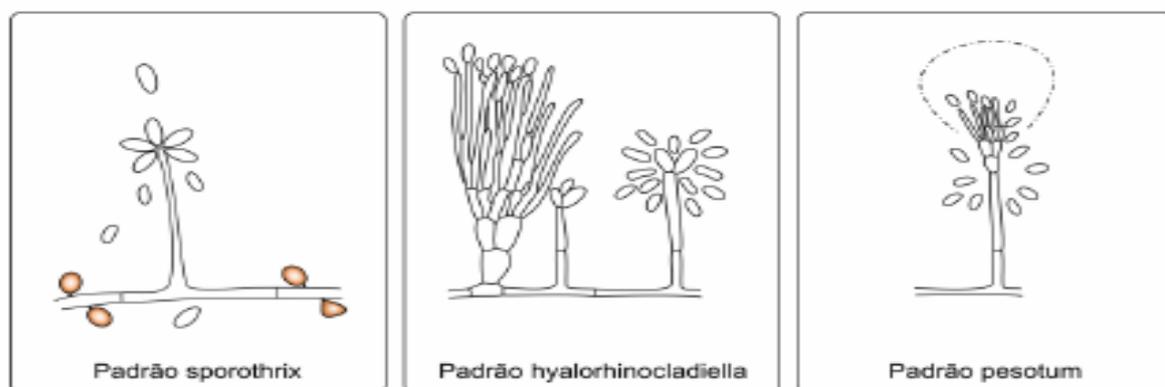


Figura 5: Forma asexual de representantes del orden Ophiostomatales. El padrón morfológico está presente en miembro del género *Sporothrix*, *Hyalorhinoclaðiella* y *Pesotum*. Notar la presencia de conidióforos erectos, conidias hialinas dispuestas simpodialmente
FUENTE: Rodrigues *et al.* (2015)

2.5. Factores de virulencia del complejo *Sporothrix schenckii*

Existen evidencias que apoyan la hipótesis, de que las condiciones de estrés medioambiental presentes en su hábitat (Figura. 6), podrían seleccionar e impulsar la evolución hacia la adquisición de rasgos importantes y adaptaciones en las especies de *Sporothrix*, resultando en un incremento de su patogenicidad, supervivencia y alta virulencia (Lopes-Becerra *et al.*, 2006; Téllez *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2009).

En ese sentido, los hallazgos indican que este hongo es capaz de resistir condiciones extremas de bajas temperaturas por muchos años (Mendoza *et al.*, 2005) y presiones osmóticas extremas (Borba-Santos *et al.*, 1992; de Capriles *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009). Algunos estudios han revelado que diferentes niveles de exposición a rayos UV no alteran su viabilidad, sin embargo, produce una alta frecuencia de variantes morfológicas dependiendo de la cepa en estudio y de la dosis UV (Torres-Guerrero & Arenas-López, 1998). Además, es capaz de producir sus propios sideróforos en respuesta a baja disponibilidad de hierro (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011).

Los factores de virulencia del complejo *Sporothrix schenckii*, no están completamente elucidados, sin embargo, existen varios estudios que relacionan su patogenicidad con la termotolerancia, producción de melanina, producción de enzimas (gelatinasas, ureasa, proteínasa) y producción de polisacáridos extracelulares (Nascimento, 2008; Fernandes *et al.*, 2009; Fernandes, 2009b; Ruiz-Baca *et al.*, 2011; Téllez *et al.*, 2014). Sin embargo, para

efectos de estudios retrospectivos, es importante tener en consideración de que los subcultivos por largos periodos, pueden causar diversos cambios morfológicos y pérdida o atenuación de la virulencia (Fernandes, 2009; Brummer *et al.*, 1990).

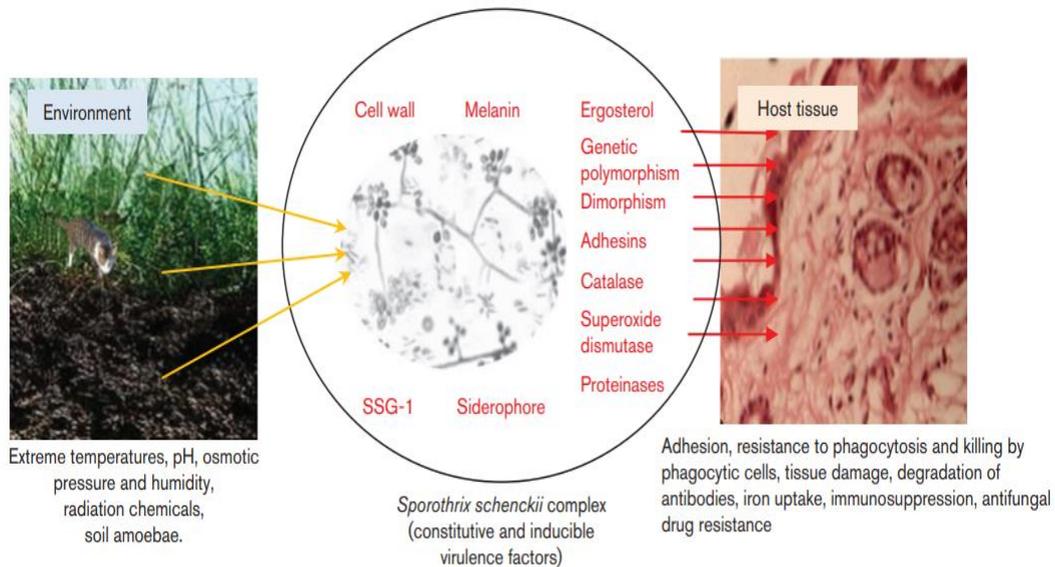


Figura 6: Estresores medioambientales que promueven la virulencia de *S. schenckii*.
FUENTE: Téllez *et al.* (2014).

2.5.1. Termotolerancia y dimorfismo

En vista de la amplia gama de defensas inmunológicas, los hongos término - dimórficos son únicos entre los patógenos fúngicos porque pueden infectar a los humanos con defensas inmunitarias normales y alteradas (Gauthier, 2017) para lo cual requiere que el hongo detecte y responda al entorno del huésped y es esencial para la patogenicidad, virulencia, su ciclo de vida y la efectividad en el establecimiento de la infección (Gauthier, 2015; Boyce y Andrianopoulos, 2015). Este grupo de patógenos humanos representa una familia de siete ascomicetos filogenéticamente relacionados que incluye a: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffei* y el complejo *Sporothrix schenckii* (Romeo y Criseo, 2013).

El dimorfismo es una adaptación que consiste en la capacidad de cambio de morfología entre una hifa multicelular y una levadura unicelular en un proceso regulado por vías celulares complejas aún sin elucidar completamente (Romeo y Criseo, 2013), en su propósito de eludir la efectividad de la respuesta inmune del huésped (Hernández-Chávez *et al.*, 2017). El mecanismo se apoya en: el crecimiento prolongado de hifas dentro de los fagocitos,

conduciría a la ruptura celular, exponiendo al hongo al sistema inmune, por ello los hongos dimórficos –como el complejo *Sporothrix schenckii*- cambian de la forma de crecimiento de hifas multicelulares encontrada en el ambiente a una forma de crecimiento de levadura unicelular, de esta manera la superficie y el volumen que ocupa es menor y más efectivo para el crecimiento intracelular dentro de los fagocitos, de esta manera se protegen del resto del sistema inmune (Boyce y Andrianopoulos, 2015)

En particular, en las especies del complejo *Sporothrix schenckii*, la demostración del dimorfismo (Fig. 7) es esencial para diferenciar las especies patogénicas de las no patogénicas, es por ello que para efectos de su identificación, se realiza el cultivo en medios enriquecidos (agar infusión cerebro corazón BHI suplementado o no con sangre, agar chocolate y agar de sangre) a 35-37°C, para obtener la fase levaduriforme, lo cual continúa siendo el *gold estándar* para el diagnóstico de esporotricosis. Sin embargo, ante el hecho de la existencia de diferentes especies dentro del complejo *Sporothrix* y las diferencias que existen en sus características epidemiológicas, el dimorfismo no permite identificar a nivel de especie (Larone, 2011; Barros *et al.*, 2011).

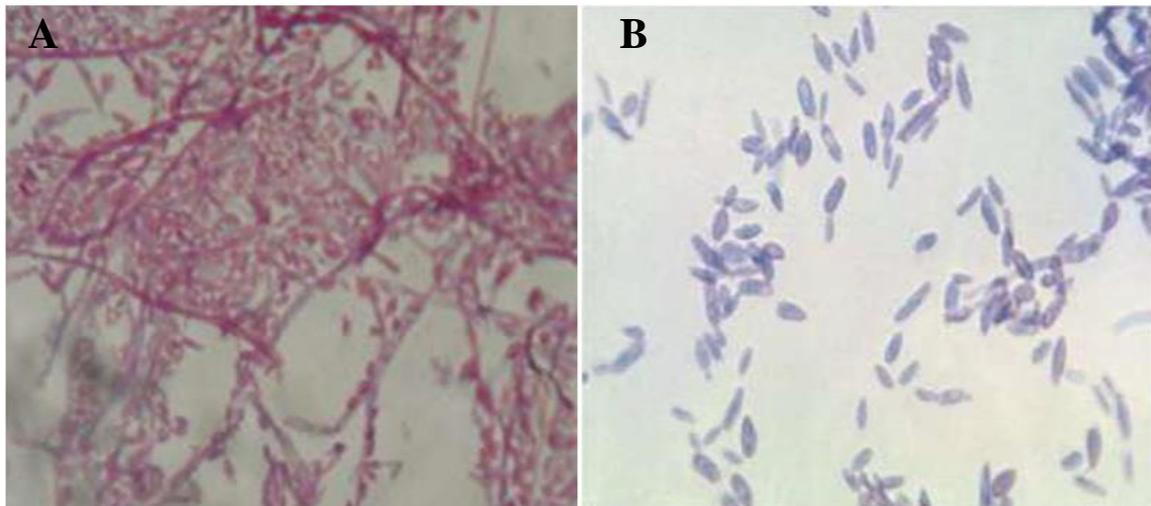


Figura 7: Tinción Gram de *S. schenckii*. Durante su transformación de fase micelial a levadura. B) Transición completa a levaduras de *Sporothrix* spp. muestran la forma de cigarro, algunas con brotes
FUENTE: Bareja *et al.* (2015)

2.5.2. Melanina

Las melaninas son polímeros con diversas estructuras moleculares, típicamente de coloración negra o marrón oscuro, están formadas por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos e indólicos. Son insolubles en agua y fluidos orgánicos y resistente a ácidos concentrados (Almeida-Paes *et al.*, 2012; Nosanchuk y Casadevall 2003).

La melanina es un importante factor de virulencia para muchos hongos patógenos, su presencia en la pared celular les provee protección frente a diversos daños medioambientales: como daño oxidativo por radicales libres y la luz ultravioleta; y durante la infección al hospedero le confiere resistencia frente a la fagocitosis y muerte por monocitos, macrófagos y proteínas extracelulares (Barros *et al.*, 2011; Morris-Jones *et al.*, 2003; Romero-Martínez *et al.*, 2000), de tal manera que aumenta la supervivencia en condiciones ambientales y parasitarias adversas. En *Sporothrix schenckii* se ha encontrado la presencia de hasta tres tipos de melaninas: DHN melanina, piomelanina y eumelanina (Almeida-Paes *et al.*, 2016). El ensamblaje de DHN-melanina no requiere la presencia de precursores específicos en el medio ambiente, ya que se produce a través de la vía acetil-CoA originada a partir de la glucólisis (Almeida-Paes *et al.*, 2009). Por el contrario, la eumelanina y piomelanina se producen adicionalmente si precursores como 3, 4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) o L-tirosina, respectivamente, están disponibles durante el crecimiento de hongos (Almeida –Paes *et al.*, 2016).

Durante el cultivo a 25 ° C a 30 ° C, el hongo produce colonias miceliales suaves y rugosas que son inicialmente de color blanco a crema, pero se vuelven de color marrón a negro después de unos días de cultivo (Fig. 8) e incluso los pigmentos melanoides se difunden a través del medio de cultivo (Almeida-Paes *et al.*, 2012; Romero-Martínez *et al.*, 2000). No obstante, las colonias de levadura cultivadas a 37 ° C no se vuelven oscuras incluso después de largos períodos de incubación, está demostrado que la DHN-melanina también se produce dentro de las paredes celulares de la levadura tanto *in vitro* como durante la infección (Morris-Jones *et al.*, 2003; Romero-Martínez *et al.*, 2000; Nosanchuk y Casadevall, 2003).

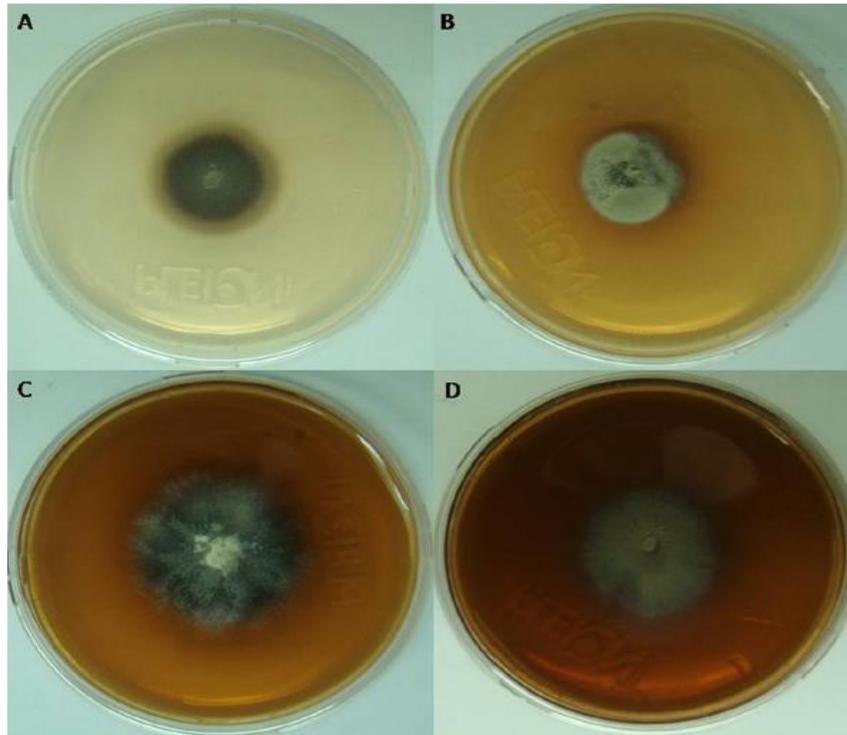


Figura 8: Producción de melanina
 Se observa cuatro niveles de intensidad de pigmentación del agar después de 20 días de incubación a 25 ° C. La melanización varía desde pigmentación mínima (A) a marrón claro (B) hasta café oscuro (C) o muy oscuro (D).
FUENTE: Almeida-Paes *et al.* (2012).

Además, existen estudios que sugieren que las melaninas protegen a la mayoría de las especies patogénicas de *Sporothrix* spp. frente a los efectos de la terbinafina (Almeida-Paes *et al.*, 2016), y anfotericina B (Almeida-Paes *et al.*, 2017); es así que el desarrollo de nuevos antifúngicos que tengan como diana algún paso en la síntesis de melanina, podrían mejorar las terapias de esporotricosis.

2.5.3. Producción de gelatinasas

Las gelatinasas son enzimas proteolíticas extracelulares relacionadas a la virulencia de *Sporothrix* (Téllez *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2002). Las enzimas exocelulares de tipo proteolíticas, gelatinasas, son secretadas por un agente causante de actinomicetoma: *Nocardia brasiliensis*, y la utiliza para desdoblar las proteínas, lo cual facilita la invasión de los tejidos del hospedero (Runco & Salim, 1995) y ayuda para discriminarla de *Nocardia asteroides*.

Sin embargo, de acuerdo con el estudio de Fernandes *et al.* (2009), los autores encontraron que una cepa “altamente virulenta” de *S. schenckii* muestra un número de enzimas secretadas (proteínasa, caseinasa, gelatinasa, DNasa y de la ureasa) de las cuales, la mayoría no

eran observadas en la especie hipervirulenta *S. brasiliensis*. Esto indica que los mecanismos que promueven la patogénesis son mucho más complejos, tal vez no conservados entre especies estrechamente relacionadas de *Sporothrix* y probablemente involucren diferentes factores de virulencia para evadir el sistema inmune del huésped. Por lo que, esta característica no permite discriminar entre diferentes especies *Sporothrix* spp. y es necesario realizar estudios basados en la expresión de genes y proteómica para profundizar aspectos relacionados con las enzimas exocelulares.

2.5.4. Producción y secreción de ureasa

La ureasa pertenece a la familia de las hidrolasas, con cuatro dominios, siendo tres estructurales y uno catalítico. La ureasa permite la hidrólisis de la úrea, produce amonio y dióxido de carbono (CO₂), internalizado por la célula y posteriormente convertido en bicarbonato (Oliveira, 2016; Mobley *et al.*, 1995). En muchas especies de hongos patogénicos ya fue demostrada la importancia de la actividad ureasa como factor de virulencia en el mecanismo de infección. Entre ellos, el hongo dimórfico *Coccidioides* spp, en el cual la ureasa tiene la importante actividad de alcalinizar el medio. Algunos estudios realizados con este hongo, demostraron que esta alcalinización, proveniente del amonio generado intracelularmente, es liberada en el medio extracelular y es fundamental para la conversión del hongo que sería muy complicado en un medio ácido, como por ejemplo, en el interior de las células del hospedero (Mobley *et al.*, 1995).

Oliveira (2016), realizó un estudio sobre caracterización molecular y la expresión fenotípica de la enzima ureasa en *Sporothrix brasiliensis* (la cepa más virulenta del género *Sporothrix*), de donde pudo identificar el gen SbURE que codifica para la ureasa. Esta secuencia tuvo el 98% de identidad con la secuencia perteneciente a *S. schenckii*. Sin embargo, hubo muchas diferencias en la expresión y niveles de producción de la enzima, incluso entre aislados de la misma especie. Tales resultados son similares a los obtenidos por Almeida-Paes *et al.* (2015). Por ello sugiere profundizar la investigación con mutantes silenciados del gen codificador de la ureasa y otros aspectos funcionales que aún permanecen desconocidos (Oliveira, 2016).

2.6. Marcadores de ADN: Técnicas basadas en PCR

Por las características expuestas y teniendo en cuenta la gran diversidad morfológica de *S. schenckii* evaluar la diversidad genética basándose sólo en estos caracteres presentaría grandes limitaciones, debido principalmente a la data incompleta para caracteres taxonómicos, la existencia de complejos de especies crípticas y la similaridad fenotípica, lo cual puede inducir a errores en la identificación y en la estimación de la diversidad (Rodríguez, 2015). Es por ello que los datos moleculares tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación (Rentería, 2007) y son comúnmente usados para caracterizar la diversidad genética dentro o entre poblaciones o grupo de individuos porque detecta altos niveles de polimorfismo (Kosman y Leonard, 2005).

Los marcadores de ADN tienen diferentes características en cuanto a su tipo de herencia y dominancia; por tanto, la elección de la técnica dependerá de la información que se quiere obtener (Jiménez y Collada, 2000). Entre las técnicas más comunes tenemos: AFLPs, RFLPs, ISSR, microsatélites y RAPD:

a) RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs)

Esta técnica es simple y de baja complejidad, utiliza *primers* arbitrarios de longitud corta (aproximadamente 10 pares de bases) con una baja temperatura de *annealing* (30-38°C), con lo cual se amplifica cualquier región del genoma flanqueada por secuencias complementarias al *primer* y de una longitud adecuada (Xu, 2006), es una técnica simple, rápida y de bajo coste.

El análisis de los RAPD detecta dos tipos de variación genética: (i) en la longitud del ADN entre los dos sitios de unión del *primer*; lo que resulta en bandas con diferente movilidad y (ii) en la variación de los puntos de homología con el primer, debido a inserciones y deleciones que alteran la secuencia. y se hacen visibles por la presencia o ausencia de una banda, por lo que, el polimorfismo genético detectado con este marcador es binario (Otero *et al.*, 1997).

Las sustituciones en la región de unión del *primer*, particularmente en el extremo 3' puede prevenir la unión del *primer* al templado de ADN, como resultado esta banda se perderá en la reacción PCR. Asimismo, los RAPDs son marcadores de naturaleza dominante, lo cual indica que los individuos heterocigotos no pueden ser diferenciados directamente de los homocigotos (Cornejo *et al.*, 2014; Xu, 2006; Jiménez y Collada, 2000)

Las similitudes en los perfiles de bandas entre individuos (en el número y tamaño) pueden ser útiles para inferir relaciones entre ellos. Cuando se realiza un *screening* con múltiples *primers*, el análisis RAPD puede ser muy sensible y altamente efectivo, para detectar variaciones y distinguir entre los aislados, que no se puede observar utilizando otros métodos (Jiménez y Collada, 2000, Xu, 2006, Kosman y Leonard, 2005)

Los loci de los marcadores RAPD están ampliamente distribuidos al azar a lo largo del genoma, lo que permite detectar un nivel de polimorfismo elevado, incluso en regiones de DNA repetitivo. Su carácter heredable sigue el modelo de Mendel y la interacción genotipo-ambiente es mínima debido a los nulos o mínimos eventos de pleiotropía y epistasia que tienen lugar (Williams *et al.*, 1990).

RAPD es una técnica sensible a variaciones en los procedimientos, afectando la reproducibilidad. Esta desventaja puede ser minimizada si los aislados en estudio son tratados idénticamente, utilizando las mismas condiciones en la PCR, el mismo master mix y el mismo programa de amplificación. (Xu, 2006; Cornejo *et al.*, 2014).

2.7. Análisis de agrupamiento mediante taxonomía numérica

La taxonomía numérica ha sido definida como la evaluación numérica de la afinidad o similitud entre unidades taxonómicas y el agrupamiento de estas unidades en taxones, basándose en el estado de sus caracteres (Crisci y López, 1983). Es así una herramienta importante para la comprensión de la diversidad genética ya que permite estimar el grado de similitud (o diferencia) genética entre pares de unidades o individuos (Caruso *et al.*, 2015). Al utilizar marcadores RAPD la información a evaluar son los datos del polimorfismo de loci generado por las diferencias de tamaños en los perfiles de bandas de ADN y sus frecuencias (Gupta *et al.*, 1994). Con esta información, se calculan diversos parámetros que nos dan el grado de similitud genética y permiten agrupar, clasificar e inferir sobre las relaciones entre los organismos (Crisci y López, 1983).

2.7.1. Matriz básica de datos (MBD) y coeficientes de similitud

La construcción de la MBD es fundamental porque constituye el punto de partida o materia prima para la aplicación de las herramientas estadísticas (Franco e Hidalgo, 2003). Se elabora a partir de los datos que se generan después de la amplificación del ADN y electroforesis, basada en la presencia o ausencia de bandas que se representan en código binario; siendo “1” presencia de alelo y “0” ausencia del mismo (Crisci & López, 1983). De

forma tal que se genera una matriz básica de datos, a partir de la cual se realiza una asociación entre los pares de organismos (UE = unidades de estudio) mediante el cálculo de las coincidencias y diferencias en los estados de los caracteres entre dos UEs (Palacio *et al.*, 2020; Crisci & López, 1983).

Luego, el parecido o similitud es cuantificable aplicando un coeficiente de similitud respecto a cada par posible de UE de una matriz básica de datos (Palacio *et al.*, 2020). Cuando se trabaja con datos doble-estado (presencia y ausencia), como los obtenidos con marcadores RAPD, se utilizan generalmente los coeficientes de asociación:

a. **Coefficiente de Dice (S_D)**, también llamado coeficiente de Nei-Li (1979), expresa probabilidad de que una banda en un individuo esté también en otro, cuantificada como la relación de número de bandas coincidentes (entre los individuos) a número total de bandas (número medio de bandas en un individuo). Cuanto menor sea la distancia genética entre accesiones más alta será la probabilidad (Moreno-Vásquez, 2001; Kosman y Leonard, 2005).

$$S_D = \frac{a}{\frac{(a+b) + (a+c)}{2}} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

Donde:

- a: número de bandas presentes en ambos individuos
- b: número bandas presentes en el primer individuo, pero no en el segundo
- c: número de bandas presentes en el segundo individuo pero no en el primero.

a. **Coefficiente Simple Matching (S_{SM})**, presenta la particularidad de considerar como factor de similitud las dobles ausencias (Lambooy, 1994)

$$S_{SM} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

Donde:

- d: número de marcadores en los cuales la banda está simultáneamente ausente en ambos individuos.

Su utilización conduce a errores si detrás de las dobles ausencias no hay identidad, lo que ocurre frecuentemente cuando se hacen comparaciones interespecíficas mediante RAPDs (Moreno-Vásquez, 2001; Lambooy, 1994).

b. **Coefficiente de Jaccard (S_J)**, no presenta ventajas sobre los otros coeficientes, sin embargo, ha sido el más empleado en estudios de diversidad.

$$S_J = \frac{a}{a+b+c}$$

Los resultados obtenidos de la aplicación de cualquiera de los coeficientes de similitud para los pares posibles de UE ordenadas en forma tabular constituyen la matriz de similitud. Las UE ocupan tanto las filas como las columnas, siguiendo el mismo orden en ambas; de esta manera se logra comparar cada UE consigo misma y con las restantes (Palacio *et al.*, 2020; Crisci y López, 1983). NTSYS (Rohlf, 2009) y otros programas de taxonomía numérica permiten el cálculo de estos índices (Moreno-Vásquez, 2001).

2.7.2. Método de agrupamiento UPGMA y representación gráfica

El análisis de agrupamientos comprende técnicas que forman grupos de UE que se asocian por su grado de similitud. Una de las más utilizadas es la media aritmética no ponderada (UPGMA, "unweighted pair-group method using arithmetic averages"), la cual utiliza un ligamiento promedio, es decir, considera que el valor de similitud entre la UE candidata a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo (Palacio *et al.*, 2020; Crisci y López, 1983).

Con esta información se construye el dendrograma que es la representación gráfica de la relación en grado de similitud entre dos UE o grupos de UE. Los valores o coeficientes de similitud se expresan en una escala que suele encontrarse en su extremo superior o inferior. Las UE se colocan en el extremo derecho y dan origen cada una a un eje horizontal. Los ejes horizontales se unirán mediante ejes verticales que expresan, en relación con la escala, el valor de similitud existente entre las UE o conjuntos de UE. Podríamos decir que un grupo cualquiera se constituye por las paralelas a la escala que nacen de un mismo eje vertical y las ramificaciones que contiene (Crisci y López, 1983).

2.7.3. Coeficiente de correlación cofenética (r)

El coeficiente de correlación cofenética consiste en construir una nueva matriz de similitud a partir de los valores del dendrograma, a la que se denomina "matriz cofenética". Luego, se calcula el coeficiente de correlación de Pearson entre la matriz de similitud que dio origen al dendrograma y la matriz cofenética que representa el dendrograma (Palacio *et al.*, 2020).

Valores mayores a 0,9 pueden ser interpretados como un ajuste muy bueno, es decir, existe una clara estructura jerárquica entre los elementos analizados. Valores entre 0,8 y 0,9 son considerados buenos, valores entre 0,7 y 0,8 y valores menores a 0,7 son pobres o muy pobres, respectivamente, e indican una distorsión notable entre las similaridades y/o disimilaridades iniciales y las que resultan de la representación gráfica (Zambrano *et al.*, 2003). También nos indica si la técnica de ligamiento promedio utilizado es el más adecuado para representar los datos y la que origina menor distorsión (Palacio *et al.*, 2020; Crisci y López, 1983).

2.7.4. Análisis de variancia molecular (AMOVA)

AMOVA significa *Analysis of Molecular Variance* y es un método para detectar la diferenciación poblacional utilizando marcadores moleculares (Excoffier, Smouse & Quattro, 1992). Es un análisis de variancia derivado del ANOVA que permite estimar la variabilidad genética de las poblaciones a partir de información de datos moleculares. Este procedimiento se implementó inicialmente para haplotipos de ADN, pero se aplica a cualquier sistema de marcadores (Grunwald *et al.*, 2016). AMOVA es una poderosa herramienta que puede ayudar a soportar la hipótesis de estructura poblacional debido a reproducción clonal o aislamiento sin hacer asunciones sobre el equilibrio Hardy-Weinberg, ni hace supuestos de normalidad de la data (Excoffier, Smouse & Quattro, 1992). El nivel de diferenciación entre pares de poblaciones es calculado con el índice Φ_{ST} , análogo al F_{ST} de Wright. La significancia estadística se prueba mediante permutaciones al azar, para obtener un valor p, estos cálculos son realizados por diversos *softwares*.

2.8. Diversidad genética de *Sporothrix schenckii*

La diversidad genética, entendida en sentido amplio, es el componente más básico de la biodiversidad, se refiere a la variabilidad heredable que ocurre en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una misma especie, en condiciones naturales más o menos estables (Rimieri, 2017). Si bien la variabilidad genética es materia prima de la evolución, al mismo tiempo, los factores que producen el cambio evolutivo determinan el potencial de respuestas que permite la supervivencia y adaptación (Caruso *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2017). En tal sentido, la diversidad genética de los patógenos es un rasgo que contribuye al éxito de la supervivencia en diferentes hábitats y nichos ecológicos, debido a que le confiere plasticidad para adaptarse a los cambios medioambientales que se producen continuamente (Taylor *et al.*, 2017).

La naturaleza de los hongos patógenos no es ajena a esta realidad, puesto que a lo largo de los años han evolucionado en sus mecanismos de transmisión, infección, susceptibilidad antifúngica (Billmyre y Heitman, 2017). De forma que el conocimiento de la variación en las poblaciones silvestres es un rico recurso para asociar variación genética con fenotipo, lo cual está estrechamente relacionado con el entendimiento de la epidemiología (Taylor *et al.*, 2017).

En las últimas décadas, *Sporothrix schenckii* ha sido ampliamente estudiado debido a las diferencias fenotípicas entre los aislados del supuesto único taxón. Años más tarde, se concluye que en realidad es un complejo que incluye un clado de especies patogénicas y no patogénicas (Marimon *et al.*, 2007; 2008). Recientemente, los estudios se han enfocado en describir las características del potencial patogénico de las especies, y los resultados han cambiado las perspectivas de la esporotricosis.

Al comparar estas evidencias, los hallazgos sobre virulencia, patogenicidad y sensibilidad antifúngica indican que existe diferencias entre las especies de *Sporothrix* (Fernandes *et al.*, 2009, Romeo y Criseo, 2013), concluyendo que *S. brasiliensis* es la más virulenta entre todas las especies patogénicas pero la más susceptible a los antifúngicos, mientras que *S. schenckii* es menos virulenta pero posee mayor resistencia antifúngica (Rodrigues *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha identificado diferentes genotipos de *S. schenckii* que son altamente virulentas y que muestran una sobreexpresión de enzimas (proteinasas, caseinasas, gelatinasas, DNAsas y ureasas) la mayoría de las cuales no fueron observadas en cepas hipervirulentas de *S. brasiliensis* (Fernández *et al.*, 2013).

En tal sentido, hoy en día se conoce que las fuentes de infección, transmisión y patrones de distribución geográfica son diferentes entre las especies (inter-específica); pero la variabilidad difiere también entre miembros de la misma especie (intra-específica) debido a los diferentes grados de clonalidad (Lopes-Bezerra *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2009; Romeo y Criseo, 2013).

2.8.1. Antecedentes de estudios de diversidad genética mediante técnicas basadas en la PCR

Por varias décadas, la esporotricosis ha sido atribuida a un solo patógeno: *Sporothrix schenckii*, pero debido a los brotes epidémicos especialmente a causa de transmisión zoonótica alrededor del mundo, ha sido necesario el desarrollo de métodos de genotipificación rápidos y de bajo coste para el estudio epidemiológico. Es así que la

literatura internacional demuestra que *S. schenckii* es en realidad un complejo de especies y que estas especies difieren en su distribución geográfica (Marimon *et al.*, 2006; Watanabe *et al.* 2004; Rodrigues *et al.*, 2013; Chakrabarti *et al.*, 2015), virulencia (Fernández *et al.*, 2013; Almeida-Paes *et al.*, 2015) y resistencia a antifúngicos (Marimon *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011; Romeo *et al.*, 2011).

Muchos estudios apuntaron a estudiar la heterogeneidad del complejo y realizaron análisis basados en la PCR del ADN mitocondrial (Lin *et al.*, 1999; Ishizaki *et al.*, 2009) y ADN ribosomal (Zhang *et al.*, 2006), RAPD-PCR (Mesa-Arango *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2009), RFLP de los ITS (Watanabe *et al.*, 2004).

- Mesa-Arango *et al.* (2002) utilizó un panel de 34 cepas de *Sporothrix* spp. procedentes de México MX ($n = 17$), Guatemala GT ($n = 7$) y Colombia CO ($n = 10$) y aislados del medio ambiente procedentes de México ($n = 10$), para estudiar las características genotípicas con el análisis de RAPD-PCR, utilizando tres *primers* OPBG-01, OPBG-14 y OPBG-19. Los estudios moleculares agruparon claramente al *Sporothrix* en cuatro clados bien diferenciados en base a su origen geográfico. Estos análisis muestran la relevancia de los métodos de análisis de RAPD en este tipo de estudio, especialmente cuando es llevado a cabo bajo condiciones experimentales controladas y estandarizadas.
- Galhardo *et al.*, 2008; utilizó RAPD-PCR con el primer M13 para explorar la diversidad genética de 59 aislados de Rio de Janeiro-Brasil. Los hallazgos indicaron la presencia de nueve clados pero muy similares entre aislados del mismo clado. Por tanto, concluyeron que entre ellos hubo un alto porcentaje de similaridad genética, que sugiere un nicho común y la posibilidad de que la población de una única cepa virulenta estuvo presente en ese micro ambiente.
- Fernandes *et al.*, 2009; investigaron la epidemiología molecular de *S. schenckii* utilizando RAPD-PCR, incluyendo 151 cepas de *S. schenckii* procedentes de varias regiones de Brasil. Utilizaron seis *primers* (utilizados por Mesa-Arango *et al.*, 2002 y Liu *et al.*, 2003) de los cuales todos produjeron patrones polimórficos. Sin embargo, debido a la alta diversidad genética intraespecífica, decidieron analizar sólo los aislados de Sao Paulo. De igual modo, se formaron dos subclados bien diferenciados.

Paralelamente, los estudios internacionales de la variabilidad genética de *S. schenckii* continuaron en progreso y en el 2006, Marimon y colaboradores realizaron un estudio

filogenético con 60 aislados procedentes de un amplio rango geográfico (Europa, Brasil, Sudamérica y África). Los análisis basados en secuenciamiento de tres genes (CAL, Bt2 y CHS) revelaron la presencia de tres clados importantes, uno que agrupaba a todos los aislados de Europa, el otro que correspondía sólo a los aislados de Brasil y el tercer clado que agrupaba a los aislados de Sudamérica y África.

En el 2007, el mismo grupo de investigación identificó la existencia de tres nuevas especies: *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. mexicana* que fueron re-nombradas durante la evaluación de 127 aislados (se incluyó 15 cepas procedentes del Perú) del complejo de *S. schenckii*; basados en secuenciamiento del gen CAL. Estos aislados fueron agrupados en cinco clados principales, de los cuales tres de ellos incluían sólo cepas de origen clínico. El clado I contenía exclusivamente cepas de Brasil y fue denominado *Sporothrix brasiliensis*. Las cepas procedentes de Perú estaban incluidas en el clado II que a su vez fue dividido en los subclados IIa y IIb (Marimon *et al.*, 2007). En el 2008, proponen a *S. luriei* como una nueva especie de importancia clínica (Marimon *et al.*, 2008). Los resultados de estas investigaciones demostraron que determinadas especies de *Sporothrix* spp. prevalecen en diferentes áreas geográficas particularmente en Brasil y la identificación de las especies es un área de investigación activa. Asimismo, aún no hay un consenso sobre los métodos de identificación para este hongo.

2.8.2. Estudios nacionales

La micoteca del Laboratorio de Referencia Nacional de Micología, cuenta con cepas clínicas aisladas de pacientes con diagnóstico clínico de esporotricosis; las cuales están caracterizadas como *Sporothrix schenckii* por métodos convencionales, por lo que aún se trata a este hongo como un único agente; a este hecho se suma que son escasos los estudios de la identificación de las variantes genéticas que circulan en las áreas endémicas.

- Holechek y colaboradores en el 2004; trabajaron con 17 cepas procedentes de dos distritos de Abancay-Apurímac usando la técnica del RAPD. En sus resultados indicaron la existencia de variabilidad genética de este hongo y la dificultad para correlacionar las variantes presentes con su origen geográfico. Recomendaron trabajar con un mayor número de cepas para conocer la dinámica poblacional y la tasa de variabilidad de *S. schenckii* en áreas hiperendémicas del país.
- Neyra y colaboradores en el 2005 analizaron un panel de 43 cepas de *Sporothrix*: Peru ($n = 32$), Mexico ($n = 7$), Colombia ($n = 1$), Bolivia ($n = 1$), Italy ($n = 1$), and

Sudáfrica ($n = 1$) usando la técnica del AFLP. Los resultados indican que las cepas peruanas pueden ser divididas en dos clados homogéneos pero ningún genotipo predominante. Clado A (23 cepas) correspondiente a Ayacucho [$n = 1$], Lima [$n = 5$], Amazonas [$n = 3$], Apurímac [$n = 7$], Cajamarca [$n = 1$], Loreto [$n = 2$], San Martín [$n = 1$], Cuzco [$n = 2$] y Puno [$n = 1$]. Clado B (9 cepas) menos frecuente pero no restringido a áreas definidas: Lima [$n = 2$], Apurímac [$n = 1$], Amazonas [$n = 3$], Cuzco [$n = 2$] y Loreto [$n = 1$].

Asimismo, recientemente en el estudio de Ramírez-Soto *et al.* (2021) se reveló la presencia de *Sporothrix schenckii sensu stricto* mediante secuenciamiento del gen parcial de la calmodulina de seis aislados procedentes de Abancay, sin embargo, estos resultados no son representativos de la verdadera predominancia de esta especie en Abancay debido al escaso número de muestras ($n=6$).

III. METODOLOGÍA

3.1. Materiales

3.1.1. Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micología y en el Laboratorio de Referencia Nacional de Microbiología y Biomedicina, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Todos los procedimientos se realizaron utilizando la indumentaria y el equipo de protección personal (EPP) para el Nivel de Bioseguridad 2.

3.1.2. Material biológico: cepas de *Sporothrix schenckii*

Inicialmente se utilizaron 111 cepas clínicas de origen humano, caracterizadas como *S. schenckii*, procedentes de la micoteca del Laboratorio de Referencia Nacional de Micología del Instituto Nacional de Salud, las cuales corresponden a dos áreas endémicas importantes de esporotricosis: Cajamarca (n=88) y Apurímac (n=23) y datan del periodo 2000-2015.

Estas cepas corresponden a aislamientos de muestras de biopsias, raspados de piel y aspirados de ganglios linfáticos de pacientes con esporotricosis y fueron caracterizadas como *S. schenckii* por los métodos tradicionales: microscopía, macroscopía, bioquímica y termotolerancia.

Dichas cepas se encuentran preservadas en su fase filamentosa según el método de *Castellani* (Fig. 9), en viales de vidrio con agua destilada estéril, sellados herméticamente, codificados y a temperatura ambiente (Zurita *et al.*, 2017). El método de conservación en agua por *Castellani* (1967), garantiza la preservación adecuada de hongos filamentosos durante largos períodos de tiempo, asegurando viabilidad, pureza y estabilidad morfológica, además es de bajo costo, fácil manejo y almacenamiento (Diogo *et al.*, 2005; Mendoza, 2005).

Asimismo, la información de procedencia geográfica de las cepas utilizadas se recolectó a partir del Sistema NETLAB, de las fichas epidemiológicas y de la base de datos del laboratorio.



Figura 9: Conservación de cepas de *S. schenckii* por el método de Castellani

3.1.3. Materiales de uso rutinario

- Equipo de protección personal (mandil, gorra, mascarilla y guantes descartables)
- Tubos de ensayo
- Ansas de siembra
- Mechero
- Láminas porta objetos
- Láminas cubreobjeto
- Aceite de inmersión
- Placas Petri
- Microtubos de 0.2 y 1.5mL
- Perlas de vidrio
- Tips estériles de baja retención de 0.5, 20, 100, 200 y 1000 uL
- Pipetas automáticas 0.5, 20, 200, 1000 uL

3.1.4. Medios de cultivo

- Agar Sabouraud – dextrosa (ASD)
- Agar Mycosel (AMyc)
- Agar papa dextrosa
- Medio agar infusión cerebro – corazón (BHI)
- Sangre de carnero
- Agar papa dextrosa (APD)
- Agar corn meal (CMA)
- Medio gelatina para hidrólisis
- Base úrea de Christensen

- Extracto de carne
- Peptona
- Gelatina
- Glucosa
- Cloranfenicol
- Harina de maíz
- Tween 80
- Agar agar

3.1.5. Reactivos

- Alcohol al 70%
- Agua desionizada estéril
- Azul de lactofenol
- Hexadecyltrimethylammonium bromide CTAB
- Mercaptoetanol
- Cloroformo
- Alcohol isoamílico
- Acetato de sodio
- Isopropanol
- Etanol 96% grado biología molecular
- ARNasa A
- Tris base
- Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica (Na₂EDTA)
- Ácido bórico
- Cloruro de sodio (NaCl)
- NaCl
- Polivinil pirrolidona (PVP)
- Ácido clorhídrico concentrado
- Agarosa grado biología molecular
- Loading dye
- Agua destilada
- *Primers* OPBG-01, OPBG-14, OPBG-19 y OPD-18
- Enzima Taq Platinum
- Marcador de peso 100pb
- Deoxinucleótidos

- Agua grado PCR

3.1.6. Equipos

- Microscopio con cámara digital
- Autoclave
- Balanza analítica
- Horno microondas
- Potenciómetro
- Agitador con calefacción
- Incubadora de cultivo (25°C, 37°C)
- Refrigeradora
- Congeladora de -20 °C
- Thermomixer
- Microcentrífuga
- Agitador - vórtex
- Nanodrop
- Cámara electroforética horizontal
- Fuente de poder
- Termociclador
- Transiluminador

3.2. Métodos

3.2.1. Reactivación y recuperación de cepas clínicas de *S. schenckii*

Dado que se utilizó cepas conservadas que datan desde el año 2000 al 2015 y que se encuentran conservadas por el método de Castellani, fue necesario reactivarlas en medios de cultivo nutritivos y especiales y fue fundamental que cumplieran con dos características indispensables: viabilidad y pureza.

Procedimiento: Con un asa de siembra se tomó una porción de micelio y se inoculó en los siguientes medios de cultivo:

- Agar Sabouraud – dextrosa (ASD) suplementado con cloranfenicol: Medio de cultivo nutritivo que favorece la esporulación de los hongos filamentosos.
- Agar Mycosel (AMyc): Medio de cultivo especial que contiene cicloheximide, inhibidor del crecimiento de hongos ambientales contaminantes.

La siembra se realizó por triplicado y se incubó a temperatura ambiente por 7 a 10 días. Durante este periodo se revisó diariamente el crecimiento de las colonias y se evitó la contaminación con otros hongos mediante resiembras sucesivas.

Criterios de control:

- Viabilidad, capacidad de crecimiento y supervivencia de colonias típicas de *S. schenckii*.
- Pureza, expresado como el crecimiento únicamente de colonias típicas de *S. schenckii* sin contaminaciones de otros microorganismos.

3.2.2. Control de calidad

Se utilizó la cepa referencial con código 10-10198-09, la cual fue caracterizada como *S. schenckii* mediante ensayos fisiológicos, bioquímicos y además se realizó un ensayo de inoculación en modelo animal en el cual se reprodujo la enfermedad (MET-CNSP-120).

Se realizó el control de calidad interno de las cepas reactivadas de acuerdo con el Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico (Zurita *et al.*, 2017) mediante microscopía, ensayos de termo-tolerancia y dimorfismo, producción de melanina, presencia de gelatinasas y producción de ureasa, con el fin de verificar la conservación de las características de las cepas tipificadas como *S. schenckii*.

a. Microscopía

La micromorfología es diversa dentro del complejo *S. schenckii* observándose en la fase micelial: hifas hialinas, delgadas, septadas y con conidióforos erectos, diferentes formas y disposición de conidias, con dimensiones que oscilan entre 2-3 x 3-6 μm ; las cuales pueden ser hialinas o pigmentadas de color marrón a negro en el transcurso de los días.

Procedimiento: se realizó un cultivo en agar papa dextrosa con cloranfenicol durante 15 días a temperatura ambiente. Se realizó la observación microscópica con azul de lactofenol y se registró las características de la disposición, forma y área de las conidias en micras. Cada observación se realizó en 10 campos y luego se

Interpretación de resultados:

Forma de las conidias

- Globosa o redonda (1)
- Triangular o cuneiforme (2)
- Elongada (3)
- Subglobosa u obovoide (4)

Disposición de conidias

- Simpodial y en forma de ramillete (R)
- Sésiles a lo largo de la hifa (S)
- Agrupadas (AG)

Medida del área conidial

- Largo x ancho de las conidias (μm^2)
- Valor de la media, mediana y valores máximos y mínimos

b. Ensayo de termotolerancia y dimorfismo

La demostración del dimorfismo conforma el gold estándar en la identificación del complejo *S. schenckii* y ayuda a diferenciar entre una especie patógena de otra no patógena. Este ensayo consiste en realizar subcultivos de la fase filamentosa en medio agar infusión cerebro – corazón suplementado con sangre de carnero e incubarlos a 37°C por hasta 30 días para lograr la transición de la fase filamentosa a la fase levaduriforme.

Procedimiento: A partir de los cultivos en agar Sabouraud de las cepas reactivadas en su fase filamentosa, se inoculó una porción de 2 x 2 mm² en el medio de cultivo agar infusión cerebro – corazón BHI (Anexo 12) y se incubó a 37°C por 30 días para inducir la transición a la fase levaduriforme. La obtención de colonias de consistencia blanda, lisa, de color blanco a crema y con superficie irregular son indicativos de dimorfismo. La confirmación se realiza mediante la observación microscópica de levaduras ovalas o esféricas, de apariencia alargada y/o con brotes de tamaño entre 1-3 x 3-10 μm .

Para las cepas que no lograron el dimorfismo en este periodo, se realizaron hasta cinco subcultivos sucesivos incubados a 37°C durante siete días en agar infusión cerebro – corazón suplementado con sangre de carnero al 10% BHIS (Anexo 12) hasta obtener colonias de aspecto cremoso color blanquecino a marrón claro (Bareja *et al.*, 2015). Este ensayo se realizó por triplicado.

Criterios de control:

- Colonias con aspecto cremoso, consistencia blanda, lisas, de color blanquecino a crema y con superficie irregular.
- Observación microscópica de levaduras ovaladas o esféricas, alargadas y/o con brotes de dimensiones 1-3 x 3-10 μm .

c. Producción de melanina

La melanina es un importante factor de virulencia relacionado a la protección de *Sporothrix* frente a daños medio ambientales y es muy estudiado su contribución en la virulencia y patogenicidad de este hongo.

Procedimiento: A partir de los cultivos en agar papa dextrosa (APD), se inoculó una porción de 2x2 mm² en placas Petri con corn meal agar CMA (Anexo 12) y se incubó durante 30 días a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó por triplicado. Luego, se realizó una inspección visual de la pigmentación y se clasificó conforme a los estudios de Almeida-Paes *et al.* (2009) y Almeida-Paes *et al.* (2015) de la siguiente manera:

Interpretación de los resultados:

- Colonias albinas (-)
- Colonias marrón pálido (+)
- Colonias marrón oscuro (++)
- Colonias negras (+++)

d. Producción de gelatinasas

Las gelatinasas son enzimas proteolíticas involucradas en el grado de virulencia y patogenicidad de *S. schenckii*. Su presencia es variable y no discrimina una especie de otra. La función de las gelatinasas consiste en catabolizar las proteínas que se encuentran dentro del hospedero y permitir su ingreso a las células del hongo, mediante el siguiente mecanismo: en la primera reacción, la gelatinasa degrada la gelatina en polipéptidos y luego los polipéptidos son convertidos en aminoácidos individuales. Por último, el hongo puede tomar los aminoácidos y usarlos en sus procesos metabólicos (Mac Faddin, 1993).

Procedimiento: Se utilizó medio gelatina para hidrólisis en tubos donde se inoculó por punción una porción de 5 x 5 mm². Se incubó a temperatura ambiente por 14 días. Luego de este periodo los tubos fueron colocados en el refrigerador a 4°C por dos horas y se observó si hubo o no licuefacción del medio. Este ensayo se realizó por triplicado.

Interpretación de los resultados:

- Licuefacción (medio líquido): Gelatinasa positiva
- Medio sólido: Gelatinasa negativa
- Control interno: *Nocardia brasiliensis*
- Control negativo: medio gelatina sin inóculo.

e. Producción de ureasa

La enzima ureasa está presente en *S. schenckii*, sin embargo no se conoce con certeza si su rol es determinante en la virulencia de este hongo.

La evaluación de la actividad ureasa es por inspección visual, observando la alteración del color del medio de cultivo: las muestras que no producen ni secretan ureasa acidifican el pH del medio de cultivo, el cual se torna de color naranja y las muestras que producen y secretan ureasa, alcalinizan el medio de cultivo tornándolo rosado intenso (Mobley *et al.*, 1995).

Procedimiento: La presencia de la enzima ureasa fue determinada utilizando el medio de cultivo agar úrea de Christensen dispensado en tubos (Anexo 12). Para ello, se inoculó una porción de 5 x 5 mm² de micelio de *S. schenckii* y se incubó a 37°C durante 7 días según lo indica Oliveira (2016). Este ensayo se realizó por triplicado.

Interpretación de resultados:

- Medio con coloración rosado intenso: Positivo
- Medio con coloración naranja: Negativo
- Control interno: *Cryptococcus neoformans*
- Control negativo: *Candida albicans* ATCC 90028.

3.2.3. Extracción de ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de la fase micelial de *S. schenckii* por ser de rápida obtención. Se resembró por triplicado en placas con agar papa dextrosa (APD) aquellas cepas que cumplieron con las condiciones aceptables del control de calidad y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 días (Rojas *et al.*, 2018; Suzuki *et al.*, 2016).

Procedimiento:

Se estandarizó el protocolo de extracción Quick CTAB con algunas modificaciones basadas en Rodrigues *et al.* (2018), Zhang *et al.* (2015) y Scheufen *et al.* (2015).

- Con asas de siembra estériles, se tomaron 1-10 mm³ de micelio y se lavó con etanol 70%.
- El material fue colocado en microtubos de 1.5 mL junto a cuatro perlas de vidrio, se agregó 500 µL de buffer CTAB 2X (con 2 µL de mercaptoetanol) y se adicionó 10 µL de proteinasa K.
- Se vortexó durante 10 minutos utilizando Thermo Scientific® agitador-vórtex.

- Se incubó en baño María en el Eppendorf® Thermomixer a 60°C por 60 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Se centrifugó en Eppendorf Centrifuge 5418® a 14000 rpm por 10 minutos y se colectó el sobrenadante en un microtubo nuevo. Se repitió este proceso.
- Luego, se añadió 500 µL de la solución cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 para realizar la extracción de las proteínas, agitando suavemente por inversión por 2 minutos.
- Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se colectó el sobrenadante en un microtubo nuevo. Se repitió este proceso.
- Se agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y se mezcló cuidadosamente con pipeta.
- Se precipitó el ADN agregando 2/3 volumen de isopropanol al 66%. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente para minimizar la co-precipitación de sales.
- Inmediatamente, se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C para prevenir el sobrecalentamiento de la muestra de ADN.
- Se descartó el sobrenadante por decantación cuidadosamente para no hacer caer el ADN.
- Realizar los lavados del ADN con etanol 70% y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y secar el pellet *overnight*.
- Agregar ARNasa A (20mg/mL) e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Eluir en buffer TE para su uso posterior.

3.2.4. Verificación de la calidad del ADN

Se realizó mediante la evaluación de la integridad, cuantificación y pureza del ADN extraído, los cuales definen que se haya realizado una adecuada extracción del ADN y afectan directamente la sensibilidad y reproducibilidad de la PCR.

En este aspecto, es importante contar con el aislamiento de ADN íntegro, con buen rendimiento, con un menor número de contaminantes y posibles inhibidores de PCR. Tales parámetros se midieron de la siguiente manera:

a. Integridad

El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas (Alejos-Velásquez *et al.*, 2014), por tal motivo se realizó la electroforesis en gel de agarosa a baja concentración, donde la visualización de una banda única cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN es indicativa que se encuentra íntegro. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un centímetro de ancho o un *smearing* en el carril de la muestra.

Procedimiento: La corrida electroforética fue realizada en gel de agarosa al 1% (Anexo 13) con tampón TBE 1X (Anexo 13) a 100V por 50 minutos y la tinción se realizó con bromuro de etidio al 1%. Para visualización y fotodocumentación se utilizó el transiluminador VILBERT LOURMAT® y el software E-Capt®.

Interpretación de los resultados:

- Presencia de una única banda de ADN definida en la parte superior del gel de agarosa indica ADN íntegro : Aceptable
- Mancha continua *smear* o múltiples bandas de ADN indica ADN fragmentado: No aceptable

b. Cuantificación y pureza

Mediante la espectrofotometría UV/visible a una absorbancia de A260 es posible cuantificar los ácidos nucleicos ADN y ARN. Asimismo se obtiene una estimación de la pureza del ADN por medio de la relación de la absorbancia (A260/A280). Valores menores a 1.8 indican la presencia de contaminantes como las proteínas, fenol u otros, que afectan la calidad del ADN durante la PCR (Alejos-Velásquez *et al.*, 2014).

Procedimiento: La cuantificación de la concentración de ADN obtenido se realizó en ng por μL mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000c®. La pureza fue estimada por la obtención de la proporción de las lecturas a 260 nm y 280 nm en el mismo equipo.

Interpretación de los resultados:

- Relación 260nm/280nm entre 1.8 a 2.0: Aceptable
- Relación 260nm/280nm menor a 1.8: No aceptable

3.2.5. Condiciones RAPD-PCR

La diversidad genética de *Sporothrix schenckii* utilizando marcadores moleculares RAPD ha sido descrito previamente por varios autores (Mesa-Arango *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2003, Kong *et al.*, 2006, Fernandes *et al.*; 2009), por ello se eligieron cuatro *primers* que exhibieron buenos resultados de discriminación polimórfica en los perfiles de ADN.:

Tabla 1: *Primers* utilizados en el estudio

<i>Primer</i>	Secuencia	Propuesto por:
OPBG-01	5'-GTGGCTCTCC-3'	Mesa-Arango <i>et al.</i> (2002)
OPBG-14	5'-GACCAGCCCA-3'	Mesa-Arango <i>et al.</i> (2002)
OPBG-19	5'-GGTCTCGCTC-3'	Mesa-Arango <i>et al.</i> (2002)
OPD 18	5'-GAGAGCCAAC-3'	Fernandes (2009)

Condiciones de amplificación: El mix de reacción fue estandarizado a un volumen final de 25 uL, conteniendo 20ng de ADN genómico, 2.5 mmol MgCl₂, 200umol de dNTPs (Applied Biosystems® GeneAmp®), 100 pmol de cada primer (OPBG-01, OPBG-14, OPBG-19 y OPD-18, Biosearch Technologies, Inc.) y 1U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), fueron amplificadas en el termociclador Applied Biosystems® GeneAmp. La amplificación por RAPD-PCR fue repetida tres veces de forma independiente para cada *primer* y para todos los aislados, con el fin de verificar la repetibilidad de los perfiles de los productos de amplificación.

El programa de amplificación utilizado para los *primers* OPBG-01, OPBG-14 y OPBG-19 (Mesa-Arango *et al.*, 2002) fue el siguiente:

Denaturación inicial	94°C	2 minutos	1 ciclo
Denaturación	94°C	1 minuto	
Alineamiento	35°C	1 minuto	45 ciclos
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	7 minutos	1 ciclo

Mientras que el programa de amplificación para el primer OPD-18 (Liu *et al.*, 2006):

Denaturación inicial	94°C	2 minutos	1 ciclo
Denaturación	94°C	30 segundos	40
Alineamiento	34°C	1 minuto	ciclos
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	1 ciclo

La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2% peso/volumen, con tampón TBE 1X, a 110V durante 240 minutos. Se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler 100pb 0.5 ug/ µL (Thermo Scientific). Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio 1%; la visualización y documentación fueron realizadas en el sistema de fotodocumentación Vilber Lourmat y el software ECapt v. 15.0.

3.2.6. Análisis del polimorfismo RAPD

a. Procesamiento de datos binarios

El procesamiento de las imágenes se realizó con el software GelAnalyzer v19.1, el cual permitió la detección automática de líneas y bandas en los geles, realizar la corrección de distorsiones a través de curvas de calibración Rf, eliminar y/o definir el background de las imágenes, además cuantificar el peso molecular de las bandas mediante la calibración por ajuste de curvas paramétricas, tomando como referencia los marcadores de peso molecular. El *scoring* se realizó considerando sólo las bandas bien definidas y reproducibles; y se elaboró una matriz básica de datos binaria en *MsExcel* considerando el valor de “1” si hubo presencia de banda y “0” si hubo ausencia de banda. Se determinó el número de bandas polimórficas y el total de bandas por cada *primer*.

b. Porcentaje de polimorfismo (%P)

Es la proporción de bandas polimórficas y no polimórficas reveladas por un solo iniciador.

$$\%P = np / ntotal$$

Donde:

np : Número de loci/bandas polimórficas por iniciador

ntotal: Número total de loci/bandas por iniciador

c. Índice de polimorfismo (PIC)

Permite medir la capacidad de un marcador molecular para detectar el polimorfismo entre los individuos de una población, y cuanto mayor es esa capacidad, mayor es su valor, por ello es uno de los indicadores de la calidad de los marcadores en los estudios genéticos. Lemos *et al.*, 2019, proponen la siguiente clasificación de PIC para marcadores dominantes: bajo (0 a 0,10), medio (0,10 a 0,25), alto (0,30 a 0,40) y muy alto (0,40 a 0,50).

$$PIC = 1 - (p^2 + q^2)$$

Donde

p : frecuencia de bandas presentes

q : frecuencia de bandas ausentes

d. Índice del marcador (IM)

Se usa para determinar la utilidad total de un marcador molecular determinado (Varshney *et al.*, 2005). La utilidad de un marcador determinado es un equilibrio entre el nivel de polimorfismo detectado y la medida en que un ensayo puede identificar polimorfismos múltiples.

$$IM = PIC \times (\# \text{ bandas polimórficas})$$

3.2.7. Análisis de agrupamiento

Los datos de la matriz básica de datos fueron procesados mediante métodos estadísticos multivariados con el programa NTSYS-PC (versión 2.2; Exeter Software).

a. Matriz de similitud

Se utilizó la opción SIMQUAL del programa NTSYS-PC para realizar el análisis por pares y construir una matriz de similitud entre las UE, utilizando el coeficiente de *Jaccard* (S_j):

$$S_j = \frac{a}{a+b+c}$$

Donde:

a: número de bandas presentes en ambos individuos (1,1)

b: número bandas presentes en el primer individuo, pero no en el segundo (1,0)

c: número de bandas presentes en el segundo individuo pero no en el primero (0,1)

b. Método de agrupamiento UPGMA y representación gráfica

Se utilizó el método de ligamientos promedios o UPGMA (*Unweighted Pair Group of Arithmetic Mean*); seguido de un método de agrupamiento secuencial, aglomerativo, jerárquico y anidado SAHN (Sneath y Sokal, 1973) para formar un dendograma basado en el coeficiente de similitud de *Jaccard*.

c. Coeficiente de correlación cofenética (r)

Se realizó el análisis cofenético (Coph) para medir el grado de distorsión entre el dendograma y la matriz de similitud original (Palacio *et al.*, 2020). Asimismo, para validar la confianza del análisis de agrupamiento empleando el módulo MXCOMP del programa NTSYS.

3.2.8. Análisis estadístico: AMOVA

Se estimó la variabilidad genética inter e intra poblacional de *Sporothrix* usando el análisis de varianza molecular (AMOVA) incluido en el programa GenAlEx 6.501 que se encuentra disponible gratuitamente online (Peakall and Smouse 2006; 2012). En el AMOVA se divide la varianza total en términos de covarianza entre grupos (σ^2_a), entre poblaciones dentro de grupos (σ^2_b) y dentro de poblaciones (σ^2_c) según:

$$\sigma^2_t = \sigma^2_a + \sigma^2_b + \sigma^2_c$$

El nivel de diferenciación entre pares de poblaciones fue calculado con el índice Φ_{ST} , análogo al F_{ST} de Wright (Wright, 1969). La significancia estadística se probó en 1000 permutaciones al azar, para obtener un valor p. Los cálculos fueron realizados en el programa GenAlEx 6.501 que se encuentra disponible gratuitamente online (Peakall and Smouse 2006; 2012).

Tabla 2: Variables estadísticas del análisis AMOVA

Fuente de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variancia	Porcentaje de variabilidad
Entre poblaciones	P-1	SC (EP)	$n\delta^2_a + \delta^2_b$	**
Dentro de poblaciones	N-P	SC (DP)	δ^2_b	
Total	N-1	SC (T)	δ^2_T	
** diferencias genéticas altamente significativas				

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el año 2000, Pappas y colaboradores presentan a Abancay - Apurímac como una zona hiperendémica de esporotricosis con una incidencia anual de 48-60 casos por 100 000 habitantes entre 1995- 1997; mientras que entre 1998-1999 la incidencia fue 98 casos por 100 000 habitantes según Lyon y col. (2003). Estudios epidemiológicos posteriores muestran que Cajamarca también es una zona hiperendémica, con un 32% de los casos reportados y seguido de Apurímac con un 19% de los casos de esporotricosis (Oyarce *et al.*, 2014).

Las cepas clínicas utilizadas en este estudio provienen de éstas dos regiones hiperendémicas del Perú y fueron aisladas de biopsias, aspirados linfáticos y raspados de lesiones de pacientes niños y adultos que presentaron las formas clínicas cutáneo- fija y linfática; que fueron remitidas al Instituto Nacional de Salud para el diagnóstico especializado.

La identificación de las cepas y la catalogación de las mismas en la micoteca del Laboratorio de Micología-INS se basó en la macroscopía, micromorfología y confirmación del dimorfismo, clasificándolas como *Sporothrix schenckii*. Sin embargo, llamó la atención que siendo de la misma especie, existan diferencias que en algunos casos predominan por origen geográfico (Datos del Instituto Nacional de Salud). Por ello, se evaluará la diversidad genética de las cepas de origen peruano lo cual genera evidencia científica de la existencia de diferentes genotipos, incluso diferentes especies de *Sporothrix* sp. circulando en nuestro país.

4.1. Reactivación y recuperación de cepas clínicas de *S. schenckii*

La reactivación y recuperación de cepas es la primera etapa de todo estudio de caracterización de un cepario. De las 111 cepas de *S. schenckii* utilizadas inicialmente se logró recuperar 87 cepas viables y puras, cuya información se muestra en el Anexo 1. Las cepas recuperadas equivalen al 78,4% del total, y de acuerdo al origen geográfico, se recuperó el 82,6% (n=19) de las cepas de Apurímac y el 77,2% (n=68) de las cepas procedentes de Cajamarca.

Tabla 3: Resultados de la recuperación de cepas reactivadas de Apurímac y Cajamarca

ORIGEN	INICIAL	CONTAMINADAS	NO VIABLES	RECUPERACIÓN
APURÍMAC	23	2	2	19
CAJAMARCA	88	13	7	68
Total	111	Total recuperadas		87

De las 111 cepas iniciales, 15 cepas estaban contaminadas con hongos ambientales y a pesar de repiques sucesivos, suspensiones en solución salina y uso del agar Mycosel no se pudieron recuperar. Mientras que 9 cepas fueron no viables a pesar de los intentos de resiembras en medio líquido (caldo Sabouraud) con agitación para estimular el crecimiento.

4.2. Control de calidad

Como parte del control de calidad de las cepas que lleva a cabo el Laboratorio de Referencia Nacional de Micología – INS, se realizó el análisis de la microscopía, los ensayos del dimorfismo, producción de melanina, presencia de gelatinasas y actividad ureasa; de los cuales se obtuvo resultados importantes objetos de discusión y que complementan los datos obtenidos con marcadores moleculares.

4.2.1. Microscopía

Los resultados de la microscopía se detallan en el Anexo 2, se muestran imágenes de microscopía en la Figura 10. En las cepas procedentes de Apurímac, predomina las conidias con forma subglobosa u obovoide (9/19) y no se encontró conidias triangulares o cuneiformes. Mientras que en las cepas procedentes de Cajamarca se encontró las cuatro formas de conidias pero predomina las que tienen forma elongada (31/68).

Los resultados de la disposición de las conidias (Tabla 4) de las cepas de Apurímac muestran que predominan los ramilletes o disposición simpodial (18/19). Mientras que la cepa 19 presentó 2 tipos: ramillete y simpodial. Similarmente, en las cepas de Cajamarca predominó la disposición en ramillete (60/68) y en menor cantidad la disposición agrupada (3/68), sésiles (2/68) y más de un tipo (3/68).

Tabla 4: Resumen de la morfología de las conidias según origen

Origen	Globosa (1)	Triangular (2)	Elongada (3)	Subglobosa (4)	Más de un tipo	Total
Apurímac	4 (21%)	0	6 (32%)	9 (47%)	0	19
Cajamarca	4 (6%)	1 (1%)	31 (46%)	25 (37%)	7 (10%)	68

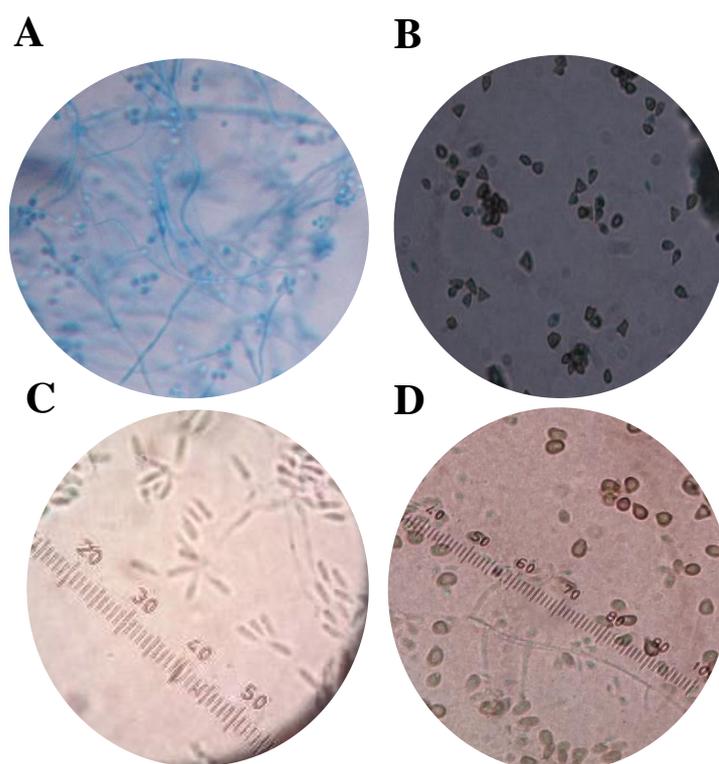


Figura 10: Morfología microscópica de las conidias A) globosa, B) triangulares, C) elongadas y D) subglobosas. Tinción con azul de lactofenol. Microscopio óptico G.A. 1000X

Tabla 5: Resumen de la disposición de conidias según origen

Origen	Ramillete (R)	Sésiles (S)	Agrupadas (AG)	Más de un tipo	Total
Apurímac	18	0	0	1	19
Cajamarca	60	2	3	3	68

En investigaciones previas, se examinó la morfología de las conidias sésiles y se encontró diferencias marcadas entre clados que, sumado a pruebas fisiológicas, permitió la diferenciación entre especies crípticas recibidas inicialmente como *Sporothrix schenckii* (Marimon *et al.*, 2007). Es importante recalcar que: utilizar sólo la observación microscópica como criterio para clasificar a *Sporothrix* podría inducir al error, debido a que hay otros

hongos como *Ophiostoma*, *Hyalorhinocladiella*, *Pesotum* y *Quambalaria* (clínicamente relevante) que tienen el mismo patrón morfológico (Figura 5) (Rodrigues AM, 2015). Además, la diversidad a nivel intra e interespecífico, puede ser resultado de interacciones con el medio ambiente y los factores estresores propios del origen geográfico.

El resumen de las mediciones del área conidial se encuentra en la Tabla 6 y la Figura 11.

Tabla 6: Resumen de medidas promedio (μm^2) del área conidial

Origen	Media \pm SEM	Mediana	Mín.	Max.
Apurímac	5.42 \pm 0.37	5.11	2.48	8.48
Cajamarca	6.41 \pm 0.28	5.99	1.69	10.88

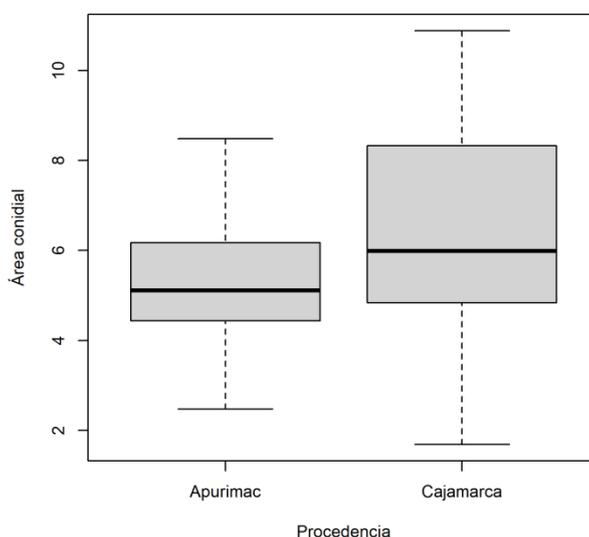


Figura 11: Medidas promedio (μm^2) del área conidial de las cepas según origen.

Según el estudio de Marimon *et al.* (2007), donde evaluó 127 cepas procedentes de Brasil, España, Reino Unido, Italia e India, indicó que las formas saprofíticas de *Sporothrix* generalmente tienen disposiciones sésiles y simpodiales, mientras que la forma de la conidia es muy variable (globosa, subglobosa, elipsoidal, triangular, etc) pero predomina de manera general la obovoide. Similarmente, los resultados de la microscopía (Anexo 2) señala que hay diferencias importantes en la morfología de las conidias y además están relacionadas al origen. En la Tabla 4 se resume los resultados: en las cepas de Apurímac predomina la forma subglobosa (47%) seguido de la forma globosa (21%), mientras que en Cajamarca se encontró en mayor cantidad las conidias elongadas (46%). Con respecto a la disposición de las conidias (Tabla 5), tanto en Cajamarca (60/68; 88,2%) y Apurímac (18/19; 94,7%), predomina la disposición simpodial.

La caracterización microscópica destacó un hecho interesante no reportado a la fecha con respecto al tamaño de las conidias de *Sporothrix schenckii* de origen peruano, mostrando diferencias relacionadas al origen geográfico. En la Tabla 6 y Figura 11 se observa, que el área conidial de las cepas de Apurímac oscila entre $2.48 \mu\text{m}^2$ y $8.48 \mu\text{m}^2$ con un promedio de $5.42 \pm 0.37 \mu\text{m}^2$, mientras que las provenientes de Cajamarca son más grandes, con medidas entre $1.69 \mu\text{m}^2$ y $10.88 \mu\text{m}^2$, y con un promedio de $6.41 \pm 0.28 \mu\text{m}^2$, incluso cinco cepas tienen áreas conidiales mayores a $10 \mu\text{m}^2$. Sobre este aspecto, los estudios de: Mesa-Arango y colaboradores (2002), muestra mediciones de 44 cepas de México, Guatemala y Colombia; mientras que Fernandes y colaboradores (2009) realiza una comparación con sus resultados de 151 aislados brasileros. Al analizar los datos del área conidial (μm^2) obtienen los siguientes resultados promedio (México = $3.98 \mu\text{m}^2$; Guatemala = $7.69 \mu\text{m}^2$; Colombia = $7.20 \mu\text{m}^2$; Brasil = $2.39 \mu\text{m}^2$). En comparación con los resultados de este estudio, los aislados de Cajamarca y Apurímac se asemejarían a los de Guatemala y Colombia mostrando una mayor área conidial, estos hallazgos respaldan la gran diversidad morfológica de este hongo.

4.2.2. Ensayo de termotolerancia y dimorfismo

La totalidad de las cepas demostraron termotolerancia a 37°C y dimorfismo de fase micelial a fase levaduriforme. En algunas de ellas fue necesario realizar hasta cinco subcultivos sucesivos en medio agar infusión cerebro-corazón BHI suplementada con sangre de carnero al 10% (Fig. 13). Se obtuvo colonias de consistencia cremosa de coloración blanquecina y apariencia brillante (Fig. 12 y 13). Se observaron levaduras ovaladas, alargadas y con brotes (Fig. 14); con un tamaño promedio de $2.69 \times 8.76 \mu\text{m}$.

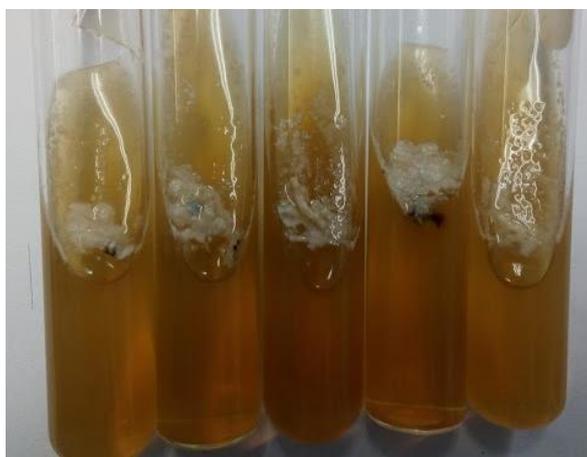


Figura 12: Cultivos de *S. schenckii* en medio agar infusión cerebro corazón BHI 30 días de incubación a 37°C .

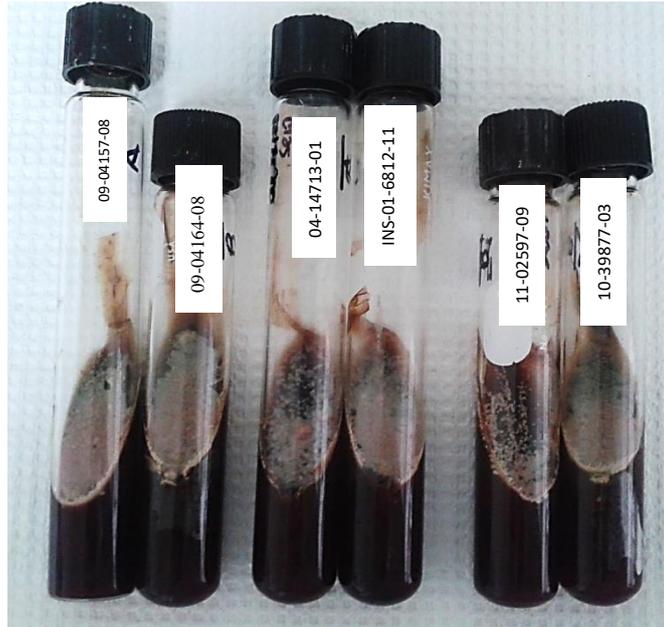


Figura 13: Subcultivos de la fase levaduriforme en agar infusión cerebro corazón suplementado con sangre de carnero al 10%, quinto repique con 7 días de incubación a 37°C.

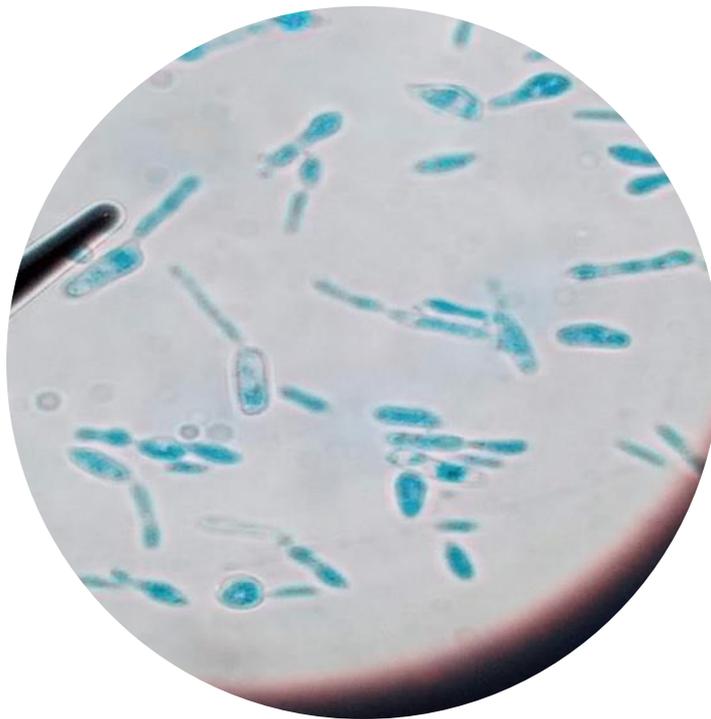


Figura 14: Microscopía de levaduras de *S. schenckii*. Tinción con azul de lactofenol. Microscopio óptico G.A. 1000X

La transición de fase filamentosa a levadura también llamada dimorfismo es considerado como un importante factor de virulencia que permite reconocer a las especies patogénicas, y es un atributo que le permite la adaptación del hongo a condiciones ambientales adversas (Bareja, 2015; Rodrigues, 2010). Una temperatura de 37°C, un medio rico en vitaminas y

aminoácidos; y una atmósfera húmeda son tres condiciones fundamentales para lograr el dimorfismo de *Sporothrix* (Bareja, 2015; Fisher y Cook, 1998). Con este fin, se realizó subcultivos de la fase filamentosa en el medio de cultivo infusión cerebro-corazón BHIA, sin embargo no se obtuvo la transición completa a levadura en los primeros 30 días de incubación; probablemente debido a que el medio de cultivo no es capaz de proveer todos los nutrientes disponibles *in vivo* en el hospedero (Rodrigues, 2010). Por ello, fue necesario realizar hasta cinco subcultivos de siete días de incubación a 37°C, en el medio infusión cerebro-corazón BHIA suplementado con sangre de carnero al 10%, para obtener la fase levaduriforme de *Sporothrix* (Bareja *et al.*, 2015). Finalmente se logró el dimorfismo a fase levaduriforme de la totalidad de las cepas, lo que respalda que las cepas son aisladas de muestras clínicas.

4.2.3. Producción de melanina

La producción de melanina está relacionada con el grado de pigmentación de las colonias de *S. schenckii*. Los resultados detallados se encuentran en el Anexo 3. Las diferencias más resaltantes indican que en el grupo de las cepas procedentes de Apurímac (n=19) predominan las albinas (6/19) que representa el 32%, mientras que en Cajamarca (n=68) representan el 15% (10/68). Sin embargo, un 40% (27/68) de las cepas de Cajamarca presentaron pigmentación marrón oscuro, en comparación del 21% (4/19) de cepas de Apurímac.

Tabla 7: Resultados del ensayo de producción de melanina según pigmentación de cepas de Apurímac y Cajamarca

Origen	Pigmentación				Total
	Albinas (-)	Marrón pálido (+)	Marrón oscuro (++)	Negras (+++)	
Apurímac	6 (32%)	5 (26%)	4 (21%)	4 (21%)	19
Cajamarca	10 (15%)	22 (32%)	27 (40%)	9 (13%)	68

La melanina es un importante factor de virulencia para muchos hongos patógenos. La presencia de este pigmento en la pared celular aumenta la supervivencia de los hongos en condiciones ambientales y parasitarias adversas (Téllez *et al.*, 2014). Romero-Martínez *et al.* (2000) mostró que conidias melanizadas de *S. schenckii* fueron menos susceptibles a la muerte por irradiación ionizante y por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en comparación con las conidias albinas, lo que apoya la idea de que la melanina en *S. schenckii* es un componente importante que protege a las células del daño químico y físico,

y sugieren que probablemente actúe como un eliminador de radicales libres en la realización de mecanismos de defensa fisiológicos.

Según los datos de SENAMHI, el índice promedio de radiación UV es ligeramente mayor en Cajamarca que en Apurímac lo que sugiere que las cepas de Cajamarca deberían producir mayor cantidad de melanina para protegerse de estas condiciones adversas. Los resultados concuerdan con este dato (Figura 15 y Tabla. 7); en el grupo de las cepas procedentes de Cajamarca predominan aquellas con pigmentación marrón pálido (32%) y marrón oscuro (40%), mientras que en el grupo de Apurímac predominan las cepas albinas (32%) seguido de las cepas con pigmentación marrón pálido (26%). Lo que indicaría que las cepas de *Sporothrix schenckii*. de origen peruano también presentarían varios mecanismos para controlar la producción de melanina: diversas vías de biosíntesis y uso de diferentes precursores (Romero-Martínez *et al.*, 2000; Almeida-Paes *et al.*, 2016). Y que además de la radiación UV, la mayor melanización en las cepas de Cajamarca estaría asociada con un aumento de la protección contra otras condiciones ambientales desfavorables también llamados “factores estresores” como: temperaturas extremas, pH, presión osmótica, grado de desecación, presencia de amebas del suelo (Téllez *et al.*, 2014; Almeida-Paes *et al.*, 2009).

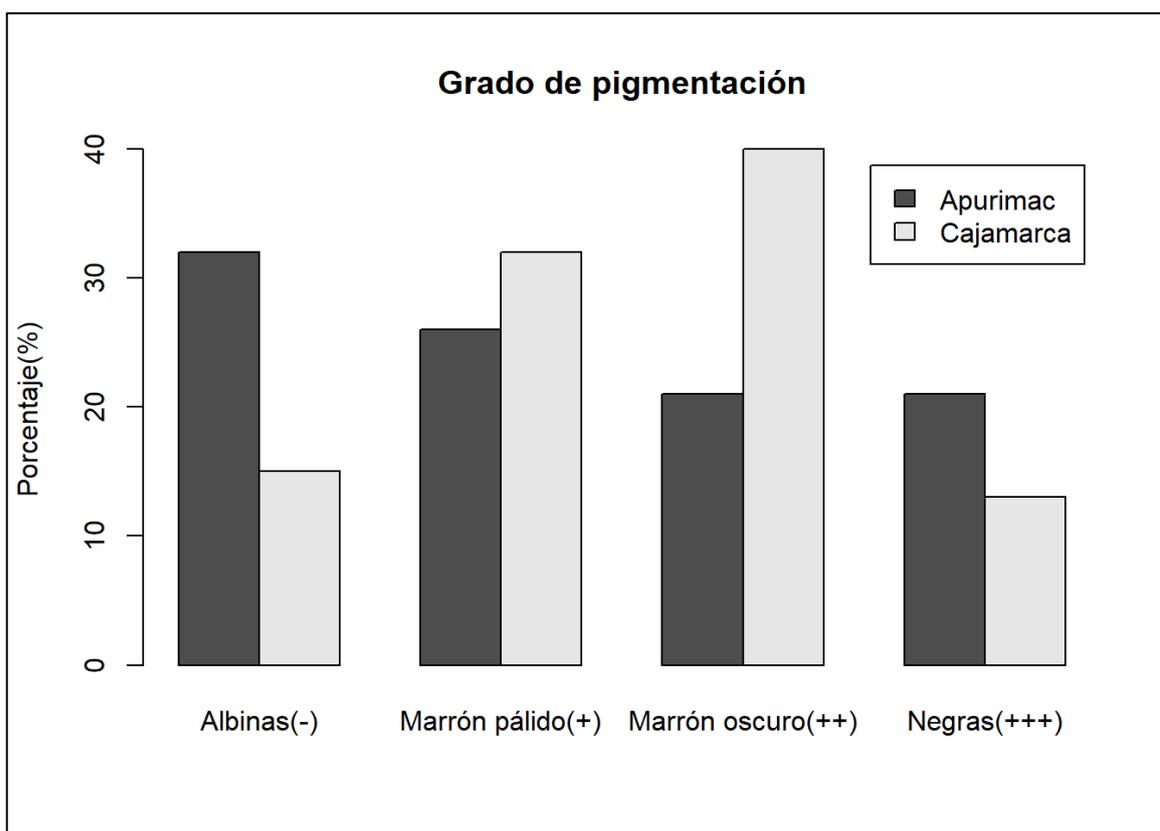


Figura 15: Grado de pigmentación y origen geográfico

Asimismo, debido a que la melanina tiene el potencial de proteger a las principales especies patogénicas humanas de *Sporothrix* spp. en contra de los efectos de los antifúngicos como la terbinafina (Almeida-Paes *et al.*, 2016); anfotericina B y los oxidantes derivados del nitrógeno (Almeida-Paes *et al.*, 2012) apoya la teoría de que la melanina es un importante factor de virulencia de este hongo. Si bien en los resultados (Tabla. 7), no se encontró una correspondencia exclusiva de melanización y origen geográfico, la característica de mayor melanización en cepas de Cajamarca en comparación con las de Apurímac podría estar relacionado a una mayor resistencia antifúngica, lo cual podría indagarse con datos clínicos y en ensayos de susceptibilidad posteriores.

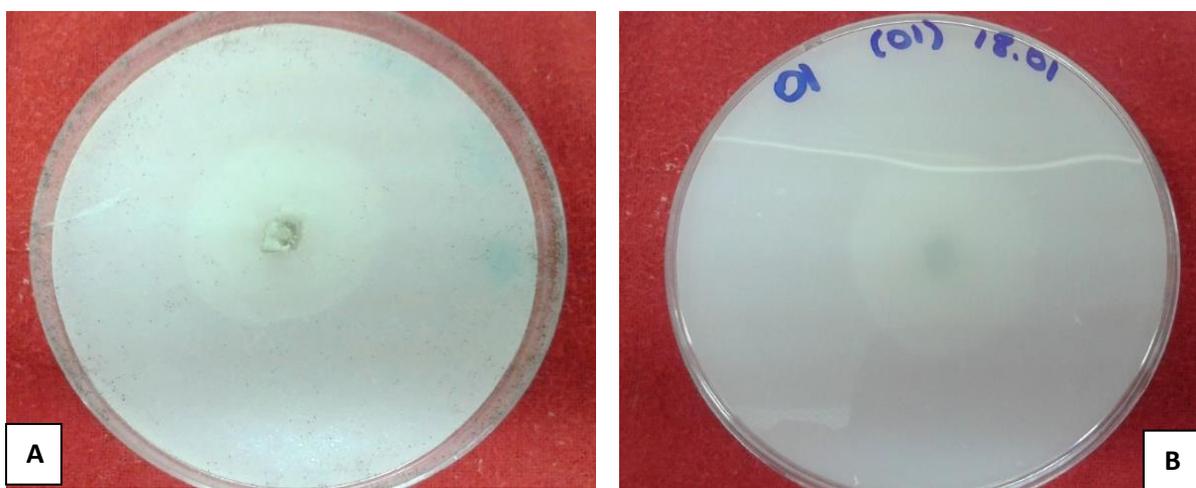


Figura 16: Colonias albinas (-) de *S. schenckii* en agar corn meal, incubadas 30 días a temperatura ambiente. A) anverso. B) reverso

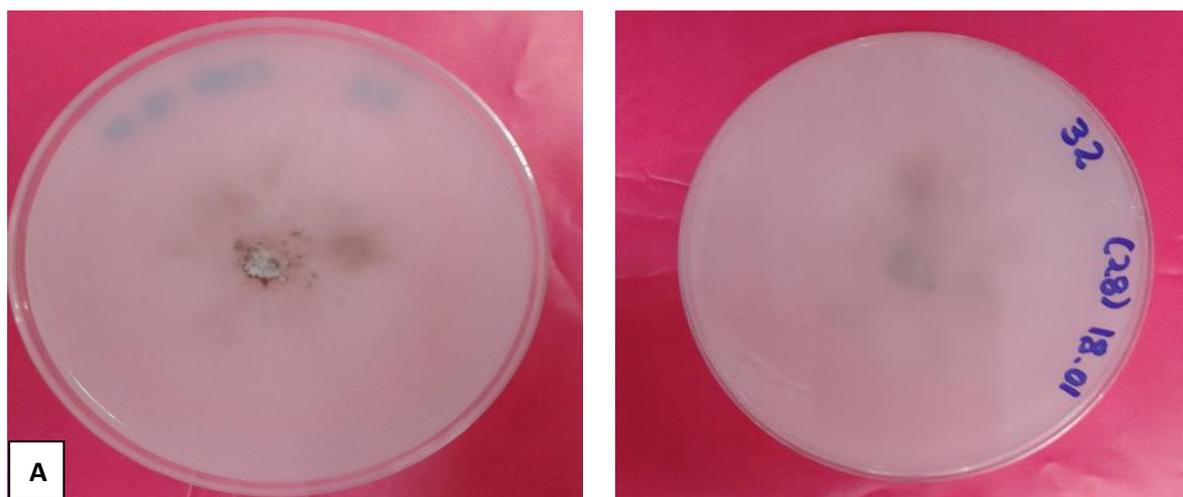


Figura 17: Colonias de *S. schenckii* con pigmentación marrón pálido (+), en agar corn meal, incubadas 30 días a temperatura ambiente. A. anverso. B. reverso

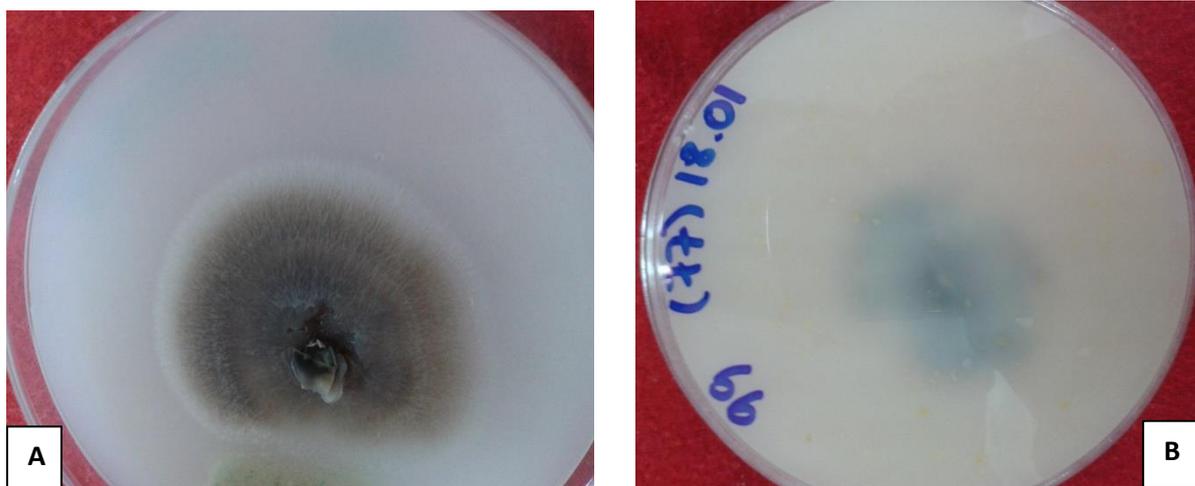


Figura 18: Colonias de *S. schenckii* con pigmentación marrón oscuro (++), en agar corn meal, incubadas 30 días a temperatura ambiente. A. anverso. B. reverso

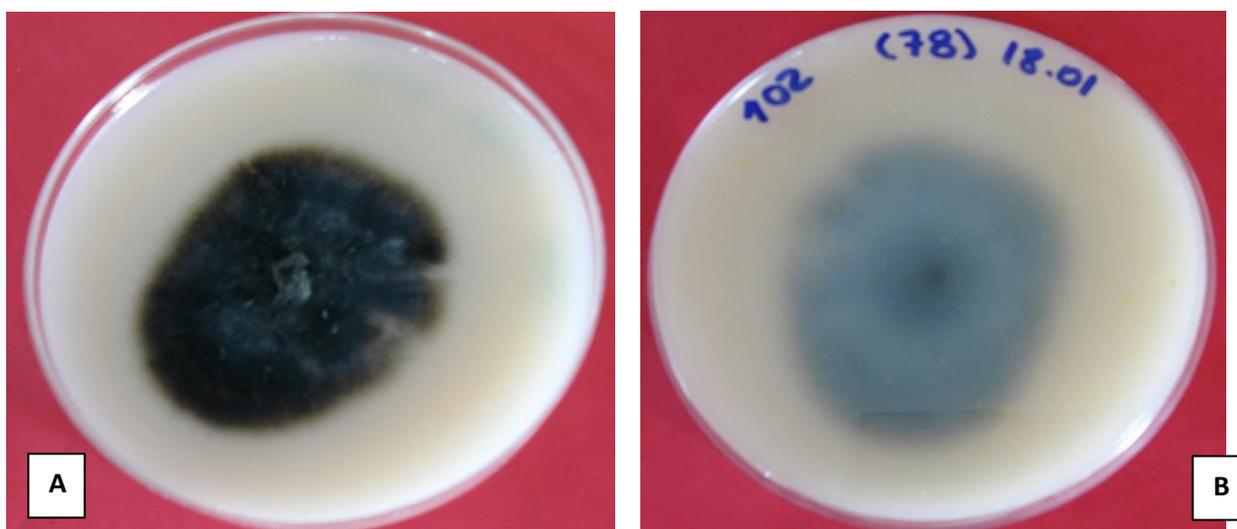


Figura 19: Colonias de *S. schenckii* con pigmentación negra (+++), en agar corn meal, incubadas 30 días a temperatura ambiente. A) anverso. B) reverso

4.2.4. Producción de gelatinasas

En el Anexo 5 se muestra los resultados del ensayo, las cepas con producción de enzimas gelatinasas son capaces de licuar la gelatina y tornarla líquida, lo cual se visualiza mediante la inversión de los tubos inmediatamente después de retirado de refrigeración (Figura 20). Por el contrario, las cepas que no producen gelatinasas mantienen la gelatina en estado sólido luego de su inversión (Figura 21). La Tabla 7 muestra los resultados del ensayo de licuefacción de la gelatina, de donde se observa que tanto Apurímac y Cajamarca muestra similar porcentaje de cepas con resultados positivos de 16% y 15% respectivamente. Las cepas con resultados positivos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Resumen de ensayo de licuefacción de la gelatina

Origen	Licuefacción de la gelatina		Subtotales
	(-)	(+)	
Apurímac	16 (84%)	3 (16%)	19
Cajamarca	58 (85%)	10 (15%)	68

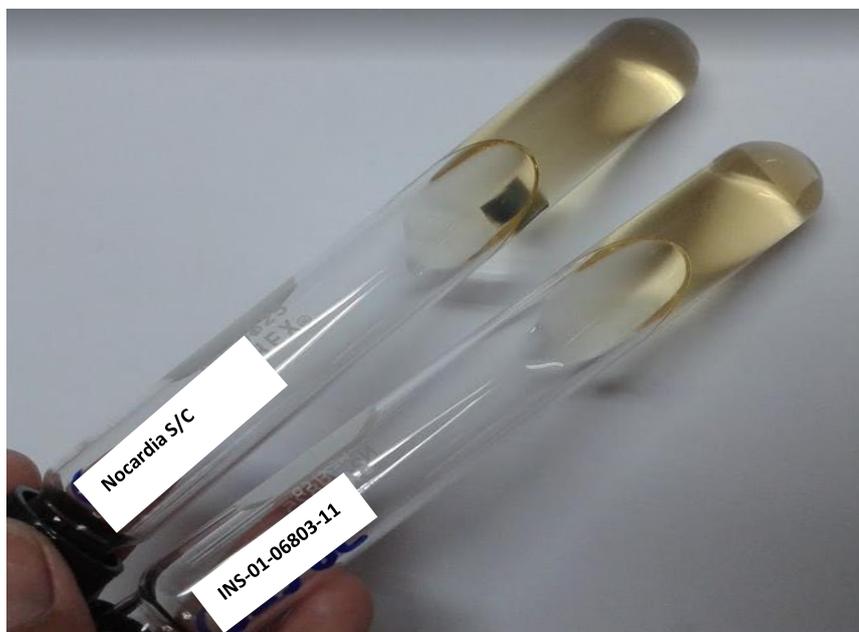


Figura 20: Gelatinasa positiva: Control positivo *Nocardia* S/C e INS-01-06803-11



Figura 21: Gelatinasa negativa: Cepa control 10-10198-09 y 05-07166-11

Tabla 9: Cepas de *S. schenckii* gelatinasa positiva

Apurímac	Cajamarca
06-32900-05	08-09784-08
	04-00564-09
	01-06803-11
	01-06804-11
06-32904-05	01-06818-11
	02-00327-11
	03-20466-11
01-34822-14	05-03392-13
	01-23357-15
	02-22589-15

Las gelatinasas hidrolizan la proteína derivada del tejido conectivo causando daño en la barrera epitelial del hospedero, lo cual altera la morfología e integridad de las células hospederas, facilitando el proceso de invasión del hongo (Sabanero - López *et al.*, 2018). Sin embargo, las gelatinasas también participarían en la infección mediante la eliminación de mecanismos de las defensas inmunológicas y/o ayudando a obtener nutrientes para la supervivencia (Da Rosa *et al.*, 2009; Tronchin *et al.*, 2008) conformando así un importante factor de virulencia de *Sporothrix* que ha sido ampliamente estudiado. En el estudio de Ghosh *et al.* (2002), analizaron 49 cepas procedentes de tres regiones de la India de las cuales ninguna de ellas presentó actividad gelatinasa. Igualmente, Almeida-Paes *et al.* (2015) obtuvo resultados negativos para las 71 cepas procedentes de tres estados de Brasil.

Sin embargo, en este estudio los resultados indican que 13 del total de 87 cepas (15%) presentan actividad gelatinasa. De las cuales, 3/19 procedentes de Apurímac y 10/68 de Cajamarca fueron gelatinasas positivo (Tabla 9), lo cual indicaría que la presencia de este factor de virulencia no guarda relación con el origen geográfico y que su presencia es variable. Resultados similares mostraron Fernandes *et al.* (2009) donde el 15.78% de cepas (3/19) procedentes de diferentes estados de Brasil tuvieron actividad gelatinasa positiva. Asimismo, en el estudio de Mendoza *et al.* (2005) no obstante la muestra fue pequeña, constataron que 2 de las 5 cepas de Venezuela fueron productores de gelatinasa. Estos resultados son importantes para entender los aspectos medioambientales y epidemiológicos de *Sporothrix* por cada cepa en estudio y hacen posible el aislamiento selectivo de este hongo (Ghosh *et al.*, 2002).

4.2.5. Actividad ureasa

La actividad ureasa se evidenció a través del viraje de coloración de naranja a rosado intenso del medio agar urea de Christensen, los resultados muestran que la totalidad de las cepas tienen actividad ureasa positiva (Anexo 6), al igual que el control positivo INS-10-22003-16 *Cryptococcus neoformans*. En la Figura 22 se detecta la actividad ureasa mediante el viraje de color del medio agar urea de Christensen a tan sólo dos días de incubación a 37°C y la Figura 23 muestra los resultados a los siete días de incubación.

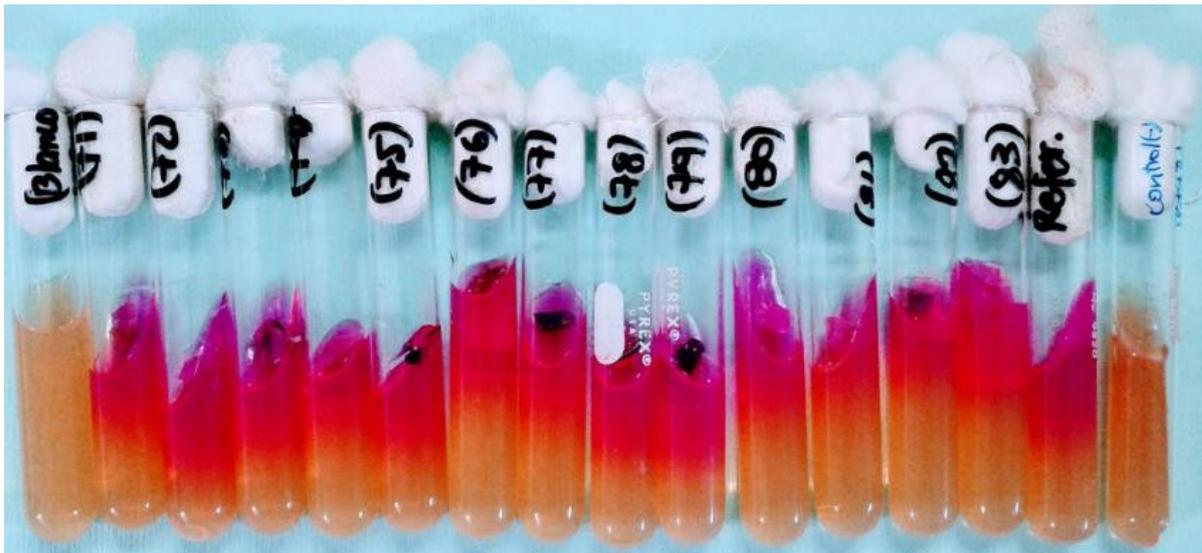


Figura 22: Ensayo de la ureasa en medio agar urea de Christensen con inóculos de las cepas en estudio, con dos días de incubación a 37°C.



Figura 23: Ensayo de la ureasa en medio agar urea de Christensen con inóculos de las cepas en estudio, con siete días de incubación a 37°C.

El rol de la ureasa como factor de virulencia se basa en que la actividad enzimática produce amoníaco intracelular y lo libera al medio extracelular, lo cual causa una reducción en la acidificación y es fundamental para la conversión del hongo dimórfico *Coccidioides immitis*, que sería muy complicado en un medio ácido (Mobley *et al.*, 1995) de igual manera en *Sporothrix* spp. podría ser determinante para su dimorfismo (Oliveira 2006). Otra teoría sobre el rol de la ureasa, es que la acumulación de amoníaco en el interior de las células del huésped no permite la maduración de los fagolisosomas en las células fagocíticas, lo que resulta en una pérdida de la muerte del patógeno y la presentación del antígeno, en consecuencia la evasión del sistema inmune (Rutherford, 2014). Una variedad de estudios son consistentes con este modelo, por ejemplo en *C. neoformans* (Osterholzer *et al.*, 2009) y *Co. posadasii* (Mirbod-Donovan *et al.*, 2006).

Los resultados de este estudio indican, que la totalidad de las cepas presentan actividad ureasa (Anexo 6), lo que concuerda con lo obtenido por Ghosh *et al.*, 2002; donde el análisis de 49 cepas de la India, evidenció actividad de ureasa detectable en la fase micelial y que ninguna de las cepas fue capaz de dividir la urea en la fase de levaduriforme parasitaria. Asimismo, Mendoza *et al.*, 2005 estudió el comportamiento fisiológico in vitro de aislamientos de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación y luego de la reactivación, observó que conservaron su actividad ureasa a través del tiempo. Marimon *et al.*, 2007 utilizó un panel de 120 cepas de *Sporothrix* spp. de distintos orígenes geográficos y Fernandes *et al.*, 2009, incluyó 151 cepas de distintas regiones de Brasil, los resultados de ambos estudios indicaron que el 100% de las cepas mostraron presencia de ureasa; lo cual sugiere que esta enzima tiene un rol importante en la virulencia de este hongo.

4.3. Extracción de ADN genómico

Debido a que se utilizó la fase micelial de *Sporothrix schenckii* que incluye hifas y conidias del hongo con varios días de crecimiento, se acumula gran cantidad de proteínas, elementos contaminantes, como melanina y polisacáridos, y una colonia de aspecto acartonada de difícil disolución. Por ello luego de un piloto realizado y la estandarización del protocolo de extracción de ADN (datos no mostrados) se observó que la lisis celular fue el paso más crítico en esta etapa. Los mejores resultados se obtuvieron mediante el método Quick CTAB con modificaciones. Resultados similares obtuvo Rodrigues *et al.* (2018) al evaluar distintos protocolos de extracción de ADN de hongos ambientales y sugiere que el uso del CTAB junto a la disrupción mecánica con perlas de vidrio permiten la obtención de altas

concentraciones de ácidos nucleicos. Este detergente auxilia en el proceso de remoción de contaminantes tales como polisacáridos y es probablemente el único compuesto que puede separar los ácidos nucleicos parciales de los polifenoles (Umesha *et al.*, 2016); sumado al aumento de temperatura de incubación 60°C, provoca la desnaturalización de las proteínas. Además, la extracción con solvente orgánico utilizando la mezcla cloroformo-álcool isoamílico ayudó a separar las dos fases: acuosa que contenía el ADN y la fase orgánica: proteínas, polisacáridos y pigmentos (Ferreira y Grattaplagia, 1998). Se adicionó un paso de salting-out con acetato de sodio 3M y precipitación con isopropanol lo que permitió obtener la pureza adecuada de las muestras.

4.4. Verificación de la calidad de ADN

Para evaluar la integridad del ADN extraído se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% y se obtuvo bandas únicas y definidas en la parte superior del gel de agarosa (Figura 24). Al cuantificar la concentración del ADN genómico utilizando el NanoDrop 2000c®, las muestras presentaron concentraciones entre 31.5 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ y 81.2 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$. Se realizó la medición de la relación de la absorbancia a 260nm/280nm como indicativo de la pureza del ADN extraído. Todas las muestras mostraron valores entre 1.8 y 2.0 según los resultados del Anexo 8.

Clark y Christopher (2000) manifiestan que, para la determinación espectrofotométrica de la pureza del ADN, se utiliza la proporción de las absorbancias a 260 y 280 nm. Generalmente se considera una proporción de ~ 1.8 como "puro" para el ADN y valores por encima de este número indicarían la presencia de ARN, lo cual también se evalúa con una electroforesis en gel de agarosa. Por otro lado, valores por debajo de 1.8 frecuentemente indican la presencia de contaminantes como proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente a 280nm o cerca de ellos (NanoDrop, 2009). Sin embargo, Zhang *et al.*, 2013, indica que este resultado no es exclusivo indicador de la pureza del ADN, sino que se complementa con la concentración del material genético obtenido. En este trabajo, el protocolo de extracción fue optimizado para lograr que todas las muestras presentaran las medidas de absorbancias 260 nm/280 nm en el rango aceptable de 1.8-2.0 (Anexo 8), para ser utilizadas en el ensayo de amplificación por PCR.

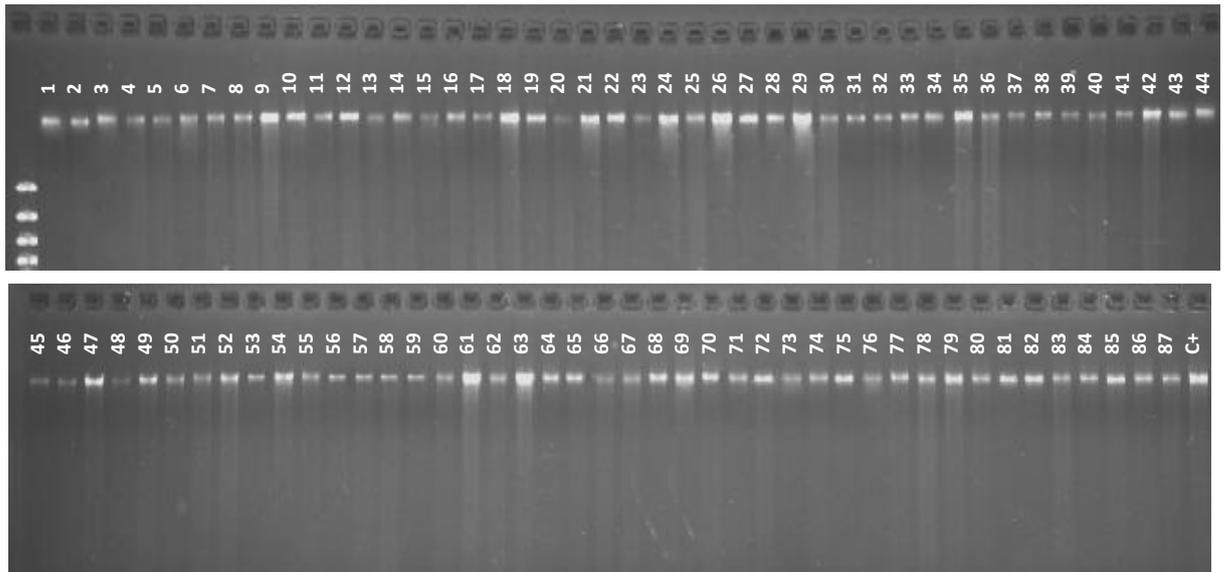


Figura 24: Integridad del ADN extraído. Geles de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio

4.5. Análisis de polimorfismo RAPD

La identificación de *Sporothrix schenckii* se realizaba convencionalmente utilizando técnicas fenotípicas como: morfología microscópica y macroscópica, termotolerancia y marcadores bioquímicos (Rippon, 1990; Dixon, 1991), las cuales han sido útiles para diferenciar grupos dentro de las especies, pero eran de insuficiente resolución para distinguir individuos dentro de una población. Sin embargo, las técnicas genotípicas son más sensibles y específicas debido a que son un análisis directo del ADN de los cromosomas o de los elementos genéticos extra-cromosómicos. Estos marcadores son un sistema útil para examinar la diversidad entre y dentro de las especies, la estructura poblacional y permite estudiar el origen y evolución de los aislados (Mora-Montes *et al.*, 2015).

Los cuatro *primers* utilizados para la RAPD-PCR: OPBG-01, OPBG-14, OPBG-19 y OPD-18 generaron productos de amplificación que se visualizaron como perfiles de bandas reproducibles y polimórficos entre los aislados (Figura 25 y Figura 26). Las bandas obtenidas en los geles de agarosa se evaluaron como “1” cuando hubo presencia y “0” cuando hubo ausencia de ellas, se realizó el *scoring* y se elaboró la matriz básica de datos (Anexo 9). El criterio para seleccionar las bandas fue la reproducibilidad y la repetibilidad observada en los resultados. En tal sentido, se generó un total de 70 bandas; siendo OPBG-01 el primer con la mayor cantidad: 24 bandas en el rango de ~220pb a ~2900pb.

En la Tabla 10 se encuentran los parámetros de descripción de los cuatro *primers* utilizados, en donde se observa que la utilización de estos marcadores RAPD permitió detectar un alto porcentaje de polimorfismo entre 86.7% y 100%, indicando un alto nivel de variación genética existente entre los individuos analizados. Además, se presentan los valores de contenido de información polimórfica (PIC) que es la medida del grado de información y provee un estimado del poder discriminante que brinda un marcador genético, el cual depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas (Nagy *et al.*, 2012). Los valores de PIC para marcadores dominantes se encuentran entre 0 y 0.5 debido a que no permiten determinar la heterocigocidad; se considera que valores menores a 0.15 son no informativos (De Riek *et al.*, 2001). Los valores de PIC obtenidos son mayores o iguales a 0.15: OPBG-1 (0.20), OPBG-14 (0.15), OPBG-19 (0.16) y OPD-18 (0.18), de donde se infiere que los cuatro *primers* utilizados son informativos.

Mientras que Fernandes (2009) utilizó el mismo programa de amplificación para todos los *primers*: denaturación a 94°C por 1 minuto, temperatura de annealing de 35°C y 45 ciclos; en este estudio se utilizó el programa de amplificación propuesto por Liu *et al.* (2003) para el primer OPD-18 y el propuesto por Mesa-Arango *et al.* (2002) para OPBG-01, OPBG-14 y OPBG-19. Además se utilizó concentraciones diferentes de los componentes de la reacción PCR. Lo que demuestra que la técnica RAPD-PCR es muy sensible a los cambios sutiles en las condiciones de amplificación y depende de protocolos de laboratorio cuidadosamente desarrollados para ser reproducible (Senthil-Kumar y Gurusubramanian, 2011).

Tabla 10: Parámetros de descripción de los *primers* utilizados

<i>Primer</i>	Total de bandas/i iniciador	#bandas polimórficas/ iniciador	% Polimorfismo	Tamaño de banda (pb)	Contenido de información polimórfica (PIC)	Índice del marcador
OPBG-01	24	24	100%	~220-2900	0.20	4.79
OPBG-14	15	13	86.7%	~215-2000	0.15	1.95
OPBG-19	13	13	100%	~490-2500	0.16	2.03
OPD 18	15	13	86.7%	~235-1190	0.18	2.34

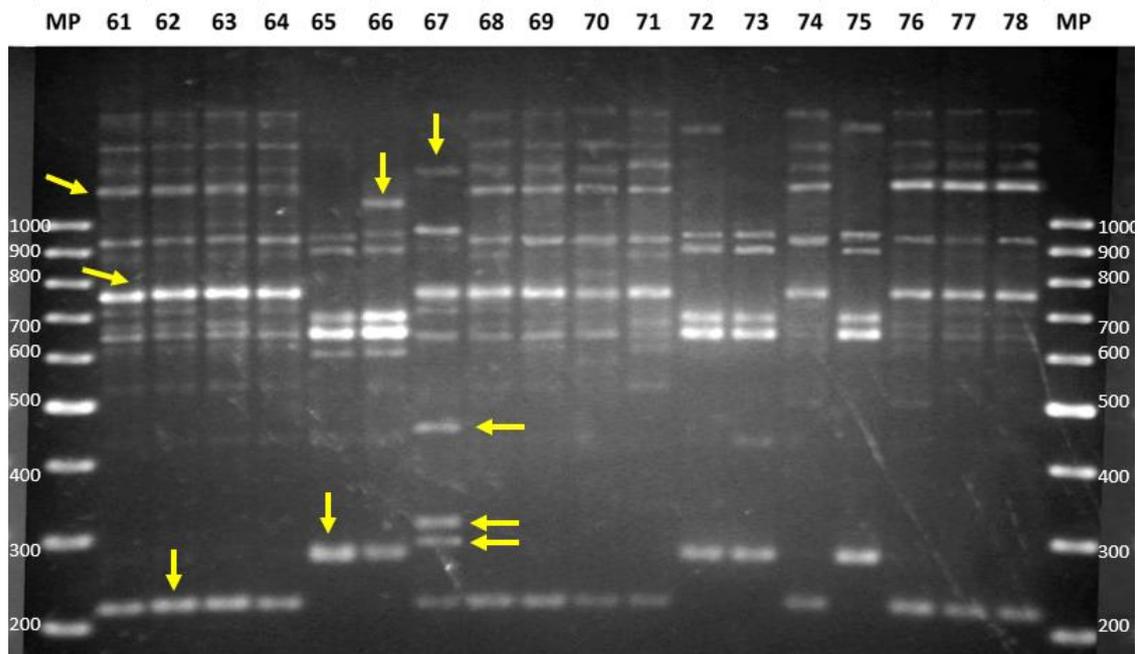


Figura 25: Patrón de marcadores RAPD con el primer OPBG-01 de 18 cepas de *Sporothrix schenckii* de acuerdo al Anexo 1. Las flechas indican bandas polimórficas, (MP) es el marcador de peso molecular 100 pb.

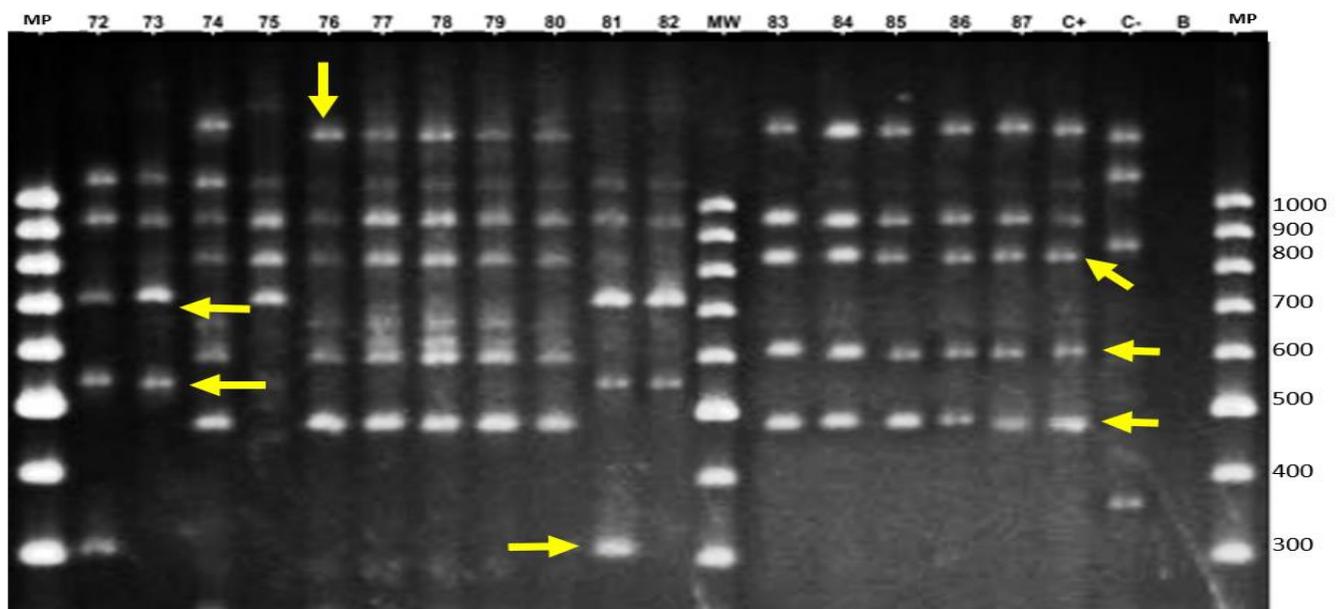


Figura 26: Patrón de marcadores RAPD con el primer OPBG-14 de 16 cepas de *S. schenckii*. Las flechas indican bandas polimórficas. (C+) Control positivo *S. schenckii* 10-10198-09. (C-) control negativo *Aspergillus* sp. INS-05-00991-15. (B) blanco. (MP) marcador de peso molecular 100 pb.

Sin embargo, el Índice de marcador (IM) toma como referencia el nivel de polimorfismo detectado y la medida en que un ensayo es capaz de identificar los polimorfismos múltiples; lo cual determina la utilidad total de un marcador molecular determinado (Varshney *et al.*, 2005). De los cuatro *primers* utilizados, OPBG-1 tuvo un IM mayor (4.79) que

conjuntamente con el valor PIC nos aporta mayor información y discriminación entre los aislados en los análisis de diversidad genética de *Sporothrix schenckii*.

Los *primers* utilizados ya han sido reportados en estudios previos: Mesa-Arango *et al.* (2002) utilizó los *primers* OPBG-01, OPBG-14 y OPBG-19 y obtuvo una correspondencia de genotipos RAPD-PCR y origen geográfico. Liu *et al.* (2003) obtiene un patrón de bandas conservado entre aislados de la misma área geográfica Nanjing-China utilizando el primer OPD-18. Kong *et al.* (2006) utilizó los *primers* OPBG-01 y OPBG-14 para discriminar aislados procedentes de tres formas clínicas y obtiene genotipos diferentes. Sin embargo, los resultados del presente estudio difieren de Fernandes (2009) que realizó un screening de seis *primers*: OPBG-1, OPBG-14, OPBG-19, OPA-11, OPD-18 y OPB-07 y señala que el primer OPD-18 tuvo mayor poder de discriminación y fue más informativo que los demás.

Esta diferencia se debe principalmente a la baja reproducibilidad, inherente de la técnica RAPD-PCR que necesita estandarizarse en condiciones de cada laboratorio. Entre los parámetros de la amplificación a ser tomados en cuenta tenemos: concentración y pureza del ADN fúngico, concentraciones de los componentes del master mix y el programa de amplificación (Cavagnaro y Masuelli, 2003; Kumar y Gurusubramanian, 2011).

4.6. Análisis de agrupamiento

Las relaciones genéticas obtenidas por el método de análisis UPGMA están representadas en el dendograma (Figura 27) en el cual es posible observar que el origen geográfico no determinó el agrupamiento de las cepas y a un coeficiente de similitud bajo se dividió en 2 grandes grupos (Grupo I y II).

Analizando el dendograma obtenido: en el grupo I a un coeficiente de similitud de 0.94 se formó 3 subgrupos I.1, I.2 y I.3 y a su vez se separaron cinco aislados atípicos 22_Caj_2001, 33_Caj_2008, 56_Caj_2011, 67_Caj_2011 y 83_Caj_2015. El subgrupo I.1 cuenta con 55 cepas que datan del año 2001 al 2015, tanto de Apurímac como de Cajamarca e incluye a la cepa control. Aquí, se encuentran agrupadas 14 cepas albinas y 5 con grado de pigmentación (+++); y también se encontró 6 aislados con producción de gelatinasas. El subgrupo I.2 cuenta con 16 cepas, todas procedentes de Cajamarca que datan del año 2011 al 2015. En este subgrupo también se encuentran 2 cepas con grado de pigmentación (+++) y una cepa gelatinasa positiva. El subgrupo I.3 está conformado por 2 aislados de Apurímac 11_Apu_2008 y 14_Apu_2008 la cual tiene grado de pigmentación (+++).

El grupo II, consta de 9 aislados que a un coeficiente de similitud de 0.69 se dividen en 2 subgrupos y también se encontraron 2 aislados atípicos 17_Apu_2014 (pigmentación +++ y gelatinasa positiva) y 59_Caj_2011 (pigmentación +++). El subgrupo II.1 comprende cinco aislados de Cajamarca del 2011, 2012 y 2013 y el subgrupo II.2 está conformado por dos aislados 81_Caj_2015 y 82_Caj_2015.

Es notable mencionar que en el grupo II, cinco de los nueve (55.6%) aislados incluidos presentan producción de gelatinasa y el 44.4% de los aislados de este mismo grupo presentan producción intensa de melanina (+++). Estos resultados llaman la atención debido a que la producción de melanina y la producción de enzimas extracelulares proteolíticas como la gelatinasa están relacionada al grado de patogenicidad y virulencia de *Sporothrix* (Almeida-Paes *et al.*, 2015; Naglik *et al.*, 2003).

Con respecto a la producción de gelatinasas, Fernandes (2009) evalúa con RAPD y características fenotípicas a 40 aislados de diferentes zonas de Brasil, de los cuales sólo tres expresan la enzima. Dos de ellas son aislados de la región Sudeste y uno de la región Norte asimismo uno de ellos pertenece a un genotipo RAPD particular a los demás. De igual manera, los resultados del presente estudio muestran que no hay una correspondencia con respecto al origen geográfico (Figura 26).

Kong *et al.* (2006) realizó un ensayo de inoculación en ratones BALB/c y RAPD-PCR con los *primers* OPBG-01 y OPBG-14 en 15 aislados de *S. schenckii* y sus resultados demuestran que los aislados de diferentes formas clínicas de esporotricosis presentan diferentes genotipos RAPD. Asimismo, los resultados de inoculación en ratones e *in vitro* realizado por Almeida-Paes *et al.* (2015) indicaron que los aislados de *S. brasiliensis* fueron más virulentos que *S. schenckii*, explicado en parte por la rápida y alta expresión de melanina y además por la expresión de proteasas extracelulares lo cual está involucrado en las diferentes manifestaciones clínicas de la esporotricosis. En el 2016, Almeida-Paes *et al.* mostró que la melanización protege de la acción de la anfotericina B, particularmente en las concentraciones más bajas ensayadas.

En este sentido, estas características son aspectos importantes que hay que evaluar en nuestros aislados debido a que se observa una mayor cantidad de aislados albinos con respecto a los pigmentados (+++) en el subgrupo I.1 y ningún aislado albino en el grupo II, lo cual podría ser relevante en la susceptibilidad antifúngica y sugiere que la variabilidad

genética puede estar relacionado a la virulencia, de tal manera que pueden representar potenciales patógenos emergentes en el futuro.

Para medir el grado de distorsión del agrupamiento, se calculó el coeficiente de correlación cofenética (coeficiente lineal de Pearson) entre la matriz de similitud que dio origen al dendrograma y la matriz cofenética que representa el dendrograma, el resultado es igual a 0.99 (Anexo 11).

Según Palacio y col. (2020) los valores de r superiores a 0,80 indican una buena representación de la matriz de similitud por parte del dendrograma y que la técnica del ligamiento promedio es la que origina menor distorsión. Por lo tanto, hay un buen ajuste y baja distorsión entre la matriz de similitud original y el dendrograma; y el método de agrupamiento UPGMA es el adecuado para los datos (Zambrano *et al.*, 2003; Crisci y López, 1983).

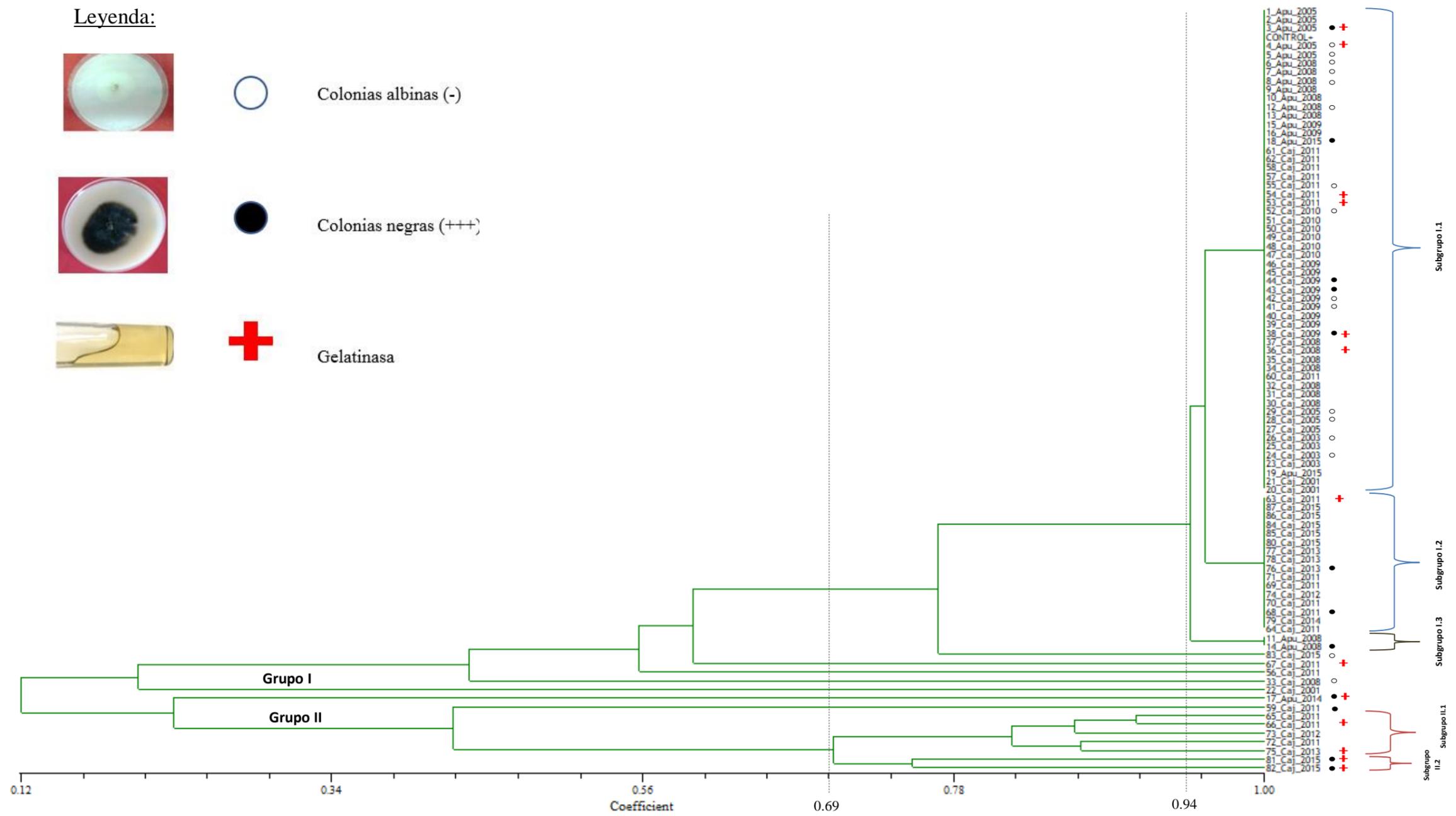


Figura 27: Dendrograma generado por análisis UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard de perfiles RAPD obtenidos de aislados de *S. schenckii*

4.7. Análisis de estructura genética poblacional (AMOVA)

Los resultados se encuentran resumidas en la Tabla 11, donde se observa que el porcentaje de variación entre las poblaciones de los aislados de Cajamarca y Apurímac es del 2%, mientras que el 98% de variación se encuentra cuando se analiza toda la población de 87 aislados. El nivel de diferenciación entre pares de poblaciones fue calculado con el índice Φ_{ST} equivalente al Φ_{PT} igual a 0.022 ($p=0.181$).

Los hallazgos previos de diferencias en la microscopía y pigmentación de la melanina, sugería la idea de que había una correspondencia entre el origen geográfico (Cajamarca y Apurímac) con genotipos de *Sporothrix schenckii*; sin embargo, la prueba de AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) mostró que el porcentaje de variación entre las dos poblaciones es bajo y que el mayor porcentaje de variación es individual y resulta al analizarse dentro de las poblaciones. Por lo que el nivel de diferenciación de 0.022 es muy bajo e indica que no existe una estructuración geográfica en los aislados de *S. schenckii* que se estudiaron y los genotipos descritos en el análisis de agrupamiento no se corresponden con la procedencia geográfica (Figura 27 y Tabla 11). Sin embargo, la prueba estadística no es significativa probablemente debido a la diferencia del número de aislados por origen.

Sobre el origen geográfico, Holecheck *et al.* (2004) determinaron que no fue posible asociar procedencia geográfica y genotipo en 17 cepas procedentes de distintos distritos de Abancay. De forma similar, Neyra *et al.* (2005) analizó 32 cepas peruanas provenientes de diferentes regiones utilizando AFLP, las cuales se dividieron en dos clados principales, pero no exclusivos. Estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio sobre la presencia de genotipos que no están restringidos a áreas definidas y que se evidencia en los resultados del AMOVA, debido a la alta variabilidad existente dentro de la población total, y que el componente de origen geográfico no aporta en la estructuración genética de los aislados.

Otro aspecto a considerar es que Cajamarca y Apurímac son regiones distanciadas geográficamente (norte y sur a 763 Km.) y que a pesar de ellos la presencia de genotipos no está restringida al área geográfica evidenciando la alta diversidad genética (Figura 26) cuando es analizada por RAPD-PCR. Éstos resultados son similares con los estudios realizados en Brasil, en el cual no hay una estructuración genética de predominancia de genotipos de *Sporothrix schenckii* en relación a diferentes estados del país, sean cercanos o lejanos geográficamente (Fernandes *et al.*, 2009). Una hipótesis, es que esta variabilidad genética puede ser ocasionada por un tipo de recombinación no meiótica en un ciclo

parasexual o por la presencia de mutaciones, sin embargo esto último ocurre en baja frecuencia en la naturaleza (Mesa-Arango *et al.*, 2002).

Resultados diferentes obtuvo Mesa-Arango *et al.* (2002) utilizando los mismos marcadores RAPD mostrando que sí hay una correspondencia entre la procedencia de diferentes países (Colombia, Guatemala, etc.) y los distintos genotipos observados.

A pesar que los marcadores RAPD tienen una cobertura a lo largo de todo el genoma, su naturaleza dominante no permite determinar los individuos heterocigotos (Jiménez y Collada, 2000), por ello es necesario realizar futuros estudios de estos aislados utilizando marcadores moleculares de alta resolución, incluso diferentes a los usuales para la identificación (ITS, CAL y factor de elongación). Para ejemplificar, los microsatélites altamente polimórficos desarrollados por Gong *et al.* (2019) que evidenciaron que las especies de *S. globosa* que antes se pensaba que tenían muy pocos polimorfismos exhibieron más polimorfismo genético, y se pudo determinar las características especiales de la estructura genética de su población. Sin embargo, se han aislado pocos loci de microsatélites de hongos (Hughes *et al.*, 2008) lo que ha dificultado los análisis de poblaciones, en la actualidad con los genomas completos de *Sporothrix* publicados se facilita el desarrollo de nuevos marcadores moleculares.

Tabla 11: Resumen del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para los aislados de *Sporothrix schenckii*

Fuente de variación	df	SS	MS	Est. Var.	% variación
Entre Pobl.	1	6.932	6.932	0.094	2%
Dentro Pobl.	85	351.872	4.140	4.140	98%
Total	86	358.805		4.234	100%
PhiPT	0.022	P(rand>=data) = 0.181			

SS: suma de cuadrados, MS: cuadrados medios; Est.var.: variabilidad estimada; % de la proporción de la variabilidad genética; p: nivel de significancia.

Hasta ahora, los análisis filogenéticos de múltiples locus (MLST) previos han inferido que todas las especies clínicas han evolucionado a partir de especies ambientales (Song *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015 en Huang *et al.*, 2020) y se explicó un cambio de hábitat en las especies de *Sporothrix* de un estilo de vida sapróbico en el medio ambiente a un estilo de vida parasitario en los mamíferos (Huang *et al.*, 2020). No se puede descartar que podríamos estar frente a un escenario similar con respecto a la alta variabilidad de los aislados peruanos y los genotipos obtenidos (Figura 26) y probablemente las interacciones

entre este patógeno y el medio ambiente / huésped podrían estar generando una fuerte selección a las variaciones genómicas, lo que impulsa la evolución de las especies de *Sporothrix* (Huang *et al.*, 2020). Asimismo, un análisis filogenómico y el análisis poblacional nos permitiría determinar el tiempo de divergencia en que dos o más poblaciones de *S. schenckii* o de otra especie circulante en el país se separaron y dieron origen a brotes diferentes.

En este sentido, un completo entendimiento de la esporotricosis requiere el conocimiento de la distribución geográfica de *Sporothrix* en diversos ambientes, así como investigaciones específicas sobre las fuentes naturales del organismo son importantes para establecer el modo de infección (Carrada-Bravo y Olvera-Macías, 2013). Para ello, es necesario contar con la información geográfica acerca de donde provienen los casos de esporotricosis en Cajamarca y Apurímac, para poder evaluar los factores climatológicos y ecológicos específicos y poder inferir acerca del hábitat de *Sporothrix* en zonas hiperendémicas del Perú. Con esta información, se conocería acerca de los factores estresores que estarían influyendo en los reservorios naturales del hongo y se podría desarrollar un acercamiento sobre las rutas de transmisión del patógeno. Además, permitirá determinar si ha habido un incremento o disminución de nuevos casos de esporotricosis a lo largo de los años en zonas endémicas, así como trazar las rutas de transmisión de este patógeno.

V. CONCLUSIONES

1. Los cuatro *primers* utilizados: OPBG-1, OPBG-14, OPBG-19 y OPD-18 detectaron un alto nivel de polimorfismo entre las cepas de *Sporothrix schenckii*. Entre ellos, el primer más informativo (PIC= 0.20) y con mayor índice de marcador (IM = 4.79) es OPBG-1.
2. Se identificó cinco genotipos circulantes de *Sporothrix schenckii* correspondientes a los subgrupos I.1, I.2, I.3, II.1 y II.2, y siete genotipos únicos. Entre ellos, el genotipo I.1 es el predominante. Los genotipos descritos no tienen correspondencia con el origen geográfico.
3. El coeficiente de correlación cofenética indica un buen ajuste y una baja distorsión ($r=0.99$) entre la matriz de similitud y la matriz cofenética que dio origen al dendograma. Además, se puede inferir que el método de agrupamiento UPGMA es el adecuado para los datos.
4. La hipótesis de investigación que los genotipos circulantes se corresponden con su origen geográfico, es decir que las poblaciones de *Sporothrix schenckii* se encuentren genéticamente estructuradas por origen geográfico (Cajamarca y Apurímac) no fue apoyada por el AMOVA, ya que los resultados indican que la variabilidad genética de estos aislados se debe al componente individual mas no a la variación interpoblacional.
5. Finalmente, se muestra evidencia de una alta diversidad genética entre las cepas de *Sporothrix schenckii* de las zonas hiperendémicas: Cajamarca y Apurímac. La presencia de diferentes especies de *Sporothrix* spp. no debe ser descartada.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con los estudios moleculares para revelar cambios nucleotídicos utilizando marcadores ITS (*barcode* para hongos), el gen de la calmodulina y el gen del factor de elongación, con poder discriminatorio inter especies de *Sporothrix* spp.; con el fin de, develar si los genotipos identificados en este estudio corresponden a diferentes especies de este género.
- Ampliar las poblaciones de estudio, de forma se incluya otras regiones endémicas de esporotricosis como Amazonas, La Libertad y Cuzco.
- Es necesario utilizar marcadores de alta resolución como los microsátélites o desarrollar otros marcadores *in silico* que tengan poder discriminatorio y aporten con los análisis de estructura poblacional.
- Realizar un estudio transversal donde se incluya aislados de años recientes hasta el presente, ya que resulta interesante evaluar si los factores climáticos y otros factores estresores podrían intervenir en la evolución de este hongo.
- Realizar estudios de susceptibilidad *in vitro*, para evaluar si los genotipos encontrados presentan diferentes perfiles de susceptibilidad antifúngica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alejos-Velazquez L. P., Aragón-Martinez M. C., & Cornejo-Romero A. (2014) Extracción y purificación de ADN. En: Cornejo Romero A, Serrato A, Rendón-Aguilar B, Rocha-Munive M. Eds. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Recuperado de:
[http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)
- Almeida-Paes, R., Frases, S., Fialho Monteiro, P. C., Gutierrez-Galhardo, M. C., Zancopé-Oliveira, R. M., & Nosanchuk, J. D. (2009). Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and infection*, *11*(5), 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.03.002>
- Almeida-Paes, R., Frases, S., Araújo, G., de Oliveira, M. M., Gerfen, G. J., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2012). Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. *Applied and environmental microbiology*, *78*(24), 8623–8630. <https://doi.org/10.1128/AEM.02414-12>
- Almeida-Paes R., de Oliveira L. C., Oliveira, M.M., Gutierrez-Galhardo M. C., Nosanchuk J.D., & Zancopé-Oliveira R.M. (2015) Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the *Sporothrix* Complex. *BioMed Res Int.* 2015:212308.
- Almeida-Paes, R., Figueiredo-Carvalho, M. H., Brito-Santos, F., Almeida-Silva, F., Oliveira, M. M., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2016). Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. *PloS one*, *11*(3), e0152796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152796>

- Almeida-Paes, R., Brito-Santos, F., Figueiredo-Carvalho, M., Machado, A., Oliveira, M., Pereira, S. A., Gutierrez-Galhardo, M. C., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2017). Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(5), 376–381. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160527>
- Bareja R., Grover P. S., & Mehra S. K. Transition of *Sporothrix schenckii* to Mycelial to Yeast Form and Determination of its Growth Curve. *Sch J App Med Sci* 2015; 3(3A): 1092-1065
- Barros, M. B., de Almeida Paes, R., & Schubach, A. O. (2011). *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 633–654. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-11>
- Billmyre, R. B., & Heitman, J. (2017) Genetic and epigenetic engines of diversity in pathogenic microbes. *PLoS Pathog* 13(9): e1006468. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006468>
- Bonifaz, A., Toriello, C., Araiza, J., Ramírez-Soto, M. C., & Tirado-Sánchez, A. (2018). Sporotrichin Skin Test for the Diagnosis of Sporotrichosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 4(2), 55. <https://doi.org/10.3390/jof4020055>
- Borba, C. M., Mendes da Silva, A. M., & Oliveira, P. C. (1992) Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporothrix schenckii* strains. *Mycoses*. 35,185-188.
- Boyce, K. J., & Andrianopoulos, A. (2015). Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. *FEMS microbiology reviews*, 39(6), 797–811. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv035>
- Brummer, E., Restrepo, A., Hanson, L.H., & Stevens, D. A. (1990) Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of in vitro passage and storage. *Mycopathologia* 109:13-17.
- Carrada-Bravo, T., & Olvera-Macías, M. I. (2013) New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis2. Ecological niches of *S. schenckii* and zoonotic outbreaks. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*, 60(1):5-24.

- Caruso, G., Broglia, V., & Pocovi, M. (2015) Diversidad genética. Importancia y aplicaciones en el mejoramiento vegetal. Instituto de Ecología y Ambiente Humano Vol 4, N°1
- Castellani A. (1967) Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further Researches. *J Trop Med Hyg*; 70: 181–184.
- Cavagnaro, P., & Masuelli, R.W. (2003) Optimización de la técnica RAPD para identificar cv de olivo. *Revista de la Facultad de ciencias Agrarias* 35(1). <http://bdigital.uncu.edu.ar/1857>
- Chakrabarti, A., Bonifaz, A., Gutierrez-Galhardo, M. C., Mochizuki, T., & Li, S. (2015) Review article: Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol* 53(1): 3-14.
- Clark, W., & Christopher, K. (2000). An introduction to DNA: Spectrophotometry degradation, and the “Frankengel’ experiment. Pages 81-99
- Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Aguilar, B. R., & Munive, M.G.R (compiladoras) (2014) Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT, INECC, UAM-I. 1ª Edición, 274 pp.
- Crisci, J. & López, M. (1983) Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Serie de biología No.26, Secretaria General de La Organización de los Estados Americanos (OEA). Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico Washington, D.C. : 132.
- Criseo, G., Malara, G., Romeo, O., & Puglisi Guerra, A. (2008). Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. *Mycopathologia*, 166(3), 159–162. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9121-4>
- Da Rosa, D., Gezuele, E., Calegari, L., & Goñi, F. (2009) Excretion- secretion products and proteases from live *Sporothrix schenckii* yeast phase: immunological detection and cleavage of human IgG. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 1-7
- de Aguiar Cordeiro, R. (Ed.). (2019). Pocket Guide to Mycological Diagnosis (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b22205>
- de Beer, Z. W., Duong, T. A., & Wingfield, M. J. (2016). The divorce of *Sporothrix* and Ophiostoma: solution to a problematic relationship. *Studies in Mycology*, 83, 165 - 191.

- de Capriles, C. C., Mata Essayag S., Lander, A., & Camacho, R. (1993). Experimental pathogenicity of *Sporothrix schenckii* preserved in water (Castellani). *Mycopathologia*. 122(3),129-33. 36.
- de Oliveira, M. M., Veríssimo, C., Sabino, R., Aranha, J., Zancopé-Oliveira, R. M., Sampaio, P., & Pais, C. (2014). First autochthone case of sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 78(4), 388–390. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.023>
- De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., & De Loose, M. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *THEORETICAL AND APPLIED GENETICS*, 103(8), 1254–1265.[liu](https://doi.org/10.1007/s00122-001-0611-1)
- Della Terra, P. P., Rodrigues, A. M., Fernandes, G. F., Nishikaku, A. S., Burger, E., & de Camargo, Z. P. (2017). Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. *PLOS neglected tropical diseases*, 11(8), e0005903. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005903>
- Diogo, H. C., Sarpieri, A., & Pires, M. C. (2005) Fungi preservation in distilled water. *An Bras Dermatol*. 2005;80(6):591-4.
- Dixon, D. M., Salkin, I. F., Duncan, R. A., Hurd, N. J., Haines, J. H., Kemna, M. E., & Coles, F. B. (1991). Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *Journal of clinical microbiology*, 29(6), 1106–1113. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.6.1106-1113.1991>
- Espinel-Ingroff, A., Abreu, D.P.B., Almeida-Paes, R., Brilhante, R.S.N., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., Hagen, F., Cordoba, S., Gonzalez, G.M., Govender, N.P., Guarro, J., Johnson, E.M., Kidd, S.E., Pereira, S..A, Rodrigues, A.M., Rozenal, S., Szeszs, M.W., Balleste Alaniz, R., Bonifaz, A., Bonfietti, L.X., Borba-Santos, L.P., Capilla, J, Colombo, AL, Dolande, M, Isla, MG, Melhem, MSC, Mesa-Arango ,AC, Oliveira, M.M.E., Panizo, M.M., Pires de Camargo, Z., Zancopé-Oliveira, R.M., Meis, J.F., & Turnidge, J. (2017) Multicenter and international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values (ECVs) for species of *Sporothrix* identified by molecular methods. *Antimicrob Agents Chemother* 61(10):e01057–e01017. <https://doi.org/10.1128/aac.01057-17>

- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, *131*(2), 479–491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>
- Fernández, G.F., dos Santos, P.O., Amaral, C.C., Sasaki, A.A., Godoy-Martinez, P., & de Camargo Z.P. (2009). Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: a forgotten and re-emergent pathogen. *Open Mycol J* 3(1): 48-58. <https://doi.org/10.2174/1874437000903010048>.
- Fernández, G. F. (2009b) Características fenotípicas, genotípicas, soropidemiológicas, antigênicas, imunoquímicas e de virulência de isolados brasileiros de *Sporothrix schenckii*. [Tesis doctoral, Universidad Federal de Sao Paulo]. Repositorio Institucional de la Universidad Federal de Sao Paulo <http://repositorio.unifesp.br/handle/11600/10384>
- Fernandes, G. F., dos Santos, P. O., Rodrigues, A. M., Sasaki, A. A., Burger, E., & de Camargo, Z. P. (2013). Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*, *4*(3), 241-249.
- Ferreira, M.E., & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa – cenargen. Brasilia. : 220pp
- Fisher, F. Fernandes, G. F., dos Santos, P. O., Rodrigues, A. M., Sasaki, A. A., Burger, E., & de Camargo, Z. P. (2013). Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*, *4*(3), 241-249.
- Cook, N.B. 1998. Fundamentals of Diagnostic Mycology. Saunders, the How to cite this article: Curtiscenter, Independence Philadelphia. Pp.182-185.
- Franco, T. L. & Hidalgo, R. (eds.). (2003). Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- Galarza, M.C. (1996). Micosis profundas: Enfoque de las micosis profundas en el Perú. *Dermatología Peruana* - Ed. Especial Noviembre 1996. Recuperado de: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/es_nov1996/micosisp.htm

- Galhardo, M. C., De Oliveira, R. M., Valle, A. C., Paes, R., Silvatavares, P. M., Monzon, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J. L., & Cuenca-Estrella, M. (2008). Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Medical mycology*, 46(2), 141–151. <https://doi.org/10.1080/13693780701742399>
- García-Izquierdo, M., Urquiaga, T., & López, N. (2001) Esporotricosis cutánea en Hospital Regional de Cajamarca. *Dermatol Perú*; 11(2): 87-91.
- García-Izquierdo M, Urquiaga T, López N, & Urquiaga J. (2004). Esporotricosis cutánea en niños en un Hospital Regional del Perú *Dermatol Perú*; 14(2): 104-109.
- Gauthier, G. M. (2015). Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. *PLoS pathogens*, 11(2), e1004608. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004608>
- Gauthier, G. M. (2017). Fungal Dimorphism and Virulence: Molecular Mechanisms for Temperature Adaptation, Immune Evasion, and In Vivo Survival. *Mediators of inflammation*, 2017, 8491383. <https://doi.org/10.1155/2017/8491383>
- Ghosh, A., Maity, P. K., Hemashettar, B. M., Sharma, V. K., & Chakrabarti, A. (2002). Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses*, 45(11-12), 449–454.
- Gong, J., Zhang, M., Wang, Y., Li, R., He, L., Wan, Z., Li, F., & Zhang, J. (2019). Population Structure and Genetic Diversity of *Sporothrix globosa* in China According to 10 Novel Microsatellite Loci. *Journal of medical microbiology*, 68(2), 248–254. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000896>
- Gremião, I. D. F., Miranda, L. H. M., Reis, E. G., Rodrigues, A. M., & Pereira, S. A. (2017). Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. *PLoS pathogens*, 13(1), e1006077. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>
- Grunwald, N., Kamvar, Z., & Everhart, S. (2016). grunwaldlab / Population_Genetics_in_R: AMOVA. Primera versión. Recuperado de: https://grunwaldlab.github.io/Population_Genetics_in_R/AMOVA.html
- Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., & Owen, J. L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single *primers* of simple-sequence repeats. *Theoretical and applied genetics*, 89(7), 998-1006.

- Hernández-Chávez, M. J., Pérez-García, L. A., Niño-Vega, G. A., & Mora-Montes, H. M. (2017). Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 3(4), 51. <https://doi.org/10.3390/jof3040051>
- Holechek, S., Casquero, J., Zurita, S., Guevara, J., & Montoya, Y. Variabilidad genética en *Sporothrix schenckii* aisladas en Abancay, Perú. *Rev. Perú Med. Exp.* 2004; 21(2):87-91.
- Huang, M., Ma, Z., & Zhou, X. (2020). Comparative Genomic Data Provide New Insight on the Evolution of Pathogenicity in *Sporothrix* Species. *Frontiers in microbiology*, 11, 565439. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.565439>
- Hughes, A.R., Inouye, B.D., Johnson, M.T., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol Lett* 11: 609–623.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (2019). Evolución de la pobreza monetaria 2007-2018. Informe Técnico.
- Ishizaki, H., Kawasaki, M., Anzawa, K., Mochizuki, T., Chakrabarti, A., Ungpakorn, R., ... & Arenas, R. (2009). Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in India, Thailand, Brazil, Colombia, Guatemala and Mexico. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 50(1), 19-26.
- Jiménez, P., & Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Inv agr Sist Recur for*, (9) N.º 2, págs. 237-248.
- Kauffman, C. A., Bustamante, B., Chapman, S. W., Pappas, P. G., & Infectious Diseases Society of America (2007). Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(10), 1255–1265. <https://doi.org/10.1086/522765>
- Kong, X., Xiao, T., Lin, J., Wang, Y., Kauffman, C. A., Bustamante, B., Chapman, S. W., Pappas, P. G., & Infectious Diseases Society of America (2007). Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(10), 1255–1265. Chen, H.D.

- (2006). Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infec.* 12(11):1077–1081.
- Kosman, E., & Leonard, K. J. (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular ecology*, 14(2), 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02416.x>
- Kumar, N.S., & Gurusubramanian, G. (2011) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers and Its Applications. *Science Vision*, 11, 116-124.
- Lacaz, C., Porto, E., Martins, J., Heins-Vaccari, E. & Melo, N. (2002). Tratado de Micología Médica. (9ª Ed.). Sao Paulo: Sarvier.
- Lambooy, W.F. (1994). Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *PCR Methods and Applications* 4: 31–37.
- Larone, D.H. (2011). Medically important fungi: a guide to identification, 5th edn. ASM Press, Washington, DC
- Lin, J., Kawasaki, M., Aoki, M., Ishizaki, H., You, G., & Li, R. (2000). Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* clinical isolates from China. *Mycopathologia*, 148(2), 69-72.
- Liu, X., Lian, C., Jin, L., An, L., Yang, G., & Lin, X. (2003). Characterization of *Sporothrix schenckii* by random amplification of polymorphic DNA assay. *Chinese medical journal*, 116(02), 239-242.
- Lyon, G. M., Zurita, S., Casquero, J., Holgado, W., Guevara, J., Brandt, M. E., Douglas, S., Shutt, K., Warnock, D. W., Hajjeh, R. A., & Sporotrichosis in Peru Investigation Team (2003). Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(1), 34–39. <https://doi.org/10.1086/345437>
- Lopes-Bezerra, L. M., Schubach, A., & Costa, R. O. (2006). *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(2), 293–308. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652006000200009>
- MacFaddin, J.F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial médica Panamericana 3ra edición. 422pp

- Mahlberg, M. J., Patel, R., Rosenman, K., Cheung, W., Wang, N., & Sanchez, M. (2009). Fixed cutaneous sporotrichosis. *Dermatology Online Journal*, 15(8). <http://dx.doi.org/10.5070/D330m45342> Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/30m45342>
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazéra, M., & Guarro, J. (2006). Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3251–3256. <https://doi.org/10.1128/JCM.00081-06>
- Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D. A., Kawasaki, M., & Guarro, J. (2007). *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol.* 45:3198–3206. doi: 10.1128/JCM.00808-07.
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., & Guarro, J. (2008). *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med Mycol* 46:621–625. doi: 10.1080/13693780801992837
- Mendoza, M., Alvarado, P., Díaz, E.T., Lucena, L., & Albornoz, M.C. (2005). Comportamiento fisiológico y de sensibilidad in vitro de aislamientos de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. *Rev Iberoam Micol* 22: 151-156.
- Mesa-Arango, A. C., del Rocío Reyes-Montes, M., Pérez-Mejía, A., Navarro-Barranco, H., Souza, V., Zúniga, G., & Toriello, C. (2002). Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 3004-3011.
- Mirbod-Donovan, F., Schaller, R., Hung, C. Y., Xue, J., Reichard, U., & Cole, G. T. (2006). Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. *Infection and immunity*, 74(1), 504–515. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.504-515.2006>
- Mobley, H. L., Island, M. D., & Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological reviews*, 59(3), 451–480. doi: 10.1128/mr.59.3.451-480
- Mora-Montes, H. M., Dantas, A. D. S., Trujillo-Esquível, E., de Souza Baptista, A. R., & Lopes-Bezerra, L. M. (2015). Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era, *FEMS Yeast Research* 15(6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov065>

- Moreno-Vázquez, S. (2001) Análisis de resultados en la caracterización molecular. En: González-Andrés F. y Pita J (Eds.) Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. Publicaciones I.N.E.a. Valladolid pp 263-275
- Morris-Jones, R., Youngchim, S., Gomez, B. L., Aisen, P., Hay, R. J., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., & Hamilton, A. J. (2003). Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infection and immunity*, 71(7), 4026–4033. doi: 10.1128/IAI.71.7.4026-4033.2003
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(3), 400–428. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003>
- Nagy, S., Poczaí, P., Cernák, I., Gorji, A. M., Hegedűs, G., & Taller, J. (2012). PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical genetics*, 50(9-10), 670–672. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1>
- Nanodrop (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual
- Nascimento, R. C., Espíndola, N. M., Castro, R. A., Teixeira, P. A., Loureiro y Penha, C. V., Lopes-Bezerra, L. M., & Almeida, S. R. (2008). Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *European journal of immunology*, 38(11), 3080–3089. <https://doi.org/10.1002/eji.200838513>
- Nei, M., & Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76, 5269–5273.
- Neyra, E., Fonteyne, P. A., Swinne, D., Fauche, F., Bustamante, B., & Nolard, N. (2005). Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1348-1352.
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*, 5(4), 203–223. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x>

- Oliveira, M. M., Almeida-Paes, R., Muniz, M. M., Gutierrez-Galhardo, M. C., & Zancoppe-Oliveira, R. M. (2011). Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*, 172(4), 257–267. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9437-3>
- Oliveira, L.C. (2016). Caracterização molecular e expressão fenotípica da enzima urease de *Sporothrix brasiliensis* [Tesis de maestría en Fundação Oswaldo Cruz] Repositorio Institucional de Fiocruz. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25381>
- Orofino-Costa, R., Macedo, P. M., Rodrigues, A. M., & Bernardes-Engemann, A. R. (2017). Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *Anais brasileiros de dermatologia*, 92(5), 606–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.2017279>
- Osterholzer, J. J., Milam, J. E., Chen, G. H., Toews, G. B., Huffnagle, G. B., & Olszewski, M. A. (2009). Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(9), 3749–3758. <https://doi.org/10.1128/IAI.00454-09>
- Otero-Arnaiz, A., de la Cruz, M., & Oyama, K. (1997). El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Botanical Sciences*, (60), 85-117.
- Oyarce, J.A., García, C., Alave, J., & Bustamante, B. (2016). Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis en pacientes de un hospital de tercer nivel en Lima-Perú, entre los años 1991 y 2014. *Rev Chilena Infectol*; 33 (3): 315-321.
- Palacio, F., Apodaca, M., & Crisci, J. (2020). Análisis multivariado para datos biológicos: teoría y su aplicación utilizando el lenguaje R. 1ra. Edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Pappas, P. G., Tellez, I., Deep, A. E., Nolasco, D., Holgado, W., & Bustamante, B. (2000). Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clinical Infectious Diseases*, 30(1), 65-70.
- Peakall, R., & Smouse, P.E. (2006). GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Note* 6:288–295.

- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pérez-Sánchez, L., González, E., Colón-Lorenzo, E. E., González-Velázquez, W., González-Méndez, R., & Rodríguez-del Valle, N. (2010). Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of *Sporothrix schenckii* with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay. *BMC microbiology*, 10, 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-317>
- Ramírez-Soto, M., Andagua-Castro, J., Lizárraga-Trujillo, J., Aguilar-Ancori, E., & Pezo-Ochoa, J. (2011). Esporotricosis en pacientes que acuden a un centro médico de referencia, en Abancay, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(3). doi:<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.283.531>
- Ramírez Soto, M. C., & Malaga, G. (2017). Subcutaneous mycoses in Peru: a systematic review and meta-analysis for the burden of disease. *International journal of dermatology*, 56(10), 1037–1045. <https://doi.org/10.1111/ijd.13665>
- Ramírez-Soto, M. C., Aguilar-Ancori, E. G., Quispe-Ricalde, M. A., Muñiz-Duran, J. G., Quispe-Florez, M. M., & Chinen, A. (2021). Molecular identification of *Sporothrix* species in a hyperendemic area in Peru. *Journal of infection and public health*, 14(5), 670–673. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.02.005>
- Rentería, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En L.E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología Molecular*. 251-278. Semarnat, INE, UNAM, Conabio. México.
- Rimieri, P. (2017). Genetic diversity and genetic variability: two different concepts associated to plant germplasm and breeding. *BAG, J. basic appl. genet.* (Online) ; 28(2): 7-13.
- Rippon, J.W. (1990). *Micología Médica. Hongos y Actinomicetos Patógenos*. 3ª ed. México: Editorial Interamericana.
- Rodrigues, A.M. (2015). Patógenos emergentes no gênero *Sporothrix* e a evolução global da patogenicidade. [Tesis doctoral, Universidad Federal de Sao Paulo]. Repositorio Institucional de la Universidad Federal de Sao Paulo: <http://repositorio.unifesp.br/handle/11600/47738>

- Rodrigues, A.M., de Hoog, G.S., & de Camargo, Z.P. (2013). Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med. Mycol.*; 51: 405-412.
- Rodrigues, A.M., de Hoog, G.S., Zhang, Y., & Camargo, Z.P. (2014). Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg. Microbes Infect.* 3:e32. doi: 10.1038/emi.2014.33.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2018). Toxic reagents and expensive equipment: are they really necessary for the extraction of good quality fungal DNA?. *Letters in applied microbiology*, 66(1), 32–37. <https://doi.org/10.1111/lam.12822>
- Rohlf, F. J. (2009). NTSYSpc Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Port Jefferson: Applied Biostatistics.
- Rojas, O. C., Bonifaz, A., Campos, C., Treviño-Rangel, R. J., González-Álvarez, R., & González, G. M. (2018). Molecular Identification, Antifungal Susceptibility, and Geographic Origin of Clinical Strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Mexico. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 4(3), 86. <https://doi.org/10.3390/jof4030086>
- Romeo, O., Scordino, F., & Criseo, G. (2011). New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathologia* 172(3):179-186.
- Romeo, O., & Criseo, G. (2013). “What Lies beyond Genetic Diversity In *Sporothrix Schenckii* species Complex?” *Virulence*, 4(3): 203–206., doi:10.4161/viru.23467.
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., & Torres-Guerrero, H. (2000). Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and immunity*, 68(6), 3696–3703. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3696-3703.2000>.
- Rossow, J. A., Queiroz-Telles, F., Caceres, D. H., Beer, K. D., Jackson, B. R., Pereira, J. G., Ferreira Gremião, I. D., & Pereira, S. A. (2020). A One Health Approach to Combatting *Sporothrix brasiliensis*: Narrative Review of an Emerging Zoonotic Fungal Pathogen in South America. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 6(4), 247. <https://doi.org/10.3390/jof6040247>

- Rubio, G., Sánchez, G., Porras, L., & Alvarado, Z. (2010). Esporotricosis: Prevalencia, perfil clínico y epidemiológico en un Centro de Referencia en Colombia. *Rev Iberoam Micol.*; 27(2):75–79.
- Ruiz-Baca, E., Mora-Montes, H. M., López-Romero, E., Toriello, C., Mojica-Marín, V., & Urtiz-Estrada, N. (2011). 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(2), 248–250. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000200021>
- Runco, R. L., & Salim, R. (1995). Detección de especies de *Nocardia* aisladas de pacientes con compromiso pulmonar crónico en Tucumán (Argentina). *Boletín Micológico* 10(1-2): 33-36.
- Sabanero López, M., Flores Villavicencio, L. L., Soto Arredondo, K., Barbosa Sabanero, G., Villagómez-Castro, J. C., Cruz Jiménez, G., Sandoval Bernal, G., & Torres Guerrero, H. (2018). Proteases of *Sporothrix schenckii*: Cytopathological effects on a host-cell model. *Revista iberoamericana de micología*, 35(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.05.003>
- Scheufen, S., Strommer, S., Weisenborn, J.L., Prenger-Berninghoff, E., Thom, N., Bauer, N.B., Köhler, K., & Ewers, C. (2015). Clinical manifestation of an amelanotic *Sporothrix schenckii* complex isolate in a cat in Germany. *JMM Case Reports*, 2.
- Schubach, A., Barros, M. B., & Wanke, B. (2008). Epidemic sporotrichosis. *Current opinion in infectious diseases*, 21(2), 129–133. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f44c52>
- Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. (2012). Caracterización climática de las regiones Apurímac y Cusco. Serie de investigación regional # 1. Programa de Adaptación al Cambio Climático PACC – Perú.
- Sneath, P.H. & Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. 1st Edition, W. H. Freeman, San Francisco.
- Song, Y., Li, S. S., Zhong, S. X., Liu, Y. Y., Yao, L., & Huo, S. S. (2013). Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 27(3), 313-318.

- Suzuki, R., Yikelamu, A., Tanaka, R., Igawa, K., Yokozeki, H., & Yaguchi, T. (2016). Studies in Phylogeny, Development of Rapid Identification Methods, Antifungal Susceptibility, and Growth Rates of Clinical Strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Japan. *Medical mycology journal*, 57(3), E47–E57. <https://doi.org/10.3314/mmj.16-00005>
- Taylor, J. W., Branco, S., Gao, C., Hann-Soden, C., Montoya, L., Sylvain, I., & Gladieux, P. (2017). Sources of fungal genetic variation and associating it with phenotypic diversity. *Microbiology spectrum*, 5(5), 5-5. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0057-2016.
- Télliez, M. D., Batista-Duharte, A., Portuondo, D., Quinello, C., Bonne-Hernández, R., & Carlos, I. Z. (2014). *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 11), 2352–2365. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081794-0>
- Torres-Guerrero, H., Arenas-López, G. (1998). UV irradiation induced high frequency of colonial variants with altered morphology in *Sporothrix schenckii*. *Med Mycol.* 36(2), 81-87.
- Tronchin, G., Pihet, M., Lopes-Bezerra, L. M., & Bouchara, J. P. (2008). Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Medical mycology*, 46(8), 749–772. <https://doi.org/10.1080/13693780802206435>
- Umesha, S., Manukumar, H. M., & Raghava, S. (2016). A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens. *3 Biotech*, 6(2), 123. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0436-4>
- Varshney, R. K., Chabane, K., Hendre, P. S., Aggarwal, R. K., & Graner, A. (2007). Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science*, 173(6), 638-649.
- Watanabe, S., Kawasaki, M., Mochizuki, T., & Ishizaki, H. (2004). RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 45(3), 165-175.

- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Xirotagaros, G., Drogari-Apiranthitou, M., Panayiotides, I. G., Tsakiraki, Z., Tsamakidis, C., Theotokoglou, S., Tofas, P., van Diepeningen, A. D., de Hoog, G. S., Petrikos, G., & Rigopoulos, D. (2015). Imported lymphocutaneous sporotrichosis in Greece. *The British journal of dermatology*, 173(1), 291–293.
<https://doi.org/10.1111/bjd.13558>
- Wright, S. (1969) *The theory of gene frequencies*. Chicago: University of Chicago Press.
- Xu J (2006). Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *J Mol Biol* 8:75-90.
- Zambrano, A.Y., Demey, J. R., Fuenmayor, F., Segovia, V., & Gutiérrez, Z. (2003). Diversidad genética de una colección de yuca a través de marcadores moleculares RAPDs. *Agronomía Tropical*, 53(2), 155-174.
- Zhang, L., Wang, B., Pan, L., & Peng, J. (2013). Recycling isolation of plant DNA, a novel method. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 40(1), 45–54.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.10.001>
- Zhang, Y., Hagen, F., Stielow, B., Rodrigues, A. M., Samerpitak, K., Zhou, X., ... & de Hoog, G. S. (2015). Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 1-20.
- Zhang, Z., Liu, X., Yang, G., Gao, X., Jin, L., & An, L. (2006). Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. *Mycoses*, 49(4), 305-310.
- Zhou, X., Rodrigues, A. M., Feng, P., & De Hoog, G. S. (2014). Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Diversity*, 66(1), 153-165.
<https://doi.org/10.1007/s13225-013-0220-2>
- Zurita, S. (2017). Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. Repositorio científico del Instituto Nacional de Salud.
<http://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/915>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Información de origen de las cepas

N°	CODIGO NETLAB	PROCEDENCIA	IDENTIFICACIÓN	ORIGEN
1	06-32895-05	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
2	06-32899-05	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
3	06-32900-05	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
4	06-32904-05	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
5	06-32907-05	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
6	09-04157-08	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
7	09-04158-08	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
8	09-04159-08	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
9	09-04160-08	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
10	09-04161-08	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
11	09-04162-08	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
12	09-04163-08	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
13	09-04164-08	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
14	09-04165-08	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
15	INS-10-01828-09	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana

16	INS-10-01829-09	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
17	INS-01-34822-14	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
18	INS-02-18115-15	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
19	INS-07-46137-15	Apurímac, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
20	04-14710-01	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
21	04-14712-01	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
22	04-14713-01	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
23	07-26656-03	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
24	10-39876-03	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
25	10-39877-03	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
26	10-39878-03	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
27	06-33573-05	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
28	06-33574-05	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
29	06-33579-05	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
30	09-01510-08	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
31	09-01511-08	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
32	09-06938-08	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana

33	09-06939-08	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
34	09-06940-08	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
35	08-09783-08	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
36	08-09784-08	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
37	08-09785-08	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
38	04-00564-09	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
39	06-06906-09	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
40	10-10193-09	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
41	10-10194-09	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
42	10-10196-09	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
43	11-02597-09	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
44	11-02599-09	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
45	11-02600-09	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
46	11-02602-09	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
47	03-00338-10	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
48	03-00339-10	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
49	03-00340-10	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana

50	03-00341-10	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
51	10-10971-10	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
52	12-03882-10	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
53	INS-01-06803-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
54	INS-01-06804-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
55	INS-01-06808-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
56	INS-01-06810-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
57	INS-01-06811-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
58	INS-01-06812-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
59	INS-01-06813-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
60	INS-01-06814-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
61	INS-01-06815-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
62	INS-01-06817-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
63	INS-01-06818-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
64	INS-01-06819-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
65	INS-01-06820-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
66	INS-02-00327-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana

67	INS-03-20466-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
68	INS-03-20468-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
69	INS-05-07164-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
70	INS-05-07166-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
71	INS-05-07167-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
72	INS-05-07401-11	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
73	INS-10-17953-12	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
74	INS-11-00471-12	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
75	INS-05-03392-13	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
76	INS-06-03428-13	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
77	INS-06-03429-13	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
78	INS-06-03430-13	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
79	INS-01-34774-14	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
80	INS-01-00817-15	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
81	INS-01-23357-15	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
82	INS-02-22589-15	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
83	INS-04-02573-15	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana

84	INS-04-02574-15	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
85	INS-04-02575-15	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
86	INS-04-02576-15	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana
87	INS-04-02580-15	Cajamarca, Perú	<i>Sporothrix schenckii</i>	Clínico, esporotricosis humana

Anexo 2: Características microscópicas de las cepas evaluadas

N°	CODIGO NETLAB	PROCEDENCIA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA			
			Conidias			Área conidial (m2)
			FC (µm)	DC (µm)	MC (µm)	
01	06-32895-05	Apurímac	4	R	2.43 x 1.52	3.69
02	06-32899-05	Apurímac	4	R	2.84 x 2.00	5.68
03	06-32900-05	Apurímac	1	R	2.87 x 1.78	5.11
04	06-32904-05	Apurímac	1	R	2.74 x 1.64	4.43
05	06-32907-05	Apurímac	3	R	2.50 x 1.60	4.00
06	09-04157-08	Apurímac	1	R	3.03 x 2.54	7.70
07	09-04158-08	Apurímac	3	R	2.05 x 1.50	3.75
08	09-04159-08	Apurímac	4	R	3.27 x 1.94	6.21
09	09-04160-08	Apurímac	3	R	3.58 x 2.37	8.48
10	09-04161-08	Apurímac	4	R	4.00 x 2.00	8.00
11	09-04162-08	Apurímac	4	R	2.45 x 1.82	4.46
12	09-04163-08	Apurímac	4	R	4.04 x 1.42	5.74
13	09-04164-08	Apurímac	3	R	2.82 x 1.76	4.96
14	09-04165-08	Apurímac	4	R	3.25 x 1.89	6.14
15	INS-10-01828-09	Apurímac	1	R	3.26 x 2.37	7.73
16	INS-10-01829-09	Apurímac	3	R	2.65 x 1.68	4.45
17	INS-01-34822-14	Apurímac	3	R	2.75 x 1.89	5.20
18	INS-02-18115-15	Apurímac	4	R	2.16 x 1.15	2.48
19	INS-07-46137-15	Apurímac	4	*R, S	3.21 x 1.50	4.82
20	04-14710-01	Cajamarca	3	R	3.15 x 1.8	5.67
21	04-14712-01	Cajamarca	4	R	3.14 x 2.85	8.95
22	04-14713-01	Cajamarca	3	R	3.37 x 1.26	4.25
23	07-26656-03	Cajamarca	1	R	3.74 x 2.66	9.95
24	10-39876-03	Cajamarca	4	AG	3.57 x 1.68	6.00
25	10-39877-03	Cajamarca	4	R	3.25 x 2.20	7.15
26	10-39878-03	Cajamarca	4	R	3.28 x 1.29	4.23
27	06-33573-05	Cajamarca	4	R	3.57 x 2.18	7.63
28	06-33574-05	Cajamarca	4	R	3.43 x 2.24	7.68
29	06-33579-05	Cajamarca	4	R	3.24 x 2.20	7.13
30	09-01510-08	Cajamarca	3	R	3.85 x 1.33	5.12
31	09-01511-08	Cajamarca	3	R	3.75 x 2.33	8.74
32	09-06938-08	Cajamarca	3	R	2.89 x 1.86	5.38
33	09-06939-08	Cajamarca	3	R	3.99 x 1.43	5.71
34	09-06940-08	Cajamarca	*3, 4	R	3.84 x 1.5	5.76
35	08-09783-08	Cajamarca	3	R	2.73 x 1.80	4.91
36	08-09784-08	Cajamarca	1	AG	3.37 x 2.49	8.39
37	08-09785-08	Cajamarca	3	R	2.65 x 1.79	4.74
38	04-00564-09	Cajamarca	4	R	3.87 x 2.64	10.22
39	06-06906-09	Cajamarca	4	R	2.99 x 1.82	5.44
40	10-10193-09	Cajamarca	4	S	3.26 x 2.16	7.04
41	10-10194-09	Cajamarca	3	R	3.68 x 1.25	4.60
42	10-10196-09	Cajamarca	3	R	3.18 x 1.47	4.67
43	11-02597-09	Cajamarca	*3, 4	R	3.25 x 1.67	5.34

44	11-02599-09	Cajamarca	4	R	3.15 x 1.56	4.91
45	11-02600-09	Cajamarca	3	S	3.16 x 2.20	6.95
46	11-02602-09	Cajamarca	3	R	2.02 x 1.27	2.57
47	03-00338-10	Cajamarca	3	R	3.5 x 1.73	6.06
48	03-00339-10	Cajamarca	3	R	3.95 x 1.54	6.08
49	03-00340-10	Cajamarca	3	R	3.81 x 2.72	10.36
50	03-00341-10	Cajamarca	3	AG	3.76 x 1.68	6.32
51	10-10971-10	Cajamarca	*1, 4	R	3.12 x 1.98	6.14
52	12-03882-10	Cajamarca	4	R	2.92 x 1.70	4.96
53	INS-01-06803-11	Cajamarca	*1, 3	R	3.50 x 1.80	6.30
54	INS-01-06804-11	Cajamarca	4	R	3.45 x 2.83	9.76
				*R,		
55	INS-01-06808-11	Cajamarca	*3, 4	AG	3.00 x 2.16	6.48
56	INS-01-06810-11	Cajamarca	3	R	3.26 x 1.38	4.50
57	INS-01-06811-11	Cajamarca	3	R	2.00 x 1.00	2.00
58	INS-01-06812-11	Cajamarca	3	R	1.52 x 1.11	1.69
59	INS-01-06813-11	Cajamarca	*2, 4	*R, S	3.83 x 2.84	10.88
60	INS-01-06814-11	Cajamarca	3	R	4.08 x 1.36	5.55
61	INS-01-06815-11	Cajamarca	3	R	3.47 x 2.00	6.94
62	INS-01-06817-11	Cajamarca	3	R	3.00 x 1.59	4.77
63	INS-01-06818-11	Cajamarca	3	R	3.51 x 1.21	4.25
64	INS-01-06819-11	Cajamarca	3	R	3.67 x 2.56	9.40
65	INS-01-06820-11	Cajamarca	4	R	3.09 x 1.72	5.31
66	INS-02-00327-11	Cajamarca	4	R	3.42 x 2.89	9.88
67	INS-03-20466-11	Cajamarca	4	R	3.68 x 2.75	10.12
68	INS-03-20468-11	Cajamarca	4	R	3.79 x 2.46	9.32
69	INS-05-07164-11	Cajamarca	4	R	2.04 x 1.84	3.75
70	INS-05-07166-11	Cajamarca	4	R	1.95 x 1.40	2.73
71	INS-05-07167-11	Cajamarca	3	R	3.21 x 1.58	5.07
72	INS-05-07401-11	Cajamarca	4	R	3.32 x 2.93	9.73
73	INS-10-17953-12	Cajamarca	1	R	3.71 x 1.39	5.16
74	INS-11-00471-12	Cajamarca	4	R	3.89 x 2.42	9.41
75	INS-05-03392-13	Cajamarca	1	R	3.94 x 2.57	10.13
76	INS-06-03428-13	Cajamarca	4	R	2.73 x 1.50	4.10
77	INS-06-03429-13	Cajamarca	3	AG	2.94 x 1.80	5.29
78	INS-06-03430-13	Cajamarca	3	R	4.00 x 1.00	4.00
79	INS-01-34774-14	Cajamarca	3	R	3.73 x 1.28	4.77
80	INS-01-00817-15	Cajamarca	3	R	3.33 x 1.75	5.83
81	INS-01-23357-15	Cajamarca	2	R	3.79 x 2.50	9.48
82	INS-02-22589-15	Cajamarca	*1, 2	R	3.50 x 2.81	9.84
83	INS-04-02573-15	Cajamarca	4	R	3.33 x 2.00	6.66
84	INS-04-02574-15	Cajamarca	4	R	2.03 x 1.19	2.42
85	INS-04-02575-15	Cajamarca	3	R	3.75 x 1.80	6.75
86	INS-04-02576-15	Cajamarca	3	R	3.94 x 2.10	8.27
87	INS-04-02580-15	Cajamarca	4	R	3.25 x 1.84	5.98
<hr/>						
CONTROL	10-10198-09	Cajamarca	3	R	3.58 x 1.69	6.05

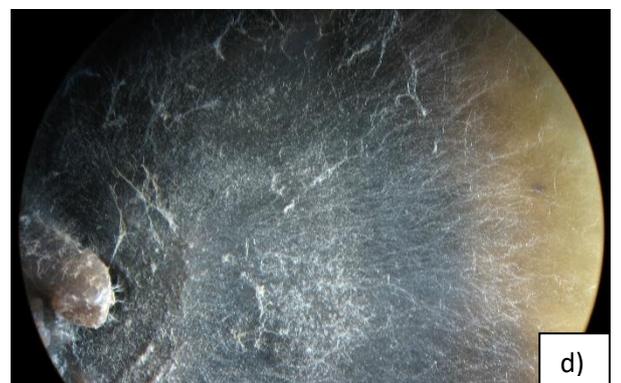
Anexo 3: Producción de melanina

N°	Código NetLab	Procedencia	Grado de pigmentación
01	06-32895-05	Apurímac	++
02	06-32899-05	Apurímac	+
03	06-32900-05	Apurímac	+++
04	06-32904-05	Apurímac	-
05	06-32907-05	Apurímac	-
06	09-04157-08	Apurímac	-
07	09-04158-08	Apurímac	-
08	09-04159-08	Apurímac	-
09	09-04160-08	Apurímac	+
10	09-04161-08	Apurímac	++
11	09-04162-08	Apurímac	+
12	09-04163-08	Apurímac	-
13	09-04164-08	Apurímac	++
14	09-04165-08	Apurímac	+++
15	10-01828-09	Apurímac	+
16	10-01829-09	Apurímac	++
17	01-34822-14	Apurímac	+++
18	02-18115-15	Apurímac	+++
19	07-46137-15	Apurímac	+
20	04-14710-01	Cajamarca	+
21	04-14712-01	Cajamarca	+
22	04-14713-01	Cajamarca	++
23	07-26656-03	Cajamarca	+
24	10-39876-03	Cajamarca	-
25	10-39877-03	Cajamarca	+
26	10-39878-03	Cajamarca	-
27	06-33573-05	Cajamarca	++
28	06-33574-05	Cajamarca	-
29	06-33579-05	Cajamarca	-
30	09-01510-08	Cajamarca	++
31	09-01511-08	Cajamarca	++
32	09-06938-08	Cajamarca	+
33	09-06939-08	Cajamarca	-
34	09-06940-08	Cajamarca	++
35	08-09783-08	Cajamarca	+
36	08-09784-08	Cajamarca	+
37	08-09785-08	Cajamarca	++
38	04-00564-09	Cajamarca	+++

39	06-06906-09	Cajamarca	++
40	10-10193-09	Cajamarca	++
41	10-10194-09	Cajamarca	-
42	10-10196-09	Cajamarca	-
43	11-02597-09	Cajamarca	+++
44	11-02599-09	Cajamarca	+++
45	11-02600-09	Cajamarca	++
46	11-02602-09	Cajamarca	+
47	03-00338-10	Cajamarca	+
48	03-00339-10	Cajamarca	+
49	03-00340-10	Cajamarca	++
50	03-00341-10	Cajamarca	++
51	10-10971-10	Cajamarca	++
52	12-03882-10	Cajamarca	-
53	01-06803-11	Cajamarca	+
54	01-06804-11	Cajamarca	+
55	01-06808-11	Cajamarca	-
56	01-06810-11	Cajamarca	++
57	01-06811-11	Cajamarca	++
58	01-06812-11	Cajamarca	++
59	01-06813-11	Cajamarca	+++
60	01-06814-11	Cajamarca	++
61	01-06815-11	Cajamarca	+
62	01-06817-11	Cajamarca	++
63	01-06818-11	Cajamarca	++
64	01-06819-11	Cajamarca	+
65	01-06820-11	Cajamarca	++
66	02-00327-11	Cajamarca	+
67	03-20466-11	Cajamarca	+++
68	03-20468-11	Cajamarca	+++
69	05-07164-11	Cajamarca	+
70	05-07166-11	Cajamarca	++
71	05-07167-11	Cajamarca	++
72	05-07401-11	Cajamarca	++
73	10-17953-12	Cajamarca	++
74	11-00471-12	Cajamarca	++
75	05-03392-13	Cajamarca	++
76	06-03428-13	Cajamarca	+++
77	06-03429-13	Cajamarca	+
78	06-03430-13	Cajamarca	+
79	01-34774-14	Cajamarca	+
80	01-00817-15	Cajamarca	+
81	01-23357-15	Cajamarca	+++
82	02-22589-15	Cajamarca	+++

83	04-02573-15	Cajamarca	-
84	04-02574-15	Cajamarca	++
85	04-02575-15	Cajamarca	++
86	04-02576-15	Cajamarca	+
87	04-02580-15	Cajamarca	+
<hr/>			
CONTROL	10-10198-09	Cajamarca	+
<hr/>			

Anexo 4: Galería fotográfica del ensayo de pigmentación de la melanina



Vista al estereoscopio (400X) de colonias filamentosas de *Sporothrix schenckii* con diferentes grados de pigmentación: a) albinas (-), b) marrón pálido (+), c) marrón oscuro (++) y d) negras (+++)

Anexo 5: Resultados del ensayo de producción de enzimas gelatinasas

N°	Código NetLab	Procedencia	Producción de gelatinasas
01	06-32895-05	Apurímac	-
02	06-32899-05	Apurímac	-
03	06-32900-05	Apurímac	+
04	06-32904-05	Apurímac	+
05	06-32907-05	Apurímac	-
06	09-04157-08	Apurímac	-
07	09-04158-08	Apurímac	-
08	09-04159-08	Apurímac	-
09	09-04160-08	Apurímac	-
10	09-04161-08	Apurímac	-
11	09-04162-08	Apurímac	-
12	09-04163-08	Apurímac	-
13	09-04164-08	Apurímac	-
14	09-04165-08	Apurímac	-
15	10-01828-09	Apurímac	-
16	10-01829-09	Apurímac	-
17	01-34822-14	Apurímac	-
18	02-18115-15	Apurímac	+
19	07-46137-15	Apurímac	-
20	04-14710-01	Cajamarca	-
21	04-14712-01	Cajamarca	-
22	04-14713-01	Cajamarca	-
23	07-26656-03	Cajamarca	-
24	10-39876-03	Cajamarca	-
25	10-39877-03	Cajamarca	-
26	10-39878-03	Cajamarca	-
27	06-33573-05	Cajamarca	-
28	06-33574-05	Cajamarca	-
29	06-33579-05	Cajamarca	-
30	09-01510-08	Cajamarca	-
31	09-01511-08	Cajamarca	-
32	09-06938-08	Cajamarca	-
33	09-06939-08	Cajamarca	-
34	09-06940-08	Cajamarca	-
35	08-09783-08	Cajamarca	-
36	08-09784-08	Cajamarca	+
37	08-09785-08	Cajamarca	-
38	04-00564-09	Cajamarca	+
39	06-06906-09	Cajamarca	-
40	10-10193-09	Cajamarca	-
41	10-10194-09	Cajamarca	-
42	10-10196-09	Cajamarca	-
43	11-02597-09	Cajamarca	-
44	11-02599-09	Cajamarca	-

Continuación ...

Nº	Código NetLab	Procedencia	Producción de gelatinasas
45	11-02600-09	Cajamarca	-
46	11-02602-09	Cajamarca	-
47	03-00338-10	Cajamarca	-
48	03-00339-10	Cajamarca	-
49	03-00340-10	Cajamarca	-
50	03-00341-10	Cajamarca	-
51	10-10971-10	Cajamarca	-
52	12-03882-10	Cajamarca	-
53	01-06803-11	Cajamarca	+
54	01-06804-11	Cajamarca	+
55	01-06808-11	Cajamarca	-
56	01-06810-11	Cajamarca	-
57	01-06811-11	Cajamarca	-
58	01-06812-11	Cajamarca	-
59	01-06813-11	Cajamarca	-
60	01-06814-11	Cajamarca	-
61	01-06815-11	Cajamarca	-
62	01-06817-11	Cajamarca	-
63	01-06818-11	Cajamarca	+
64	01-06819-11	Cajamarca	-
65	01-06820-11	Cajamarca	-
66	02-00327-11	Cajamarca	+
67	03-20466-11	Cajamarca	+
68	03-20468-11	Cajamarca	-
69	05-07164-11	Cajamarca	-
70	05-07166-11	Cajamarca	-
71	05-07167-11	Cajamarca	-
72	05-07401-11	Cajamarca	-
73	10-17953-12	Cajamarca	-
74	11-00471-12	Cajamarca	-
75	05-03392-13	Cajamarca	+
76	06-03428-13	Cajamarca	-
77	06-03429-13	Cajamarca	-
78	06-03430-13	Cajamarca	-
79	01-34774-14	Cajamarca	-
80	01-00817-15	Cajamarca	-
81	01-23357-15	Cajamarca	+
82	02-22589-15	Cajamarca	+
83	04-02573-15	Cajamarca	-
84	04-02574-15	Cajamarca	-
85	04-02575-15	Cajamarca	-
86	04-02576-15	Cajamarca	-
87	04-02580-15	Cajamarca	-
CONTROL	10-10198-09	Cajamarca	-
	<i>Nocardia brasiliensis</i> S/C		+

Anexo 6: Producción de ureasa

N°	Código Netlab	Procedencia	Actividad ureasa
1	06-32895-05	Apurímac	Positiva
02	06-32899-05	Apurímac	Positiva
03	06-32900-05	Apurímac	Positiva
04	06-32904-05	Apurímac	Positiva
05	06-32907-05	Apurímac	Positiva
06	09-04157-08	Apurímac	Positiva
07	09-04158-08	Apurímac	Positiva
08	09-04159-08	Apurímac	Positiva
09	09-04160-08	Apurímac	Positiva
10	09-04161-08	Apurímac	Positiva
11	09-04162-08	Apurímac	Positiva
12	09-04163-08	Apurímac	Positiva
13	09-04164-08	Apurímac	Positiva
14	09-04165-08	Apurímac	Positiva
15	10-01828-09	Apurímac	Positiva
16	10-01829-09	Apurímac	Positiva
17	01-34822-14	Apurímac	Positiva
18	02-18115-15	Apurímac	Positiva
19	07-46137-15	Apurímac	Positiva
20	04-14710-01	Cajamarca	Positiva
21	04-14712-01	Cajamarca	Positiva
22	04-14713-01	Cajamarca	Positiva
23	07-26656-03	Cajamarca	Positiva
24	10-39876-03	Cajamarca	Positiva
25	10-39877-03	Cajamarca	Positiva
26	10-39878-03	Cajamarca	Positiva
27	06-33573-05	Cajamarca	Positiva
28	06-33574-05	Cajamarca	Positiva
29	06-33579-05	Cajamarca	Positiva
30	09-01510-08	Cajamarca	Positiva
31	09-01511-08	Cajamarca	Positiva
32	09-06938-08	Cajamarca	Positiva
33	09-06939-08	Cajamarca	Positiva
34	09-06940-08	Cajamarca	Positiva
35	08-09783-08	Cajamarca	Positiva
36	08-09784-08	Cajamarca	Positiva
37	08-09785-08	Cajamarca	Positiva
38	04-00564-09	Cajamarca	Positiva
39	06-06906-09	Cajamarca	Positiva
40	10-10193-09	Cajamarca	Positiva
41	10-10194-09	Cajamarca	Positiva
42	10-10196-09	Cajamarca	Positiva
43	11-02597-09	Cajamarca	Positiva
44	11-02599-09	Cajamarca	Positiva

Continuación ...

N°	Código Netlab	Procedencia	Actividad ureasa
45	11-02600-09	Cajamarca	Positiva
46	11-02602-09	Cajamarca	Positiva
47	03-00338-10	Cajamarca	Positiva
48	03-00339-10	Cajamarca	Positiva
49	03-00340-10	Cajamarca	Positiva
50	03-00341-10	Cajamarca	Positiva
51	10-10971-10	Cajamarca	Positiva
52	12-03882-10	Cajamarca	Positiva
53	01-06803-11	Cajamarca	Positiva
54	01-06804-11	Cajamarca	Positiva
55	01-06808-11	Cajamarca	Positiva
56	01-06810-11	Cajamarca	Positiva
57	01-06811-11	Cajamarca	Positiva
58	01-06812-11	Cajamarca	Positiva
59	01-06813-11	Cajamarca	Positiva
60	01-06814-11	Cajamarca	Positiva
61	01-06815-11	Cajamarca	Positiva
62	01-06817-11	Cajamarca	Positiva
63	01-06818-11	Cajamarca	Positiva
64	01-06819-11	Cajamarca	Positiva
65	01-06820-11	Cajamarca	Positiva
66	02-00327-11	Cajamarca	Positiva
67	03-20466-11	Cajamarca	Positiva
68	03-20468-11	Cajamarca	Positiva
69	05-07164-11	Cajamarca	Positiva
70	05-07166-11	Cajamarca	Positiva
71	05-07167-11	Cajamarca	Positiva
72	05-07401-11	Cajamarca	Positiva
73	10-17953-12	Cajamarca	Positiva
74	11-00471-12	Cajamarca	Positiva
75	05-03392-13	Cajamarca	Positiva
76	06-03428-13	Cajamarca	Positiva
77	06-03429-13	Cajamarca	Positiva
78	06-03430-13	Cajamarca	Positiva
79	01-34774-14	Cajamarca	Positiva
80	01-00817-15	Cajamarca	Positiva
81	01-23357-15	Cajamarca	Positiva
82	02-22589-15	Cajamarca	Positiva
83	04-02573-15	Cajamarca	Positiva
84	04-02574-15	Cajamarca	Positiva
85	04-02575-15	Cajamarca	Positiva
86	04-02576-15	Cajamarca	Positiva
87	04-02580-15	Cajamarca	Positiva
Control (+)	INS-10-22003-16	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Positiva
Control (-)		<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Negativa

Anexo 7: Galería fotográfica del ensayo de producción de ureasa



Producción de ureasa en medio agar úrea de Christensen: de izquierda a derecha, luego de la inoculación, 2 horas después, 48 horas después y siete días después.

Anexo 8: Cuantificación y pureza del ADN extraído

N°	Código Netlab	Procedencia	Concentración (ng/μl)	Relación 260 nm/280 nm
1	06-32895-05	Apurímac	41.2	1.91
2	06-32899-05	Apurímac	41.3	1.85
3	06-32900-05	Apurímac	46.4	1.83
4	06-32904-05	Apurímac	43.8	1.80
5	06-32907-05	Apurímac	36.9	1.82
6	09-04157-08	Apurímac	41.4	1.80
7	09-04158-08	Apurímac	65.3	1.93
8	09-04159-08	Apurímac	48.0	1.84
9	09-04160-08	Apurímac	50.9	1.88
10	09-04161-08	Apurímac	48.0	1.82
11	09-04162-08	Apurímac	65.8	1.83
12	09-04163-08	Apurímac	64.1	1.81
13	09-04164-08	Apurímac	72.4	1.86
14	09-04165-08	Apurímac	66.6	1.83
15	10-01828-09	Apurímac	49.8	1.84
16	10-01829-09	Apurímac	52.4	1.83
17	01-34822-14	Apurímac	73.3	1.89
18	02-18115-15	Apurímac	47.5	1.83
19	07-46137-15	Apurímac	53.2	1.80
20	04-14710-01	Cajamarca	43.2	1.80
21	04-14712-01	Cajamarca	70.3	1.82
22	04-14713-01	Cajamarca	47.4	1.84
23	07-26656-03	Cajamarca	52.3	1.82
24	10-39876-03	Cajamarca	50.7	1.80
25	10-39877-03	Cajamarca	57.1	1.93
26	10-39878-03	Cajamarca	51.4	1.89
27	06-33573-05	Cajamarca	58.6	1.82
28	06-33574-05	Cajamarca	48.4	1.95
29	06-33579-05	Cajamarca	55.4	1.94
30	09-01510-08	Cajamarca	73.4	1.84
31	09-01511-08	Cajamarca	43.1	1.98
32	09-06938-08	Cajamarca	52.7	1.95
33	09-06939-08	Cajamarca	44.6	1.99
34	09-06940-08	Cajamarca	40.3	2.00
35	08-09783-08	Cajamarca	40.1	2.00
36	08-09784-08	Cajamarca	51.6	1.92
37	08-09785-08	Cajamarca	32.5	1.93
38	04-00564-09	Cajamarca	47.4	1.99
39	06-06906-09	Cajamarca	50.5	1.95
40	10-10193-09	Cajamarca	46.1	1.94
41	10-10194-09	Cajamarca	47.4	1.88
42	10-10196-09	Cajamarca	48.0	1.97
43	11-02597-09	Cajamarca	52.4	1.97
44	11-02599-09	Cajamarca	38.2	1.99
45	11-02600-09	Cajamarca	53.5	1.98

Continuación ...

N°	Código Netlab	Procedencia	Concentración (ng/μl)	Relación 260 nm/280 nm
46	11-02602-09	Cajamarca	44.5	1.93
47	03-00338-10	Cajamarca	42.0	1.98
48	03-00339-10	Cajamarca	51.7	1.99
49	03-00340-10	Cajamarca	45.4	1.92
50	03-00341-10	Cajamarca	56.0	1.98
51	10-10971-10	Cajamarca	45.6	2.00
52	12-03882-10	Cajamarca	39.8	1.97
53	01-06803-11	Cajamarca	60.0	1.97
54	01-06804-11	Cajamarca	57.0	1.95
55	01-06808-11	Cajamarca	46.1	1.99
56	01-06810-11	Cajamarca	47.2	1.98
57	01-06811-11	Cajamarca	50.7	1.97
58	01-06812-11	Cajamarca	38.0	2.00
59	01-06813-11	Cajamarca	54.5	1.93
60	01-06814-11	Cajamarca	41.8	1.99
61	01-06815-11	Cajamarca	43.5	1.97
62	01-06817-11	Cajamarca	60.7	1.92
63	01-06818-11	Cajamarca	81.2	1.99
64	01-06819-11	Cajamarca	51.1	1.93
65	01-06820-11	Cajamarca	60.6	1.92
66	02-00327-11	Cajamarca	42.3	1.88
67	03-20466-11	Cajamarca	44.7	1.87
68	03-20468-11	Cajamarca	37.3	1.95
69	05-07164-11	Cajamarca	56.6	1.94
70	05-07166-11	Cajamarca	46.7	1.99
71	05-07167-11	Cajamarca	42.9	2.00
72	05-07401-11	Cajamarca	47.1	1.92
73	10-17953-12	Cajamarca	62.0	1.95
74	11-00471-12	Cajamarca	48.4	1.90
75	05-03392-13	Cajamarca	38.8	1.98
76	06-03428-13	Cajamarca	58.1	1.99
77	06-03429-13	Cajamarca	36.7	1.97
78	06-03430-13	Cajamarca	38.2	1.93
79	01-34774-14	Cajamarca	39.8	1.99
80	01-00817-15	Cajamarca	36.6	1.94
81	01-23357-15	Cajamarca	33.1	1.88
82	02-22589-15	Cajamarca	41.7	1.90
83	04-02573-15	Cajamarca	31.5	1.92
84	04-02574-15	Cajamarca	38.7	1.85
85	04-02575-15	Cajamarca	46.3	1.91
86	04-02576-15	Cajamarca	32.9	1.86
87	04-02580-15	Cajamarca	55.0	1.89
Control (+)	10-10198-09	Cajamarca	41.3	2.00
Control (-)	INS-05-00991-15	-	42.9	1.90

Anexo 11: Coeficiente de correlación cofenética

Test for association:

Matriz correlation: $r = 0.99872$

(= normalized Mantel statistic Z)

Tests for association:

Approximate Mantel t-test: $t = 10.6920$

Prob. random Z < obs. Z: $p = 1.0000$

Anexo 12: Preparación de medios de cultivo



Agar papa dextrosa (APD)

Es un medio utilizado para la estimulación de la formación de conidias, en la preparación de inóculos de hongos miceliales y en la estimulación de producción de pigmentos: rojo en *Trichophyton rubrum*, y amarillo en *Microsporum canis*. Se utiliza con frecuencia en microcultivos para observar características morfológicas.

Composición:

Papa	200 g
Glucosa	10 g
Agar	18 g
Cloranfenicol	25mg/mL
Agua destilada	1000 mL

Preparación:

- a. Pelar las papas, cortarlas en cubos y hervir durante una hora.
- b. Filtrar, añadir la glucosa y el agar, hervir hasta disolver el agar completamente y filtrar con papel Whatman N°2.
- c. Ajustar el volumen a un litro.
- d. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- e. Enfriar hasta los 50°C añadir 2 mL de cloranfenicol y dispensar en placas Petri o en tubos.

Control de calidad:

- a. Aspecto: incoloro o amarillo suave, sólido, transparente o translúcido.
- b. pH final a 25°C: 5.6 ± 0.2

Trichophyton rubrum: rojo intenso en el reverso de la colonia.

Trichophyton mentagrophytes: pigmento marrón en el reverso de la colonia.

Agar Sabouraud dextrosa (ASD)

Es un medio estándar para el aislamiento, esporulación y conservación de muchos hongos.

El cambio en el pH y la concentración de glucosa favorece la esporulación.

Composición:

Peptona	10 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua estilada	1000 mL

Preparación:

- a. Mezclar los ingredientes y hacerlos hervir hasta disolver completamente.
- b. Esterilizar a 121°C durante 15 min.
- c. Enfriar hasta los 50°C y dispensar en placas Petri o en tubos.

Control de calidad:

- a. Aspecto: ámbar, sólido, transparente.
- b. pH final a 25°C: 7.0 ± 0.2

Trichophyton mentagrophytes: crece

Staphylococcus epidermidis: inhibición parcial o total en el medio con cloranfenicol.

Agar corn meal (CMA)

Se emplea para la identificación de *Acremonium* spp., *Fusarium* spp. Se utiliza en el cultivo y diferenciación de especies de *Candida* basándose en las características miceliales. El Tween 80 se incorpora para demostrar la formación de clamidosporas. Si se añaden 10 g de glucosa puede utilizarse en la diferenciación de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* basándose en la producción de pigmento.

Composición:

Harina de maiz	40g
Agar	20g
Tween 80	3mL
Agua destilada	1000mL

Preparación:

- a) Mezclar la harina de maiz en agua.
- b) Hervir a fuego lento durante una hora.
- c) Filtrar con gasa.
- d) Medir y completar hasta 1000mL. Añadir el agar y calentar hasta disolver. Filtrar otra vez si fuese necesario.
- e) Esterilizar a 121°C durante 10 minutos. Filtrar.
- f) Añadir el agar y calentar hasta disolver.
- g) Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- h) Dispensar en placas Petri.

Control de calidad

Candida albicans produce clamidosporas.

Agar mycosel (Amyc)

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de hongos patógenos a partir de muestras muy contaminadas con hongos saprofitos y bacterias. Se utiliza fundamentalmente en el

aislamiento de dermatofitos y hongos dimórficos. Inhiben algunas especies de hongos de interés médico (*Candida no albicans*, *Aspergillus*, *Zygomycetes*)

Composición:

Digerido papaico de harina de soya 10g

Dextrosa 10g

Agar 15,5g

Cicloheximide 0,4g

Cloranfenicol 0,05g

Agua destilada c..s.p.1000mL

*Se utiliza los medios comerciales Mycosel y Mycobiotic.

Preparación:

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, evitar manipular la cicloheximida.

Control de calidad:

Aspecto: incoloro o amarillo suave, sólido, transparente o translúcido.

Candida albicans ATCC 10231: crecimiento

Aspergillus sp.: inhibición completa del crecimiento

Agar infusión cerebro corazón (BHA)

La infusión de cerebro y corazón ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos. Se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos. Sin suplemento se recomienda actualmente como medio universal para bacteriología aerobia y para la recuperación primaria de hongos y Actinomycetales a partir de muestras clínicas y no clínicas. Mantenimiento de la fase levaduriforme de algunas micosis sistémicas, ya sea con sangre o sin ella. En general está indicado para el aislamiento de una gran variedad de patógenos, incluyendo levaduras, hongos filamentosos y bacterias.

Composición:

Infusión de cerebro y corazón 8 g

Digerido péptico de tejido animal 5 g

Digerido pancreático de caseína 16 g

Cloruro sódico 5 g

Glucosa	2g
Fosfato disódico de hidrógeno	2.5 g
Agar	13.5 g
Agua destilada c.s.p	1000 mL

Preparación

De acuerdo al fabricante, hervir los componentes hasta su completa disolución.

Dispensar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Dispensar en tubos o placas.

Control de calidad:

Aspecto: color ámbar claro a semitransparente sin precipitado

pH final: 7,4 ± 0,2

Candida albicans ATCC 60193 Crecimiento de bueno a excelente

Trichophyton mentagrophytes ATCC 9533 Crecimiento de bueno a excelente

Streptococcus pneumoniae ATCC 6305 Crecimiento de bueno a excelente

Agar infusión cerebro corazón suplementado con sangre de carnero al 10% (BHAS)

Al adicionar sangre de carnero al BHAI es útil para el aislamiento de todos los hongos incluidos los dimórficos. La sangre de carnero desfibrinada proporciona los factores de crecimiento esenciales para los organismos más exigentes. Se recomienda dispensar en volúmenes mayores para contrarrestar la reducción del medio en incubaciones prolongadas.

Preparación:

Luego de esterilizar el agar infusión cerebro corazón, dejar enfriar hasta una temperatura aceptable al tacto (si la sangre es agregada cuando el BHAI está muy caliente, la sangre se hemoliza y se torna color marrón). Añadir la sangre de carnero desfibrinada al 10% y agitar suavemente en forma circular hasta homogenizar pero sin formar burbujas. Dispensar en tubos.

Control de calidad:

Aspecto: color rojo intenso (color sangre)

pH final: 7,4 ± 0,2

Trichophyton mentagrophytes ATCC 28185: Colonias blancas, micelio blanco

Candida albicans ATCC 60193: Colonias de color blanco

Shigella flexneri ATCC 12022 Colonias de color gris

Streptococcus pneumoniae ATCC 6305: Colonias de color gris verdoso, posiblemente mucoides

Agar úrea de Christensen

Se utiliza en la identificación y diferenciación de algunos dermatofitos, especialmente *Trichophyton rubrum* de *Trichophyton mentagrophytes*, y de algunas levaduras (*Cryptococcus neoformans*).

Composición:

Agar	20g
Agua desionizada	900 mL

Solución urea:

Peptona	1g
Glucosa	1g
NaCl	5g
KH ₂ PO ₄	2g
Rojo de fenol	12 mg

Preparación:

Esterilizar los 900mL de agar a 121°C, 15 libras de presión durante 15 minutos.

Añadir 100mL de solución urea (esterilizado por filtración) a los 900mL del agar enfriado a 50°C.

Dispensar en tubos y solidificar en posición inclinada.

Control de calidad:

Aspecto: Agar inclinado, naranja, transparente

pH final: 6,8 +/- 0,2

Trichophyton mentagrophytes: ureasa positiva (color rojo)

Trichophyton rubrum: ureasa megativa (color naranja)

Cryptococcus neoformans: ureasa positiva (color rojo)

Candida albicans: ureasa negativa (color naranja)

Medio gelatina para hidrólisis

La peptona y el extracto de carne proporcionan los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos. La gelatina es el sustrato para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas), que licúan la gelatina.

Composición:

Extracto de carne	3g
Peptona	5g
Gelatina	120g
Agua destilada	1000mL

Preparación:

Agregar la gelatina al agua destilada y dejar reposar por 15 a 30 minutos

Calentar hasta que hierva (50°C) para que se diluya la gelatina. Agregar el extracto de carne y la peptona, y volver a calentar hasta ebullición para disolver todos los componentes.

Esterilizar a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos.

Control de calidad:

Aspecto: A temperatura ambiente es líquido, de coloración amarillo claro y traslúcido.

pH final 6,8 +/- 0,2

Nocardia sp: produce licuefacción de la gelatina.

Anexo 13: Preparación de reactivos

Azul de lactofenol

Composicion:

Acido láctico	100 mililitros
Fenol	100 gramos
Glicerol	200 mililitros
Azul de anilina	0.5 gramos
Agua destilada estéril	100 mililitros

Preparación:

Una vez pesados los ingredientes, mezclar bien y agitar para disolver. Se disuelve calentando ligeramente en fenol, el acido lactico, agua destilada y glicerol.

Se deja enfriar y se añade el azul de anilina. Se deja reposar durante 24 horas.

Filtrar para evitar la presencia de precipitados y almacenar a temperatura ambiente en un frasco ámbar o evitar contacto con la luz.

Cloruro de sodio (NaCl) 5M

Preparación:

Pesar 292,2g de NaCl y diluir en 1000mL de agua desionizada.

Autoclavar a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos.

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5M

Preparación:

Pesar 186,12g y diluir en 1000mL de agua desionizada.

Ajustar a pH=8 con perlas de hidróxido de sodio (NaOH).

Autoclavar a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos.

Buffer Tris-HCl 1M pH=8

Preparación:

En 1000mL de agua desionizada disolver 121,1g de Tris base.

Ajustar el pH=8 agregando ácido clorhídrico concentrado (HClc).

Realizar en una campana extractora de gases.

Autoclavar a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos.

Buffer CTAB 2X

Composición:

Hexadecyltrimethylammonium bromide CTAB (2%)	20g
NaCl 5M	280mL
EDTA 0.5M	40mL
Tris-HCl 1M pH=8	100mL
Polivinil pirrolidona (PVP)	10g
Agua desionizada estéril c.s.p	1000mL

Preparación:

Colocar un poco de agua y agregar los reactivos en el siguiente orden: Tris-HCl, EDTA y CTAB.

Disolver completamente con agitación continua y añadir el PVP.

Continuar agitando hasta obtener una solución translúcida y sin precipitados.

Solución buffer Tris-EDTA (TE)

El tampón TE (Tris EDTA) solubiliza el ADN y el ARN mientras lo protege de la degradación. Adecuado para el almacenamiento y aislamiento de ácidos nucleicos.

Composición:

Tris-HCl 1M pH=8 (concentración final: 10mM)	10mL
EDTA 0.25M (concentración final: 1mM)	4mL
Agua grado biología molecular	986mL

Preparación:

Mezclar bien y autoclavar a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos.

Conservar a 4°C hasta su uso.