



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACION MOLECULAR DEL COMPLEJO *Sporothrix schenckii* EN AISLAMIENTOS CLINICOS PROCEDENTES DEL AREA HIPERENDEMICA DE ABANCAY-APURIMAC

MOLECULAR IDENTIFICATION OF THE *Sporothrix schenckii* complex IN CLINICAL ISOLATES FROM THE HYPERENDEMIC AREA OF ABANCAY-APURIMAC

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIADO EN TECNOLOGIA MÉDICA, ESPECIALIDAD LABORATORIO CLINICO

AUTORES:

QUIJANDRIA SANCHEZ JOHANNA

RUIZ HUAMAN ROSMERY

ASESORES:

MSc. EDGAR NEYRA VALDEZ

Dra. BEATRIZ BUSTAMANTE

2018

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	Pág.2
ABSTRACT.....	Pág.3
INTRODUCCION.....	Pág.4
MATERIAL Y METODOS.....	Pág.7
PROCEDIMIENTO.....	Pág.8
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	Pag.9
ANALISIS DE SECUENCIAS Y DETERMINACION DE VARIANTES MOLECULARES.....	Pág.9
ANALISIS ESTADISTICO.....	Pág.10
ASPECTOS ETICOS.....	Pág.10
RESULTADOS.....	Pág.10
DISCUSION.....	Pág.12
CONCLUSIONES.....	Pág.15
DECLARACION DE CONFLICTOS DE INTERES.....	Pág.15
DECLARACION DE AGRADECIMIENTOS.....	Pág.15
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	Pág.16
TABLAS Y FIGURAS	Pág.19
ANEXOS.....	Pág.28

RESUMEN

Antecedentes: En el Perú, la esporotricosis es una enfermedad hiperendémica en la provincia de Abancay. La esporotricosis es causada por el Complejo *Sporothrix schenckii*, compuesto por cinco especies que pueden ser identificadas molecularmente con el uso marcadores moleculares y que no han sido reportadas en el Perú. **Objetivo:** Identificar mediante métodos moleculares el complejo *Sporothrix schenckii* en aislamientos clínicos procedentes del área hiperendémica de Abancay, así como también evaluar la diversidad genética y la relación con algunas características como edad, sexo, forma clínica. **Material y Métodos:** El estudio es retrospectivo. Se utilizaron aislamientos de *Sporothrix schenckii* recolectados en los últimos 10 años, proporcionadas por el Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt. Se seleccionaron aquellos aislamientos que posean datos como edad, sexo y forma clínica. La identificación molecular se realizó mediante el uso de tres marcadores; ITS, calmodulina y beta-tubulina. Las secuencias generadas se fueron comparadas con la base de datos mundial Gen Bank y el análisis de diversidad se realizó mediante el uso del programa CodonCode Aligner. Para identificar asociaciones entre variables cualitativas se utilizó el test exacto de Fisher; para la identificación de las asociaciones entre variables cualitativas y cuantitativas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. **Resultados:** Se analizaron 26 aislamientos de *Sporothrix schenckii*, dentro de las cuales se obtuvieron 3 variantes genéticamente diferentes. No se encontró relación de las variantes con los datos clínicos del paciente (edad, sexo, forma clínica). **Conclusiones:** Los aislamientos de la zona de Abancay fueron caracterizados como *Sporothrix schenckii sensu stricto*, siendo el análisis de las secuencias de calmodulina la de mejor discriminación.

PALABRAS CLAVE: DIVERSIDAD GENETICA, ITS, ESPOROTRICOSIS, CALMODULINA, TUBULINA, *Sporothrix schenckii*

ABSTRACT

Background: In Peru, sporotrichosis is an hyperendemic disease in the province of Abancay. Sporotrichosis is caused by the *Sporothrix schenckii* complex, composed of five species that can be identified with the use of molecular markers and that have not been reported in Peru. **Objective:** To identify by molecular methods the *Sporothrix schenckii* complex in clinical isolates from the hyperendemic area of Abancay, and evaluate the genetic diversity and the relationship with some factors such as age, sex, clinical form. **Material and methods:** *Sporothrix schenckii* isolates collected in the last 10 years were used, provided by the Mycology Laboratory at “the Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt”. We selected those isolates that have data such as age, sex and clinical form. The characterization was carried out using three molecular markers: ITS, calmodulin and beta-tubulin. The generated sequences were analyzed by comparison with the Genbank global database and the diversity analysis was carried out by using the CodonCode Aligner program. To identify associations between qualitative variables, the Fisher's exact test was used; For the identification of the associations between qualitative and quantitative variables, we used Kruskal-Wallis test. **Results:** Twenty six isolates of *Sporothrix schenckii* were analyzed, within which 3 genetically different variants were obtained. No relationship was found between the variants and the clinical data of the patient.

Conclusions: The isolates from the Abancay area were identified as *Sporothrix schenckii sensu stricto*, the analysis of the calmodulin sequences being the best discrimination.

KEYWORDS: GENETIC DIVERSITY, ITS, SPOROTRICHOSIS, CALMODULIN, TUBULIN,

Sporothrix schenckii

INTRODUCCION

Esporotricosis es una micosis subcutánea causada por el complejo *Sporothrix schenckii* que incluye cinco especies: *S. pallida*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* y *S. schenckii* (*sensu stricto*). Estudios fenotípicos y genotípicos han comprobado que las especies, *S. schenckii* (*sensu stricto*), *S. brasiliensis* y *S. globosa* son de importancia clínica y veterinaria mientras que *S. mexicana*, *S. pallida* son aisladas primordialmente de muestras ambientales. [1,2, 3,4,].

La principal vía de infección es por inoculación cutánea y algunas veces por vía inhalatoria que puede causar neumonitis granulomatosa. Su hábitat natural es el suelo y plantas por ende aquellas ocupaciones o trabajos que impliquen su manipulación predisponen a la infección. Las formas clínicas cutáneas con mayor frecuencia de presentación son: cutánea fija y cutánea linfática, estas generalmente afectan a hospederos sin alteraciones de la inmunidad. Por el contrario las formas clínicas menos frecuentes como cutánea diseminada y la sistémica afectan a pacientes inmunosuprimidos y/o inmunocompetentes [1,3].

La esporotricosis está distribuida a nivel mundial, en América, los países con mayor número de casos publicados son: Brasil, México, Colombia, Perú, Uruguay, Venezuela, Costa Rica, Guatemala y los Estados Unidos de Norteamérica; Australia en Oceanía; en Asia son Japón, India, China oriental y Corea del Sur [4].

En el Perú la enfermedad es hiperendémica en Apurímac y los mayores números de casos también han sido diagnosticados en Cajamarca, Ayacucho, Cusco, y La Libertad. Abancay, presentando una tasa de incidencia de 48-60 x 100 000 habitantes [5]. Un estudio retrospectivo realizado entre los años 1991-2014 nos muestra que en los Departamentos de Cajamarca y Apurímac se encontró el mayor número de pacientes que adquirió la enfermedad, las formas cutáneas linfáticas y cutánea fija fueron observadas con mayor frecuencia en adultos y las lesiones se localizaron sobre todo en los miembros superiores [6].

En Brasil, en la ciudad de Rio de Janeiro utilizaron métodos fenotípicos y moleculares para la identificación de especies de *Sporothrix*. De 50 aislamientos 45 (90%) fueron *S. brasiliensis* y 5 (10%) fueron *S. schenckii*. La infección cutánea diseminada se asoció a *S. brasiliensis*, mientras que *S. schenckii* fue asociado a las formas clínicas más frecuentes [7].

Existen pocos estudios en el Perú, que brinden información sobre la caracterización del complejo *S.schenckii*, sin embargo algunos datos moleculares y fenotípicos parecen demostrar que existen diferentes linajes genéticos dentro de este complejo.

En Abancay, en un artículo publicado el 2004 se evaluaron 17 aislamientos de *S. schenckii*, 7 correspondieron a lesiones cutánea linfática (41.2%) y 10 (58.8%) a la forma cutánea fija e identificaron 6 genotipos mediante la técnica del ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD por sus siglas en inglés). Sin embargo, no se logró asociar con características clínicas y geográficas [8].

Marimon *et al.* (2006) realizó uno de los primeros estudios a nivel molecular que incluía la comparación de secuencias de tres genes (calmodulina, quitina sintasa y beta-tubulina) para evaluar la variabilidad de *S. schenckii* encontrando evidencias de variantes genotípicas y concluyendo que *S. schenckii* corresponde realmente a un complejo de especies [9].

En China, 2014 se investigó la filogenia molecular de 64 aislamientos clínicos mediante la secuencia de ADN con ITS y beta-tubulina. Los resultados mostraron un clado de tipo *Sporothrix globosa*, demostrando que es el agente causal de esporotricosis en China [10]. En Irán se identificó 9 aislados iraníes del complejo *S. schenckii*. Cinco de siete aislados fueron *S. schenckii* y dos aislados clínicos y dos ambientales fueron *S. globosa*. Hubo una concordancia de 73% entre los resultados de métodos de identificación fenotípica y genotípica [11].

Existe una amplia lista de genes empleados para estudios de identificación y/o filogenia de los hongos, los más utilizados para dichos estudios codifican para los ARN ribosómicos y se encuentran formando agrupaciones repetidas, separados por regiones no codificantes denominadas espaciador interno transcrito (ITS). Este es utilizado en la identificación de hongos y recomendado como el código de barras en general, sin embargo estas regiones no proporcionan suficiente resolución para diferenciar especies filogenéticamente muy próximas y por esta razón es necesario el estudio de otros genes estructurales como beta-tubulina y calmodulina principalmente [12,13].

El gen más utilizado actualmente es calmodulina, la importancia de este gen radica en que es una proteína altamente conservada, actúa como cofactor enzimático en las vías fúngicas de

detección de calcio y calcineurina, asociado con el crecimiento de hongos, resistencia anti fúngica, patogénesis y virulencia, además de ser considerado como un gen de código de barras, según los últimos estudios reportados [15, 16,17]

El objetivo de este estudio es identificar a través de métodos moleculares las posibles variantes del complejo *Sporothrix schenckii* en aislados procedentes del área hiperéndemica de Abancay así como evaluar la relación con algunos aspectos epidemiológicos. Esta investigación permitirá la estandarización de protocolos de identificación molecular en el Laboratorio de Micología y contribuirá como un modelo al avance del uso de herramientas moleculares para el diagnóstico de enfermedades causado por hongos en el Perú.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DE ESTUDIO: Estudio retrospectivo

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Inclusión: Aislamientos de *Sporothrix schenckii* procedentes de la zona de Abancay, recolectados en los últimos 10 años por el Laboratorio de Micología del IMT-AVH con información de edad, sexo y forma clínica.

MUESTREO

El muestreo es no probabilístico por conveniencia.

Treinta aislamientos del complejo *Sporothrix schenckii* identificados morfológicamente y procedentes de pacientes que habían adquirido la enfermedad en el área hiperéndemica de

Abancay fueron seleccionados. La recolección de los datos de cada aislamiento se tomó del cuaderno de registro del Laboratorio de Micología con sus respectivos códigos para mantener en reserva la identificación de cada participante en el estudio.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Los aislamientos de *Sporothrix schenckii* en los últimos 10 años que cumplen con los criterios de inclusión para este estudio fueron en total 30.

VARIABLES

Este estudio presenta variables principales y secundarias, las cuales pueden ser de tipo cualitativas y cuantitativas y están descritas en la Tabla 1.

PROCEDIMIENTO

Se tomaron aislamientos previamente identificados como *S.schenckii* a través de cultivo en Agar Sabouraud Dextrosa. Para la extracción de ADN se utilizaron los aislamientos no mayores de 2 semanas de cultivo mediante el uso de CTAB (Bromuro de Cetil -Trimetil Amonio) con algunas modificaciones de Doyle y Doyle [23] (Anexo 1). El ADN extraído fue cuantificado espectrofotométricamente con ayuda del Biofotómetro D30 Eppendorf. Se evaluaron los radios 260/280 y se evaluó la calidad mediante electroforesis en Agarosa al 1% (Anexo 2). La concentración de los ADN fue diluida con agua libre de nucleasas (NFW, Nuclease-Free Water) hasta una concentración de 20 ug/ml, la cual se utilizó para los procedimientos de PCR.

PCR (REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA)

En las reacciones de PCR para ITS, beta-tubulina y calmodulina se usó el Kit KOD Hot Start Master Mix (Merck) con un volumen final de 25ul, incluyendo: PCR Grade Water (8ul), Cebador forward (1ul), Cebador Reverse (1ul), Temple DNA (2.5), KOD Hot Start Master Mix (12.5ul). Las secuencias de los marcadores utilizados se encuentran en la Tabla.2

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X y se corrieron en electroforesis en agarosa a 90V por 40 minutos. Se utilizó como marcador de peso molecular GeneRuler100bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific TM). Finalmente fueron fotografiados mediante el Equipo fotodocumentador Foto/Analist FotoDyne.

Las condiciones de la PCR y la purificación se encuentran descritas en el Anexo 3,4.

Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar a la Empresa Macrogen en Korea (<https://dna.macrogen.com/eng/member/login.jsp>).

ANALISIS DE SECUENCIAS Y DETERMINACION DE VARIANTES

MOLECULARES

Las secuencias generadas para cada uno de los marcadores utilizados (ITS, b-tubulina, calmodulina) se alinearon a través del programa Codon Code Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner/>) seguido de ajustes manuales dentro del programa.

Estas secuencias fueron contrastadas con la base de datos de nucleótidos GenBank mediante un análisis de comparación BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) a fin de confirmar la identidad del complejo *Sporothrix*. Posterior a ello se utilizó el programa DARwin 6.0015 (<http://darwin.cirad.fr/>) para la elaboración de los árboles, los cuales se produjeron por el método Neighbor -Joining (Weighted) para los tres

marcadores, la estabilidad de las variantes generadas se evaluó con un bootstraps de 1000 repeticiones.

ANALISIS ESTADISTICO

Para identificar asociaciones entre variables cualitativas se utilizo el test exacto de Fisher y para la identificación de las asociaciones entre variables cualitativas y cuantitativas se usó la prueba de Kruskal-Wallis mediante el programa Stata 13.

ASPECTOS ETICOS

Este estudio fue exonerado de revisión y supervisión por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIE) (Anexo 5).

RESULTADOS

1.- Extracción de ADN.

La concentración de ADN de los aislamientos fue alrededor de 200-500ug/ml y la relación de absorbancias 260/280 fue de 1.8-2.0. Finalmente los ADN extraídos fueron diluidos a una concentración de 20 ug/ml.

2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa

Luego de las reacciones de amplificación para cada marcador, los productos se visualizaron a través de un gel de agarosa al 1.5%. Para ITS un tamaño de peso molecular fue de 600bp, para la beta-tubulina de 400bp y para calmodulina de 700bp. Figura (1-3)

3.-Secuenciamiento

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a un control de calidad para eliminar los segmentos ilegibles o que presentaron fallas al momento de secuenciar. La lista de las secuencias se encuentra en el Anexo 5.

4.- Análisis de secuencias

Cada secuencia de este estudio fue comparada a la base de datos mundial del GenBank, obteniendo como resultado *Sporothrix schenckii* con un porcentaje de similitud entre 98-100% para 26 aislamientos con el marcador de ITS, 30 para beta-tubulina y 26 para calmodulina, para el análisis de similitud los pesos moleculares finales fueron de 429bp, 280pb, y 621pb respectivamente. (Tabla 4)

Cuatro aislamientos no participaron en el análisis debido a lograr secuencias cortas dificultando el ensamblaje con las demás secuencias.

En todos los arboles obtenidos del análisis de cada marcador, identificamos tres variantes y se denominaron I, II, III.

En el árbol para ITS (Figura 4) se obtuvieron: variante I (n=5), variante II (n=20) y variante III (n=1), encontrándose esta última totalmente alejada del resto de variantes. Estas fueron ensambladas con las siguientes especies: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. pallida*, *S. mexicana* y *S. schenckii var.lurie*.

Para beta-tubulina (Figura 5) se obtuvieron: variante I (n=14), variante II (n=8) y variante III (n=8). Se ensamblaron con las siguientes especies: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. pallida*.

Para calmodulina (Figura 6) se obtuvieron: variante I (n= 4), variante II (n= 3), variante III (n=19). Se ensamblaron con las especies: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. schenckii var.lurie*.

El análisis estadístico se realizó con los datos que se encuentran en la Tabla 3. De los 26 aislamientos estudiados, 13 (50%) fueron del sexo femenino y 13 (50%) del sexo masculino. La edad presenta una mediana de 18.5 años (rango: 4-80). Con respecto a la forma clínica 17 correspondieron a lesiones linfocutáneas (65.4%), 4 a lesiones cutáneas diseminadas (15.4%) y 5 a lesiones cutáneas fijas (19.2%). Para calmodulina, la variante predominante fue III con un 73.1%, mientras que la variante I y II con un 15.4% y 11.6% respectivamente.

No se encontró asociación significativa entre las variantes obtenidas con las características clínicas (Tabla 5).

DISCUSION

Nuestros resultados demuestran que la especie circulante en la ciudad hiperéndemica de Abancay es *Sporothrix schenckii*, llamado también *Sporothrix schenckii sensu stricto*.

Neyra y col(8) habían descrito la existencia de una variabilidad genética en cepas de *Sporothrix schenckii* señalando dos grandes grupos, mediante el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y el secuenciamiento del la región ITS2. Posteriormente el estudio de *Marimon y col(9)*, quienes analizaron la diversidad genética de los mismos aislados peruanos a través de la combinación multilocus, agruparon 2 clados principales los que eran similares y concuerdan con los de *Neyra y col(8)*. En nuestro estudio

hemos realizado el secuenciamiento de 3 marcadores (ITS, beta-tubulina, calmodulina) en los cuales podemos observar tres diferentes variantes para cada uno. Este hallazgo nos indica que existe una variabilidad intraespecífica en estos aislados de *Sporothrix schenckii*, y no una variabilidad de especie. Los marcadores se han utilizado para poder ampliar el panorama de las diferencias taxonómicas que podemos encontrar dentro de este complejo, es por ello que adicionalmente a ITS, el cual es utilizado en general como el código de barras para la identificación de hongos hemos utilizado otros genes codificadores de proteínas, como beta-tubulina y calmodulina, para incrementar la resolución taxonómica. (12,13, 18). Actualmente calmodulina es el más utilizado para diferenciación de especies de *Sporothrix spp.* (19). En este estudio al comparar los grupos formados en cada marcador podemos confirmar que el marcador de calmodulina presenta de manera más definida y agrupada a los aislamientos del estudio con las ingresadas de la base de datos mundial del GenBank, además que nos agrupa una tercera variante conformada por 3 aislamientos muy similares entre sí, esta variante se separa de las otras dos completamente, resultando materia de estudio para próximas investigaciones.

El estudio realizado por *Oyarce y col(6)* demuestran similitudes con nuestros hallazgos en cuanto a la forma de presentación clínica de la esporotricosis, siendo más frecuentes las formas linfocutánea y cutánea fija en las zonas de Cajamarca , Apurímac y Amazonas Según el estudio de *Soto y col(20)* la población mayormente afectada en Abancay fueron menores de edad, mencionando que ellos presentan un sistema inmune más vulnerable que el de un adulto, además su rutina diaria aparte de la escuela, es la ganadería y la agricultura, por lo que presentan la posibilidad de estar expuestos al hongo causante de esta enfermedad. En

contraste con nuestro estudio, la población afectada presenta una misma proporción para hombres y mujeres adultos.

Las especies que conforman el complejo *Sporothrix schenckii*, se manifiesta en diferentes partes del mundo y en cuanto a su especie pueden manifestar distinta virulencia por lo que es importante el estudio molecular, hasta el momento ha sido probada en inoculaciones animales utilizando ratones como modelo animal (1,22). En Brasil las especies reportadas por identificación molecular son *S. schenckii* y *S. brasiliensis* presentando una respuesta terapéutica más rápida que los pacientes a quienes se les aislaron *S. schenckii* (7). En México *Sporothrix sensu stricto* y *Sporothrix globosa*, en Argentina *S. sensu stricto*, *S. brasiliensis* y *S. globosa* (16), mientras que en China y en Japón es prevalente *S. globosa*.

En el estudio de *Zhang y col.* (21) muestra un clado patógeno de *S. schenckii*, *S. globosa* y *S. brasiliensis* que se presenta en proporciones epidémicas en miles de casos cada uno. De este estudio se tomaron 2 secuencias patógenas de *Sporothrix schenckii* (CBS130112 y CBS130099) las cuales se integraron en los grupos formados, mostrando similitud con las secuencias de nuestro estudio, posiblemente estas secuencias presenten el mismo grado de patogenicidad. En cuanto a *S. mexicana* toma una posición filogenética remota en el complejo *Ophiostoma-Sporothrix*, siendo distante del principal clado patógeno.

En este estudio no se encontró asociación significativa entre los resultados moleculares y las características clínicas, posiblemente por el número limitado de aislamientos del análisis. Este estudio incluyó los aislados del área hiperendémica de esporotricosis en Perú, por lo que nuestros resultados no son representativos para otras zonas del Perú. Por otro lado para un

análisis genético más completo se sugiere evaluar las características fenotípicas, susceptibilidad a antifúngicos y virulencia.

CONCLUSIONES

La especie circulante en la zona hiperendémica de Abancay es *Sporothrix schenckii sensu stricto*, la cual presenta 3 grupos de variantes distintas. No se encontró asociación significativa entre los tipos de variantes y las características clínicas.

DECLARACION DE CONFLICTOS DE INTERES

Los autores declaran no tener conflictos de interés

DECLARACION DE AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento al Laboratorio de Micología Clínica del Instituto de Medicina Tropical – Alexander von Humboldt y al personal, Lic.TM: Susy Aranibar y a TL Rosario Velando por la búsqueda, preservación y el re-aislamiento de las cepas incluidas en el presente estudio, al Lic.TM Billy Sánchez Jacinto por el apoyo en el análisis estadístico y finalmente a la Unidad de Genómica de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) por las instalaciones prestadas para llevar a cabo los procedimientos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Ramírez-Soto M, Lizárraga-Trujillo J. Esporotricosis granulomatosa: presentación de dos casos inusuales. Rev Chil Infectol. 2013; 30(5): 548-553.
- 2.-Rodrigo M, Cruz C, Peggy I, et al. Aislamiento de *Sporothrix pallida* complex en muestras clínicas y ambientales de Chile. Rev Argent Microbiol. 2014; 46 (4): 311-314.
3. - Ayats J. “*Sporothrix schenckii* “Servicio de Microbiología. Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat (Barcelona).SEIMC
- 4.- Bravo T. Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. Rev Latinoamer Patol Clin. 2012; 59 (3): 147-171.
- 5.- Zurita S. Esporotricosis y paracoccidioidomicosis en Perú: experiencias en prevención y control. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2014; 31(2): 352-357.
- 6.- Oyarce A, García C, Alave J. et al. 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 Chil Infectol. 2016; 33(3):315-321.
7. Almeida R, Marques M. et al. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is associated with Atypical Clinical Presentations. Plos Negl Trop Dis. 2014; 8(9):3094.
8. - Holechek S, Casquero J, Zurita S, et al. Variabilidad genética en aislamientos de *Sporothrix schenckii* aisladas en Abancay, Perú. Rev Perú Med Exp Salud Pública.2004; 21 (2):87-91.
- 9.-Marimon R, Gene J, Cano, J, et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol. 2006; 44 (9):3251- 3256.

- 10.-Liu T, Zhang K, Zhou X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2014; 15 (1):100-108.
- 11.- Mahmoudi S, Farideh Z, Parivash K, et al. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol*. 2016; 54:593–599.
- 12.- Haybrig M, Perdomo Z. Caracterización Fenotípica y Molecular De Hongos Filamentosos Oportunistas: *Scedosporium*, *Acremonium*, *Phialemonium*, *Lecythophora* Y *Paecilomyces*. [Tesis Doctoral].Universidad Rovira, Departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques 2011.
- 13.- Oliveira M, Almeida R, Gutiérrez-G, et al. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev Iberoam Micol*. 2014; 31(1):2–6.
- 14.-Rodrigues A, Hoog G, Camargo Z. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Negl Trop*. 2015; 9(12).
15. - Rangel L, Martinez F, Maravilla P, et al. Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii* sensu lato. *Rev Med Mycol*. 2016; 54(3): 248–255.
16. - Córdoba S, Isla G, Szusz W et al. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina, *Mycoses*. 2018; 61(7): 441-448.
17. - Rodrigues A, Cruz R, Ferreira G, et al. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals, *Fungal Biol*. 2016; 120(2): 246-64.

18. - Orofinio R, Macedo P, Rodrigues A, et al. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol.* 2017; 92(5):606-20.
- 19.- Rojas O, Bonifaz A, Campos C, et al. Molecular Identification, Antifungal Susceptibility, and Geographic Origin of Clinical Strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Mexico. *J Fungi.* 2018; 4(3):86.
- 20.-Ramirez M, Andagua C, Lizarra J, et al. Esporotricosis en pacientes que acuden a un centro médico de referencia, en Abancay, Perú. *Rev Peru Med Exp. Salud Pública.* 2011; 28 (3): 508-512.
21. - Zhang Y, Hagen F, Stielow B, et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia.* 2015; 35: 1– 20.
22. – Arrillaga M, Capilla J, Mayayo E, et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15(7): 651-5.
- 23.- Valdés, LA, Gómez, A, Carballo, ME, et al. Estandarización de protocolos para la extracción de a cromosómico en cepas de *colletotrichum gloeosporioides* aislados en plantas de mango (*Mangifera Indica* L.). *La Granja.* 2015; 22(2):40-49.

Tabla 1. Descripción de Variables

Nombre	Definición operacional	Tipo de variable	Instrumento de medición
VARIABLES PRINCIPALES			
Identificación molecular del complejo <i>Sporothrix schenckii</i>	Secuencia de tres genes ITS, Beta-tubulina y Calmodulina.	Cualitativa-Nominal	Procedimientos moleculares
VARIABLES SECUNDARIAS			
Edad	Tiempo de vida expresado en años. Variable determinada por la fecha registrada en el Laboratorio de Micología (IMT-AVH)	Cuantitativa -continua	Cuaderno del registro del Laboratorio de Micología (IMT-AVH)
Sexo	Condición que distingue entre femenino y masculino.	Cualitativa-Nominal	
Forma clínica de la lesión	Diagnóstico de la lesión Cutánea Subcutánea Diseminada	Cualitativa-Nominal	

Tabla 2. CEBADORES DE PCR UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO [9, 10,14]

MARCADORES		Secuencia
Calmodulina CL1 CL2A	Forward	5'- GAR TWC AAG GAG GCC TTCTC -3'
	Reverse	5'- TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC -3'
ITS ITS1 ITS4	Forward	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
	Reverse	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
Beta-tubulina BT2F BT2R	Forward	5'GG[CT]AACCA(AG)AT(ATC)GGTGC(CT)GC (CT)3'
	Reverse	5'ACCCTC(AG)GTGTAGTGACCCTTGGC3'

Tabla 3. Aislamientos procedentes de Abancay utilizados en este estudio con su respectiva información (forma clínica, edad, sexo y tipo de variante basados en las secuencias del gen calmodulina)

CODIGO	FORMA CLINICA	EDAD	SEXO	TIPO DE VARIANTE
86654	LC	46	M	III
86652	LC	21	M	II
86656	LC	18	M	III
63590	LC	31	M	III
86658	LC	22	M	I
86662	LC	44	M	III
12818	LC	9	M	III
87221	LC	31	M	III
83806	LC	12	M	III
86655	LC	7	F	III
86661	LC	8	F	III
62252	LC	62	F	III
86663	LC	17	F	III
86665	LC	7	F	III
86667	LC	44	F	I
86651	LC	36	F	III
9963	LC	50	F	III
13462	LC	19	F	III
86660	CF	13	M	III
68360	CF	14	M	III
86717	CF	14	F	I
67686	CF	80	F	III
87222	CD	60	M	II
86668	CD	4	M	I
86718	CD	4	F	III
60265	CD	6	F	II

LC: LINFOCUTANEA, **CF:** CUTANEA FIJA, **CD:** CUTANEA DISEMINADA, **F:** FEMENINO,

M: MASCULINO

Tabla 4. Comparación de los aislamientos de los tres marcadores utilizando el BLAST

AISLAMIENTOS	ITS	Beta-tubulina	calmodulina
86651	100% KF574454.1	99% AM116928.1	100% KT427641.1
86652	100% MH865638.1	100% AM116924.1	98% KT427643.1
86656	100% KP017096.1	99% AM116928.1	100% KT427641.1
63590	99% MH865639.1	100% AM116930.1	100% KT427641.1
86658	97% KP780441.1	99% AM116928.1	99% KP101399.1
86663	100% MH865639.1	99% AM116922.1	100% KT427641.1
86654	99% KP017096.1	99% AM116922.1	100% KT427641.1
13462	100% MH865639.1	99% AM116928.1	100% KT427641.1
9963	100% MH865639.1	99% AM116928.1	99% KT427640.1
86655	99% MH865639.1	99% AM116924.1	100% KT427641.1
86661	99% KP017096.1	99% AM116913.1	100% KT427641.1
62252	99% MH865639.1	99% AM116928.1	100% KT427641.1
86662	99% KP017096.1	99% AM116930.1	100% KT427641.1
86665	ND	99% AM116924.1	100% KT427641.1
86667	100% KP017096.1	99% AM116928.1	100% KP101397.1
12818	99% MH865639.1	99% AM116913.1	100% KT427641.1

83806	99%	99%	100%
	KP017096.1	AM116928.1	KT427641.1
86717	100%	99%	100%
	KP017096.1	AM116923.1	KP101397.1
67686	100%	98%	100%
	MH865639.1	AM116930.1	KT427641.1
68360	ND	98%	99%
		AM116914.1	KT427641.1
86718	100%	99%	100%
	MH865639.1	AM116928.1	KT427641.1
60265	100%	98%	98%
	KP017091.1	AM116924.1	KT427643.1
86668	100%	99%	98%
	KP017091.1	AM116923.1	KP101397.1
87222	100%	99%	98%
	KP017091.1	AM116924.1	KT427643.1
60598	99%	97%	ND
	KP017091.1	AM116924.1	
86660	100%	99%	100%
	MH865639.1	AM116928.1	KT427641.1
87221	100%	98%	100%
	KP017096.1	AM116928.1	KT427641.1
86715	99%	98%	ND
	MH865639.1	AM116930.1	
86664	ND	99%	ND
		AM116913.1	
83992	ND	98%	ND
		AM116928.1	

ND: No determinado

Tabla 5. Análisis bivariado de los tipos de variante con las características clínicas.

	TIPOS DE VARIANTE			p*
	(n=4) n%	I II (n=3) n%	III (n=19) n%	
SEXO*				
Femenino				
Masculino	2(15.38)	1(7.69)	10(76.92)	1.00
	2(15.38)	2(15.38)	9(69.23)	
FORMA CLINICA*				
LC	2(11.76)	1(5.88)	14(82.35)	0.104
CD	1(25.00)	2(50.00)	1(25.00)	
CF	1(20.00)	0(0.00)	4(80.00)	
EDAD[‡]				
	18 (9-33)	21(4-60)	18(9-44)	0.92

*Test Exacto de Fisher. ‡Prueba de Kruskal-Wallis, Los datos de edad fueron expresados en mediana (p25-p75), P<0.05 se considera estadísticamente significativo. **LC:** LINFOCUTANEA, **CF:** CUTANEA FIJA, **CD:** CUTANEA DISEMINADA

Figura1. Electroforesis en Agarosa al 1,5 % de los productos de PCR para el marcador ITS, C.N : Control negativo.

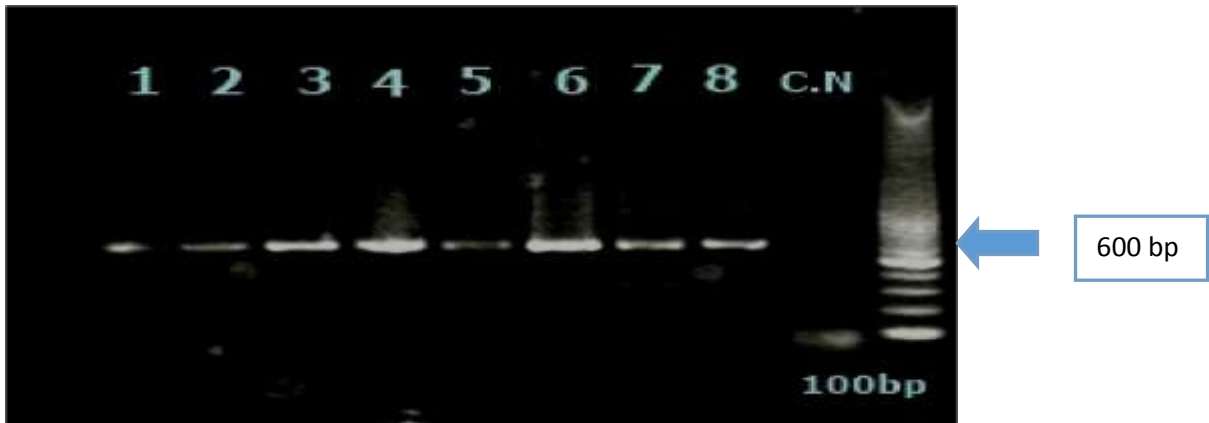


Figura 2. Electroforesis en Agarosa al 1,5% de los productos de PCR para el marcador Beta-tubulina, C.N: Control Negativo



/Figura 3. Electroforesis en agarose al 1,5 % para los productos de PCR para el marcador Calmodulina. C.N: Control Negativo.

/

/

/

Figura 4 Arbol para ITS (espaciador transcrito interno) se incluyen cepas de referencia: KP0109.1 (*Sporothrix schenckii*), KP017092 (*Sporothrix schenckii*), KP017078 (*Sporothrix pallida*), KP017072 (*Sporothrix mexicana*), KP017084 (*Sporothrix globosa*), KP017087 (*Sporothrix brasiliensis*), AB128012 (*Sporothrix schenckii* var. *luriei*), KP132790 (*Sporothrix schenckii*), KP017095 (*Sporothrix schenckii*)

//

beta-tubulina

/

Figura 5. Arbol de beta-tubulina junto a las especies del GenBank:
KC716083 (*S. globosa*), AM747287.1 (*S. schenckii*), KM222429 (*S.*
brasiliensis), AM116916.1 (*S. schenckii* var *luriei*), EF139109
(*S. pallida*)

/

Fig.6 Arbol de calmodulina junto con las especies del Gen Bank:
KP101398 (*S.schenckii*), KP101397 (*S.schenckii*), JQ041903
(*S.brasiliensis*), AM261689 (*S.schenckii*), KP101421 (*S.brasiliensis*),
KT427644 (*S.globosa*), KP101459 (*S.globosa*), AM747302 (*S.schenckii*
var luriei), KP101392 (*S.schenckii*), KP101391 (*S.schenckii*)

ANEXO 1 EXTRACCION DE DNA

Modificado de Doley

- 1.-Agregar 100mg de Glass bead y una perla de acero a cada muestra.

2. Llevar la muestra a triturar en el equipo Tissue Lyser II por un periodo de 40 segundos, colocarlo al frio por unos segundos y volver a triturar por 40 segundos más.
- 3.-Agregar rápidamente 700 ul de buffer CTAB 2X y 4ul de 2-mercaptoetanol. Llevar al vortex.
4. Colocar los tubos a 65°C en el Thermomixer durante 1h. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 5.-Agregar 700ul de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) a cada tubo. Llevar al vortex.

- 6.-Centrifugar a 14000rpm por 10 minutos, transferir la parte acuosa superior a un tubo nuevo de microcentrifuga de 2ml.
- 7.-Agregar 50ul de CTAB 10X (Utilizar tips con punta cortada). Llevar al vortex. 8.-Repetir los pasos 5 y 6.

//

- 9.-Agregar un volumen igual de isopropanol (400-500ul) a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejar a -20C toda la noche.
- 10.-Centrifugar a 14000rpm por 20 minutos. Descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el pellet.
- 11.-Lavar el pellet con 1ml de etanol al 80% y centrifugar a 14000rpm por 10 minutos. Retirar el sobrenadante con ayuda de una pipeta. Luego lavar con etanol al 90% y centrifugar a 14000rpm. Retirar el etanol y dejar secar toda la noche.
- 12.-Resuspender con agua NFW (100ul) cada tubo.

ANEXO 2

ELECTROFORESIS EN AGAROSA

- 1.-Preparar agarosa al 1%(1g de agarosa con 100ml de TAE1X).
- 2.-Calentar por 1 minuto aproximadamente.
- 3.-Dejar enfriar y agregar 1ul de GelRed, verter a la cubeta con el peine ya colocado.
- 4.-Dejar enfriar hasta que se solidifique.
- 5.-Sumergir el gel en la cámara de electroforesis y retire el peine.
- 6.-Agregue suficiente TAE1X para cubrir el gel.
- 7.-Preparar las muestras de ADN a analizar agregándoles el buffer de carga.
- 8.-Aplicar en cada pocillo las muestras preparadas.
- 9.-Tapar la cámara de electroforesis y conectar los electrodos.
- 10.-Aplicar un voltaje de 90V por 45 aprox.
- 11.-Desconectar la fuente de poder, sacar el gel de la bandeja y observarlo en un transluminador UV.

ANEXO 3

CONDICIONES DE LAS REACCIONES DE PCR

Todos los ensayos de PCR fueron realizados en termocicladores Mastercycler® Pro de Eppendorf.
Pre-Desnaturalización 1 ciclo,
95°C por 5 minutos
Desnaturalización 34 ciclos,

94°C por 30 segundos

Hibridación 57°C (ITS), 59°C (BETA-TUBULINA), 58.5
(CAL) por 30 segundos Elongación 72°C por 1 minuto

Elongación Final 1ciclo, 72°C por 8 minutos

Conservación 1 ciclo, 15°C Indefinido

ANEXO 4

PURIFICACION

DE PCR

Para purificar los productos de PCR se realizaron los siguientes pasos:

- 1.-Añadir un volumen de Membrane Binding Solution para la amplificación del PCR
- 2.-Transferir el producto de PCR a la mini columna e incubar por 1 min a T° ambiente.
- 3.- Centrifugar la mini columna en una microcentrifuga a 16000g por 1 min. Descartar el líquido que quedo en el tubo colector de la mini columna.
- 4.- Lavar la columna añadiendo 700 ul de Membrane Wash Solution, previamente diluida con etanol al 95%.Centrifugar la columna por 1 min a 16000g.
- 5.-Repetir el lavado con 500ul de Membrane Wash Solution y centrifugar por 5 min a 16000g
- 6.-Descartar el líquido del tubo colector y centrifuga la columna por 1 min a 16000g.
- 7.- Trasferir la mini columna a un tubo limpio 1.5ml.Añadir 50ul de agua NFW directamente al centro de la columna. Incubar a T° ambiente por 1 min a 16000g.Centrifuga por 1 min.
- 8.-Descartar la mini columna y conservar el tubo de 1.5ml a 4°C o a -20°C.

ANEXO 5

/Exoneración del Comité Institucional de Ética

(CIE)

//