



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Programa educativo: Licenciatura en Biomedicina

Tesis Profesional: Identificación fenotípica y genotípica de *Sporothrix schenckii*,
Sporothrix mexicana y *Sporothrix globosa*

Tesis para obtener el grado de: Licenciatura en Biomedicina

Presenta:

Luis Bernardo Mendoza Monterosas

Director Experto:

M.C. Alejandra Paula Espinoza Taxis

Revisores:

D.C. Luis Javier Martínez Morales

D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña

Puebla, Puebla 24 de Febrero del 2025.

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas Instituto de Ciencias (ICUAP)

Contenido

1.-Resumen	4
2.-Introducción	4
2.1-Esporotricosis	4
3.-Antecedentes	5
3.1.- Antecedentes generales.....	5
<i>Sporothrix spp.</i>	5
<i>Diagnóstico de esporotricosis</i>	5
3.2.-Antecedentes específicos.....	7
<i>Sporothrix spp.</i>	7
<i>Resistencia a antifúngicos de Sporothrix spp.</i>	7
Mecanismos de resistencia de <i>Sporothrix spp.</i>	8
4.- Planteamiento del problema	10
5.- Objetivos	11
5.1.-Objetivos Generales.....	11
5.2.- Objetivos específicos.....	11
6.- Material y métodos.....	11
<i>Aislados de Sporothrix spp.</i>	11
6.1 Muestreo	11
6.1.2 <i>Definición de la unidad de población</i>	11
6.1.3 <i>Selección de la muestra</i>	11
6.1.4 <i>Tamaño de la muestra</i>	13
6.1.5.- Técnicas y procedimientos	14
<i>Ensayo de antifungigrama</i>	14
<i>Ensayo de biopelícula</i>	14

<i>Oligonucleótidos</i>	15
<i>PCR Touchdown</i>	15
<i>Visualización del amplificado en gel de agarosa</i>	17
7.-Resultados.	17
Antifungigramas	17
Ensayos de biopelícula.....	23
Ensayos bioinformáticos.....	27
Discusión	29
Conclusiones.....	31
Referencias. MODELO DEL J. BACTERIOLOGY	31

1.-Resumen

La identificación de cualquier agente patógeno se ha vuelto cada vez más importante con el descubrimiento y surgimiento de nuevas especies, así como de nuevos mecanismos de resistencia hacia la respuesta inmune y los fármacos, por lo que la necesidad de desarrollo de nuevas técnicas de identificación fenotípicas y genotípicas ha ido al alza.

En el presente trabajo se realizó la identificación fenotípica de los aislados de *Sporothrix spp.* obtenidos de pacientes, mascotas, suelo y plantas, así como la obtención de sus formas levaduriforme micelial y conidial. De igual manera se cuantificó la resistencia a antifúngicos de los aislados junto con ensayos de formación de biopelícula.

Por otro lado, se hicieron ensayos bioinformáticos de alineación de secuencias del gen de calmodulina de *Sporothrix spp.* con el fin de probar la complementariedad a oligonucleótidos teóricos con el fin de desarrollar un método diagnóstico molecular rápido en futuros trabajos.

2.-Introducción

2.1-Esporotricosis

La esporotricosis es una infección crónica subcutánea que afecta a humanos y animales, causada por hongos dimórficos del género *Sporothrix*. El hábitat natural del hongo es el suelo y plantas, aunque se ha reportado en una gran variedad de sustratos. (1). La esporotricosis es considerada una enfermedad ocupacional debido a que la población principalmente afectada son agricultores, jardineros, mineros, leñadores y otros profesionales que trabajen en condiciones de humedad y en algunos casos; personal de laboratorio, que tienden a ser infectados por la inoculación accidental del hongo en la piel. (1).

Presenta diferentes formas de transmisión, principalmente por inoculación accidental en heridas en piel y rasguños de mascotas infectadas. Se han registrado casos de esporotricosis sistémicas por inhalación de esporas o conidias. (2).

Frecuentemente sigue el trayecto de los vasos linfáticos y ocasionalmente otros órganos, huesos y articulaciones. Se localiza principalmente en cara y en extremidades torácicas y pélvicas.

La esporotricosis tiene una amplia distribución mundial, aunque se presenta en mayor número en el área latinoamericana, además, no existe una diferencia en la afectación entre sexos y no hay transmisión de humano a humano. (2).

3.-Antecedentes

3.1.- Antecedentes generales

Sporothrix spp.

Sporothrix es un hongo dimórfico causante de infecciones agudas llamadas esporotricosis, caracterizadas por lesiones nodulares cutáneas y subcutáneas con tendencia a ganglios linfáticos. En el medio se encuentra principalmente en plantas o en suelos asociados a éstas, generalmente en climas templados o húmedos.

Presenta 2 formas; la forma micelial o filamentosa (infecciosa) y la levaduriforme (parasitaria). El cambio de forma tiende a presentarse por el medio y la temperatura en que se encuentra. La forma micelial o filamentosa se presenta a temperaturas menores a 37 grados centígrados, y la Levaduriforme en medios enriquecidos y tejidos infectados. (3).

En laboratorio el hongo puede crecer en distintos medios dependiendo de la forma que se busque.

Micelio: Agar glucosa Sabouraud (AGS) y Mycosel, el cual, se caracteriza por presentar colonias de crecimiento con hifas primarias observables de 1.5 a 2 micrómetros de ancho, lisas, hialinas y ramificadas.

Levaduriforme: Infusión cerebro corazón (BHI) a 37 grados centígrados, se caracteriza por presentar células alargadas de 7-9 micrómetros de largo. (3).

Diagnóstico de esporotricosis

El diagnóstico de esporotricosis en laboratorio se hace principalmente mediante cultivo en agar dextrosa Sabouraud con antibióticos, a 25 °C, donde se obtienen colonias características en un período de 3-6 días, que en el transcurso de 10-15 días adquieren un color marrón oscuro; el pigmento es muy evidente después de 30-45 días, (figura1).

Paralelamente se induce la fase parasitaria *in vitro*, sembrando la cepa en medios enriquecidos como infusión cerebro corazón (BHI) o el de agar sangre incubando a 37 °C.

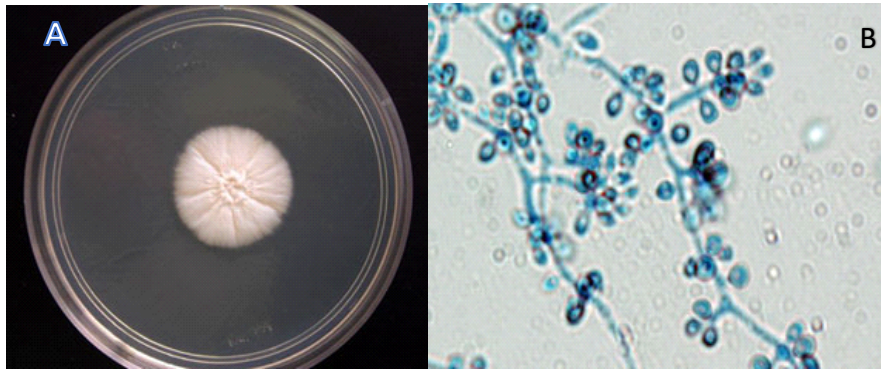


Figura 1. Morfología macroscópica y microscópica de *S. schenckii*.

- A. Cultivo de *Sporothrix spp.* en agar dextrosa Sabouraud
- B. microscopía convencional de fase miceliar de *Sporothrix spp.* tinción azul de algodón. Original, Luis Bernardo Mendoza Monterrosas, Laboratorio de Micología Médica, ICUAP.

Histopatología: en el tejido se encuentra hiperplasia pseudoepiteliomatosa con formación de microabscesos. Se puede ver una imagen granulomatosa con polimorfonucleares, células epitelioides y células gigantes tipo Langhans. Se describe una imagen sifiloide constituida por células plasmáticas, linfocitos y fibroblastos. En ocasiones se observan formas levaduriformes en forma de navicillas o de cigarro de 3-5 μm , (figura 2) presencia de cuerpos asteroides que, aunque no son exclusivos de la esporotricosis se ven casualmente y parecen indicar complejos de reacción antígeno-anticuerpo o capas membranales de neutrófilos.

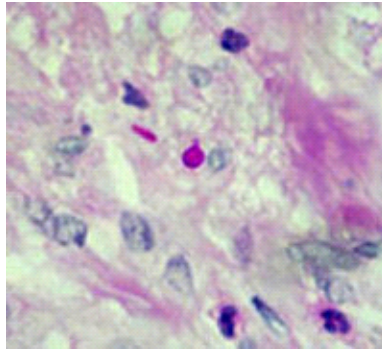


Figura 2. Corte histológico mostrando levaduras gemando y en forma de cigarro. Bravo et al. (4)

Sin embargo, estos diagnósticos permiten la identificación del género *Sporothrix* sin llegar a la identificación pertinente de la especie causante.

3.2.-Antecedentes específicos.

Sporothrix spp.

Resistencia a antifúngicos de *Sporothrix spp.*

Sporothrix spp., presenta la capacidad de generar resistencia a antifúngicos, lo que, en las infecciones causadas por estos agentes es especialmente relevante, ya que, en la mayoría de los casos graves los pacientes tienden a estar inmunocomprometidos, por lo que conocer las resistencias del género *Sporothrix* es indispensable para un tratamiento eficaz. (5).

Varios estudios han clasificado la resistencia de *S. schenckii* por medio de la concentración mínima inhibitoria de 8 microgramos/mililitro de distintos antifúngicos, así como la resistencia a itraconazol de *S. brasiliensis*.

Tabla 1. concentraciones mínimas inhibitorias de *Sporothrix spp.* silvestre y obtenidos de pacientes

<i>Especie Sporothrix</i>	<i>Agente antifúngico</i>	<i>Silvestre (µg/mL)</i>	<i>Obtenido de paciente(µg/mL)</i>
<i>S. schenckii</i>	AMB	≤4	>4
<i>S. schenckii</i>	ITR	≤2	>2
<i>S. schenckii</i>	POS	≤2	>2
<i>S. schenckii</i>	VOR	≤64	>64
<i>S. brasiliensis</i>	Amb	≤4	>4
<i>S. brasiliensis</i>	ITR	≤2	>2
<i>S. brasiliensis</i>	POS	≤2	>2
<i>S. brasiliensis</i>	VOR	≤32	>32
<i>S. brasiliensis</i>	KET	≤2	>2
<i>S. brasiliensis</i>	TERB	≤0.12	>0.12

M38-A2 guideline of the Clinical and Laboratory Standards Institute (6). AMB; anfotericina B, ITR; itraconazol, POS; posaconazol, VOR; voriconazol, KTZ; ketoconazol; TRB, torbinafina. Las especies marcadas como no silvestres sólo han sido identificadas como *sporothrix spp.* con susceptibilidad reducida a antifúngicos, lo que reduce la posible respuesta a una terapia.

Mecanismos de resistencia de *Sporothrix spp.*

Producción de melanina

El género *Sporothrix spp.* puede producir 3 tipos de melanina; DHN-melanina, L-DOPA melanina y pyomelanina. Todos estos pigmentos son metabolitos secundarios de monómeros índolicos y fenólicos. La síntesis de DHN-melanina no requiere ningún precursor específico mientras que la síntesis de L-DOPA y pyomelanina es mayor en la presencia de L-DOPA y L-tirosina. (7)

En la infección, *Sporothrix spp.* sintetiza DHN-melanina, que protege al hongo de la respuesta inmune del huésped y de los antifúngicos, inhibiendo la fagocitosis, suprimiendo la inflamación y causando la muerte celular en macrófagos. Es importante mencionar que la biosíntesis de melanina no está claramente descrita. Sin embargo se conoce que la producción de melanina es más alta y rápida en *S. brasiliensis* que en *S. schenckii*, *S. mexicana* o *S. globosa*. (8).

Otros estudios han demostrado que, en el laboratorio, *S. brasiliensis* y *S. schenckii* son más susceptibles a antifúngicos que *S. globosa* o *S. mexicana*. (9).

Biopelículas en Sporothrix spp.

Una biopelícula es una comunidad de microorganismos que pueden ser de una sola especie o de varias, embebidas en una matriz extracelular y adheridos a superficies bióticas o abióticas (10). Se ha reportado que existen diferentes etapas para la formación de la biopelícula en tiempos dependientes. Una de las primeras etapas en *Sporothrix spp.* es la adhesión de las conidias y levaduras a la matriz extracelular, seguido por una fase de filamentación celular y proliferación, consecuentemente la maduración que resulta en una red micelial embebida en la matriz polimérica extracelular constituida de exopolisacáridos (11).

La importancia de las biopelículas en la salud pública se debe principalmente a que contribuyen a la resistencia a antifúngicos, propiciando las infecciones crónicas; por ejemplo, se han reportado enfermedades como endocarditis valvular, infecciones nosocomiales y fibrosis quística (neumonía), asociadas a las infecciones provenientes de biopelículas fúngicas del género *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* (12).

El género *Sporothrix spp.* es de relevancia clínica por las infecciones que provoca en pacientes inmunocomprometidos y neonatos, las infecciones intrahospitalarias por contaminación de dispositivos médicos, la resistencia farmacológica, el estado crónico de la enfermedad y la falta de prevención de la enfermedad mediante inmunización (13, 14). Estas características indican la capacidad de *Sporothrix spp.* para formar una biopelícula.

Taxonomía, filogenia e identificación molecular de Sporothrix spp.

Sporothrix spp. es un hongo perteneciente al reino fungi, de la división *Ascomycota*, clase *Pyrenomycetes*, orden *Ophiostomatales* y de la familia *Ophiostomataceae* (15).

Existen varios métodos moleculares que han identificado con éxito el género *Sporothrix*, tales como RAPD, RFLP's, PCR y protein finger printing. (16). Sin embargo, los mejores métodos se basan en la identificación y amplificación de locus de genes que codifican para proteínas como Calmodulina, β -tubulina y el factor de elongación de la traducción. (16).

Calmodulina

El calcio tiene un papel importante como segundo mensajero en casi todos los eucariotas, además, tiene una función de proliferación al cambio de forma en hongos como *Sporothrix spp.* La calmodulina 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 antifúngica, patogénesis y virulencia, además de ser considerado como un gen de código de barras, según los últimos estudios reportados, aunque su función exacta en hongos de otros géneros no ha sido identificada. (17).

Al ser esta proteína altamente conservada se han realizado metodologías moleculares para filogenia con base en esta proteína y los genes que la codifican.

4.- Planteamiento del problema

La esporotricosis es una enfermedad de amplia distribución mundial que ha llegado a ser un problema grave de salud pública en varios países del mundo, principalmente en países tropicales con bajos recursos económicos, ya que algunas especies de *Sporothrix* como *S. mexicana*, *S. schenckii* y *S. globosa* tienden a reaccionar negativamente *in vivo* e *in vitro* al tratamiento con antifúngicos de uso común, lo que puede afectar el resultado y la recuperación de los pacientes. (18). Un mal diagnóstico y tratamiento pueden generar manifestaciones severas de la enfermedad, así como el aumento de contagio hombre-mascota y mascota-hombre. La falta de un método de identificación filogenético rápido y de bajo costo favorecen la propagación de la enfermedad.

5.- Objetivos

5.1.-Objetivos Generales.

- Caracterizar por técnicas convencionales aislados de *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix globosa* y *Sporothrix mexicana* obtenidos de suelo, plantas y pacientes.
- Cuantificar la resistencia de los aislados de *Sporothrix spp.* a antifúngicos de uso común en clínica, así como la formación de biopelícula.

5.2.- Objetivos específicos.

- Realizar la identificación fenotípica de aislados de *Sporothrix spp.* obtenidos de pacientes, mascotas, suelo y plantas.
- Obtener la fase levaduriforme de los aislados de *Sporothrix.spp.*
- Cuantificar la resistencia de aislados del género *Sporothrix* obtenidos de pacientes a fluconazol y ketaconazol, así como a yoduro de potasio.
- Realizar ensayos de formación de biopelícula de los aislados de *Sporothrix spp.*
- Realizar ensayos bioinformáticos de alineación de secuencias para probar la complementariedad de los oligonucleótidos a usar y las secuencias del gen de interés.

6.- Material y métodos.

Aislados de *Sporothrix spp.*

Se obtuvieron muestras de *Sporothrix spp.* (25 *Sporothrix schenckii*, 4 *Sporothrix mexicana*, 1 *Sporothrix globosa*) de diferentes orígenes (mascotas, humanos y suelo asociado a plantas) y se cultivaron para su conservación.

6.1 Muestreo

6.1.2 Definición de la unidad de población

Se usaron cepas previamente cultivadas e identificadas del género *Sporothrix* del laboratorio de micología médica.

6.1.3 Selección de la muestra

Se seleccionaron únicamente cepas previamente caracterizadas anteriormente por metodologías moleculares a los genes de calmodulina, β -tubulina y secuenciación de estos mismos genes del género *Sporothrix*.

6.1.4 Tamaño de la muestra

Tabla 2. Tamaño de la muestra de *Sporothrix spp.* para los procedimientos.

	<u>Número de cepa</u>	<u>Género</u>	<u>Especie</u>	<u>Origen</u>
<u>1</u>	36	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>2</u>	143	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>3</u>	179	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>4</u>	212	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>5</u>	S- 08	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Canino
<u>6</u>	S-09	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Canino
<u>7</u>	S-10	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Canino
<u>8</u>	S-11	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Canino
<u>9</u>	S-20	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Felino
<u>10</u>	S- 21	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Felino
<u>11</u>	301	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>12</u>	303	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>13</u>	307	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>14</u>	308	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>15</u>	311	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>16</u>	6014	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>17</u>	6045	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>18</u>	6047	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>19</u>	6048	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>20</u>	6049	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Humano
<u>21</u>	502	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Bugambilia
<u>22</u>	544	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Bugambilia
<u>23</u>	542	<i>Sporothrix</i>	<i>mexicana</i>	Bugambilia
<u>24</u>	549	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	Rosal

<u>25</u>	<u>528</u>	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	<u>Rosal</u>
<u>26</u>	<u>594</u>	<i>Sporothrix</i>	<i>mexicana</i>	<u>Bugambilia</u>
<u>27</u>	<u>635</u>	<i>Sporothrix</i>	<i>mexicana</i>	<u>Rosal</u>
<u>28</u>	<u>547</u>	<i>Sporothrix</i>	<i>schenckii</i>	<u>Rosal</u>
<u>29</u>	<u>551</u>	<i>Sporothrix</i>	<i>mexicana</i>	<u>Rosal</u>
<u>30</u>	<u>globosa</u>	<i>Sporothrix</i>	<i>globosa</i>	<u>Humano</u>

6.1.5.- Técnicas y procedimientos

Se tomaron cepas de *S. schenckii*, *S. mexicana* y *S. globosa* obtenidos de pacientes, se cultivaron en agar micosel, para obtener su fase micelial, posteriormente se realizaron precultivos en caldo Sabouraud para la obtención de conidios y estos conidios se sembraron en agar BHI a 37c para la obtención de levaduras de los aislados. Todo se realizó por duplicado.

Ensayo de antifungigrama

Se tomaron cepas de *Sporothrix schenckii*, *mexicana* y *globosa* obtenidos de pacientes, se cultivaron en agar micosel, para obtener su fase micelial. Posteriormente se realizó un precultivo en caldo Sabouraud para la obtención de conidios y estos conidios se sembraron en agar *Muller Hinton* para susceptibilidad a antibióticos y antifúngicos, junto con discos para antifungigrama con los sig. Antifúngicos: ketoconazol, fluconazol. También se añadió a la prueba un disco con una solución de yoduro de potasio, el cuál es el tratamiento estándar para la esporotricosis, así como el control, un disco con agua tridestilada estéril. Todo se hizo por duplicado.

Ensayo de biopelícula

Tras los antifungigramas, se tomaron muestras de conidios de las 3 especies y se incubaron en 9 ml de caldo Sabouraud por 12, 24 y 48 horas.

Posteriormente se tomaron 100 µl y se colocaron en una cámara de Neubauer para cuantificar las células, buscando una concentración de 1 millón de células por ml. Una vez alcanzada esta concentración celular, se tomaron 200 µl de este cultivo líquido y se

colocaron en tubos Eppendorf estériles, y se incubaron a 36 grados centígrados en agitación a 100 rpm por 48 horas.

Después de las 48 horas, Se añadieron 40 µl de cristal violeta al 0.5% y se dejaron en reposo la muestras por 30 min.

Se cambiaron las muestras a un nuevo tubo Eppendorf estéril y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. Se retiró el sobrenadante de las muestras y se añadieron 1ml de agua estéril a cada muestra con el fin de resuspender la pastilla resultante de la centrifugación con ayuda de un agitador.

Una vez las muestras se encontraron resuspendidas se colocaron en celdas para lectura al espectrofotómetro y se leyeron a 570 nm.

Oligonucleótidos

Se utilizaron una serie de oligonucleótidos complementarios a la secuencia del gen CAL previamente descritos. (19)

PCR Touchdown

Se realizará un PCR touchdown con las sigs. Condiciones (19).

1.- Se realizaron PCRs de conidios, obteniendo los conidios de cultivos en agar Sabouraud y agregando 300 µl de agua ultrapura, se agitó en círculos el cultivo con el fin de desprender los conidios del micelio. La solución obtenida se diluyó a 1:1 en agua ultrapura y en tubos de 200 µl se calentó a 95°C por 10 minutos con el fin de disrumpir los conidios y obtener DNA. Una vez obtenida esta solución se tomaron 2 µl para usar como DNA base en una reacción PCR y el protocolo fue el planteado para PCR touchdown, sólo aumentando el tiempo inicial a 95°C de 5 min a 10 min.

2.-Se prepararon las reacciones a un volumen final de 25 microlitros, incluyendo 12.5 microlitros de PCR master mix, 9.5 microlitros de agua libre de nucleasas, 1 microlitro de los oligonucleótidos forward y reverse (10 pmol/μl) y 1 microlitro de DNA base.

1. Se realizó la PCR touchdown tomando las sig. Condiciones en los ciclos.

5 min. a 95°C

Ciclo 1: 95°C-1min, 72°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 2: 95°C-1min, 71.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 3: 95°C-1min, 71°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 4: 95°C-1min, 70.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 5: 95°C-1min, 70°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 6: 95°C-1min, 69.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 7: 95°C-1min, 69°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 8: 95°C-1min, 68.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 9: 95°C-1min, 68°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 10: 95°C-1min, 67.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 11: 95°C-1min, 67°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 12: 95°C-1min, 66.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 13: 95°C-1min, 66°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 14: 95°C-1min, 65.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 15: 95°C-1min, 65°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 16: 95°C-1min, 64.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 17: 95°C-1min, 64°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 18: 95°C-1min, 63.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 19: 95°C-1min, 63°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 20: 95°C-1min, 62.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 21: 95°C-1min, 62°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 22: 95°C-1min, 61.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 23: 95°C-1min, 61°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 24: 95°C-1min, 60.5°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 25: 95°C-1min, 60°C-1min, 72°C-1min

Ciclo 26: 95°C-1min, 60°C-1min, 72°C-1min

10 min a 72°C

Tabla 3. Pasos de PCR.

Pasos de Pcr	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Extensión final
Temperatura	90 °C-95°C	90 °C-95°C	55°C-60°C	72°C	72°C
Tiempo	3 minutos	1 minuto	50 segundos	1 minuto	7 minutos
	-----	-----	25 ciclos	-----	-----
		-		--	--

Visualización del amplificado en gel de agarosa

El amplificado obtenido se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. Se mezcló el DNA con 1.6 µl de buffer de carga y agua destilada estéril hasta un volumen final de 10 µl. Las mezclas se depositaron en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml, se aplicó una corriente de 70 volts durante una hora y media. Las muestras se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

7.-Resultados.

Antifungigramas

Se sembraron cepas de *Sporothrix schenckii*, *mexicana* y *globosa* obtenidos de pacientes. Las cuales, se cultivaron en agar micosel, para obtener su fase micelial. Una vez obtenidos la fase micelial de cada una de las especies, se realizó un cultivo en caldo Sabouraud para la obtención de conidios y se sembraron en agar Muller-Hinton para susceptibilidad a antibióticos y antifúngico. La caja Petri de igual manera se preparó con discos para antifungigrama con los siguientes antifúngicos: ketoconazol, y fluconazol. También se añadió a la prueba un disco con una solución de yoduro de potasio, el cuál es el tratamiento

estándar para la esporotricosis, así como el control, un disco con agua tridestilada estéril. Todo se hizo por duplicado.

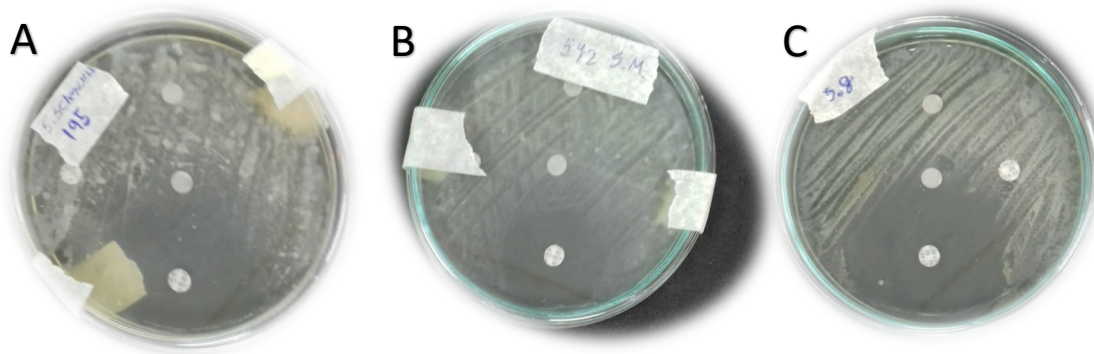


Figura 3. Antifungigrama de *Sporothrix schenckii* (A) mexicana (B) y globosa (C) en agar Muller-Hinton para susceptibilidad a antifúngicos. Discos presentes con agua tridestilada estéril (control) al centro, yoduro de potasio arriba, Fluconazol a la izquierda en (A) y (B) y derecha en (C) y Ketoconazol abajo.

Tabla 4. Resultados de resistencias obtenidas a antifúngicos de *Sporothrix Spp.*

	<u>Número de cepa</u>	<u>Género y especie</u>	<u>Resistencia a</u>	<u>Sensibilidad a</u>
<u>1</u>	<u>36</u>	<i><u>Sporothrix Schenkii</u></i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>ketoconazol</u>
<u>2</u>	<u>143</u>	<i><u>Sporothrix Schenkii</u></i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>Ketoconazol</u>
<u>3</u>	<u>179</u>	<i><u>Sporothrix Schenkii</u></i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>ketoconazol</u>
<u>4</u>	<u>212</u>	<i><u>Sporothrix Schenkii</u></i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>Ketoconazol</u>
<u>5</u>	<u>S- 08</u>	<i><u>Sporothrix Schenkii</u></i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>Ketoconazol</u>
<u>6</u>	<u>S-09</u>	<i><u>Sporothrix Schenkii</u></i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>Ketoconazol</u>
<u>7</u>	<u>S-10</u>	<i><u>Sporothrix Schenkii</u></i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>Ketoconazol</u>
<u>8</u>	<u>S-11</u>	<i><u>Sporothrix Schenkii</u></i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>Ketoconazol</u>

<u>9</u>	<u>S-20</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>10</u>	<u>S- 21</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>11</u>	<u>301</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>12</u>	<u>303</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>13</u>	<u>307</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>14</u>	<u>308</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>ketoconazol</u>
<u>15</u>	<u>311</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>16</u>	<u>6014</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>17</u>	<u>6045</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>18</u>	<u>6047</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>

<u>19</u>	<u>6048</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>20</u>	<u>6049</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>21</u>	<u>502</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>22</u>	<u>544</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>23</u>	<u>542</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Mexicana</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>24</u>	<u>549</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>25</u>	<u>528</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>26</u>	<u>594</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Mexicana</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>27</u>	<u>635</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Mexicana</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>
<u>28</u>	<u>547</u>	<i><u>Sporothrix</u></i> <i><u>Schenkii</u></i>	Fluconazol yoduro potasio	y de	<u>Ketoconazol</u>

29	<u>551</u>	<i>Sporothrix Mexicana</i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>Ketoconazol</u>
30	<u>globosa</u>	<i>Sporothrix globosa</i>	Fluconazol y yoduro de potasio	<u>Ketoconazol</u>

cepa	Especie	ketoconazol	fluconazol	Yoduro de Agua Potasio	
globosa	<i>S. Globosa</i>	sensible	resistente	resistente	Resistente
195	<i>S. schenckii</i>	sensible	resistente	resistente	Resistente
542	<i>S. Mexicana</i>	sensible	resistente	resistente	Resistente

Figura 4. resultados comparativos con respecto a la formación de halos de inhibición. Tabla de valores de referencia para el diámetro de halos de inhibición a antimicóticos de uso clínico.

	Sensible	Intermedio	Resistente
Azoles	≥ 30mm	23-29mm	≤22 mm
AMB	≥20mm	12-19mm	≤ 11 mm
Itraconazol	≥15mm	10-14mm	Sin halo

Tabla 5. Valores de referencia para el diámetro de halos de inhibición a antimicóticos de uso clínico.

Con respecto a los datos en las tablas anteriores se puede concluir que todas las especies sometidas a los antifungigramas son sensibles a ketoconazol y resistentes a fluconazol y yoduro de potasio.

Ensayos de biopelícula

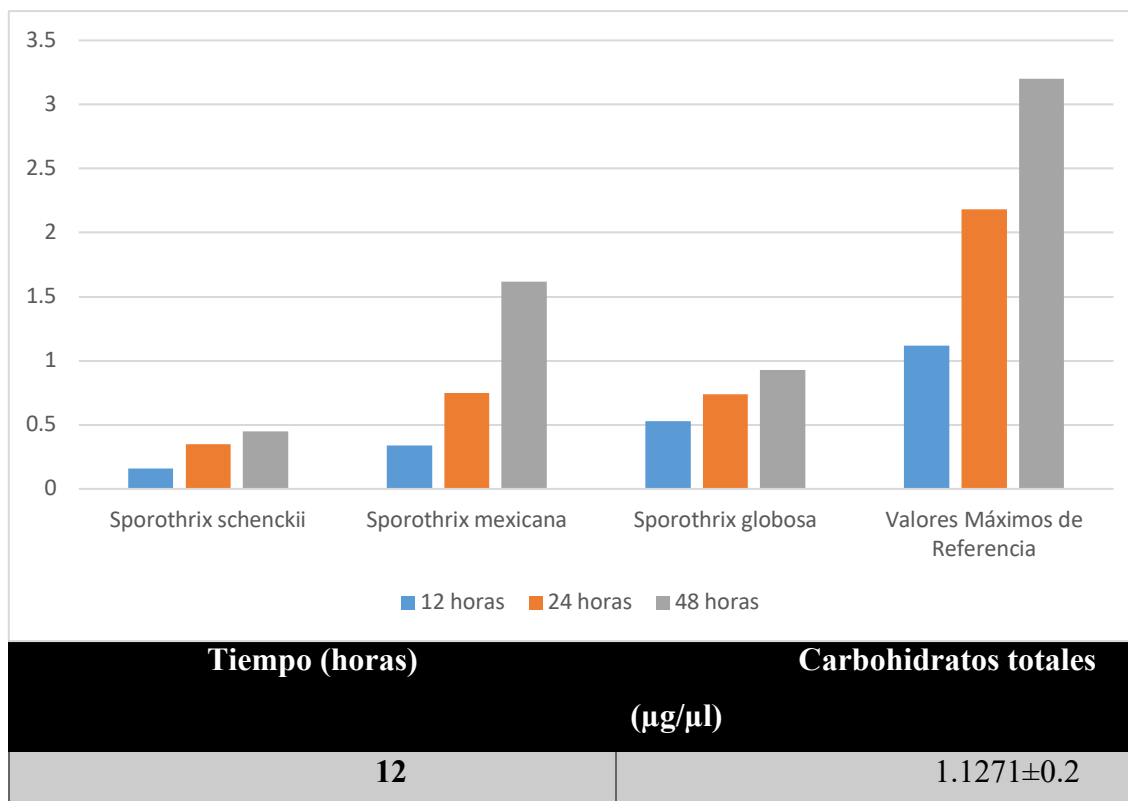
Tras los antifungigramas, se tomaron muestras de conidios de las 3 especies y se incubaron en 9 ml de caldo Sabouraud por 12, 24 y 48 hrs.

Posteriormente se tomaron 100µl y se colocaron en una cámara de Neubauer para cuantificar las células, buscando una concentración de 1 millón de células por ml. Una vez alcanzada esta concentración celular, se tomaron 200 µl de este cultivo líquido y se colocaron en tubos eppendorf estériles, y se incubaron a 36°C en agitación a 100 rpm por 48 hrs.

Después de las 48 hrs. Se añadieron 40 µl de cristal violeta al 0.5% y se dejó en reposo la muestra por 30 min.

Se cambiaron las muestras a un nuevo tubo eppendorf estéril y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. Se retiró el sobrenadante de las muestras y se añadió 1 ml de agua estéril a cada muestra con el fin de resuspender la pastilla resultante de la centrifugación con ayuda de un agitador.

Una vez las muestras se encontraron resuspendidas se colocaron en celdas para lectura al espectrofotómetro y se leyeron absorbencias a 570nm.



24	2.1829±0.124
48	3.2883±0.094

Figura 4. Gráfica comparativa de biomasa en biopelícula por especie del género *Sporothrix*. En $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Tabla 6. Valores de referencia para biomasa con respecto a la absorbencia a 570nm y tiempo en *Sporothrix spp.* (20).

Con base en la figura 4, podemos concluir la siguiente tabla.

Tabla 7. Cepas de *Sporothrix Spp.* y su formación de biopelícula.

<u>1</u>	<u>Número de cepa</u>	<u>Género y especie</u>	<u>Formación de biopelícula</u>
<u>1</u>	<u>36</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	Baja
<u>2</u>	<u>143</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	Baja
<u>3</u>	<u>179</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	Baja
<u>4</u>	<u>212</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	Baja
<u>5</u>	<u>S- 08</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	Baja
<u>6</u>	<u>S-09</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>7</u>	<u>S-10</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>8</u>	<u>S-11</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>9</u>	<u>S-20</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>10</u>	<u>S- 21</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>11</u>	<u>301</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>12</u>	<u>303</u>	<u><i>Sporothrix schenkii</i></u>	Baja

<u>13</u>	<u>307</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>14</u>	<u>308</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	Baja
<u>15</u>	<u>311</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	Baja
<u>16</u>	<u>6014</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	Baja
<u>17</u>	<u>6045</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	Baja
<u>18</u>	<u>6047</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	Baja
<u>19</u>	<u>6048</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	Baja
<u>20</u>	<u>6049</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	Baja
<u>21</u>	<u>502</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>22</u>	<u>544</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>23</u>	<u>542</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>mexicana</i></u>	<u>Abundante</u>
<u>24</u>	<u>549</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	<u>Baja</u>
<u>25</u>	<u>528</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>schenkii</i></u>	Baja
<u>26</u>	<u>594</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>mexicana</i></u>	abundante
<u>27</u>	<u>635</u>	<u><i>Sporothrix</i></u> <u><i>mexicana</i></u>	abundante

<u>28</u>	<u>547</u>	<u>Sporothrix</u> <u>schenkii</u>	<u>Baja</u>
<u>29</u>	<u>551</u>	<u>Sporothrix</u> <u>mexicana</u>	abundante
<u>30</u>	<u>globosa</u>	<u>Sporothrix</u> <u>globosa</u>	media

Ensayos bioinformáticos.

Se realizaron alineamientos bioinformáticos sobre la complementariedad de los oligonucleótidos a usarse en los experimentos de PCR touchdown con respecto a las secuencias del gen de calmodulina en *Sporothrix schenkii*, *mexicana* y *globosa*.

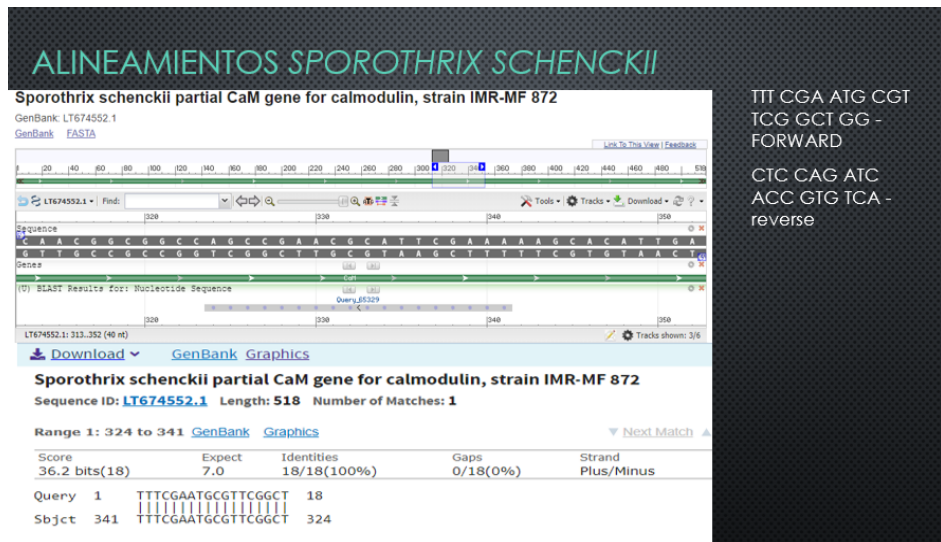
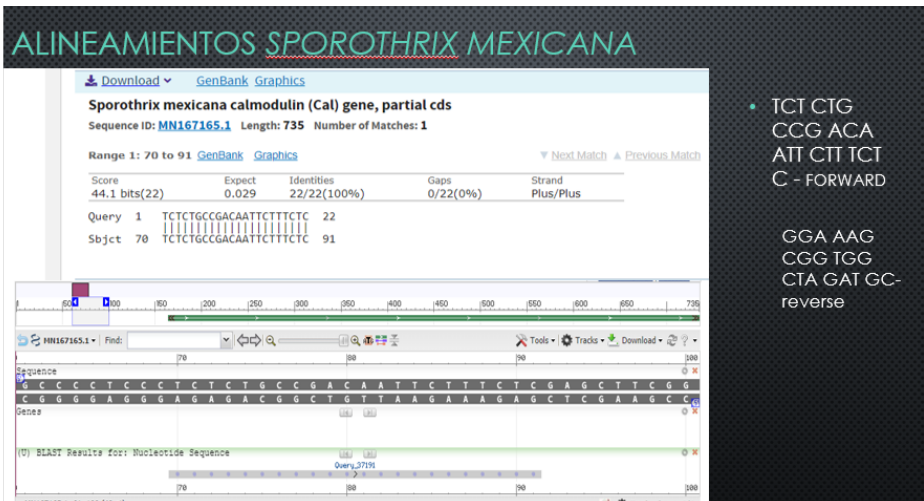


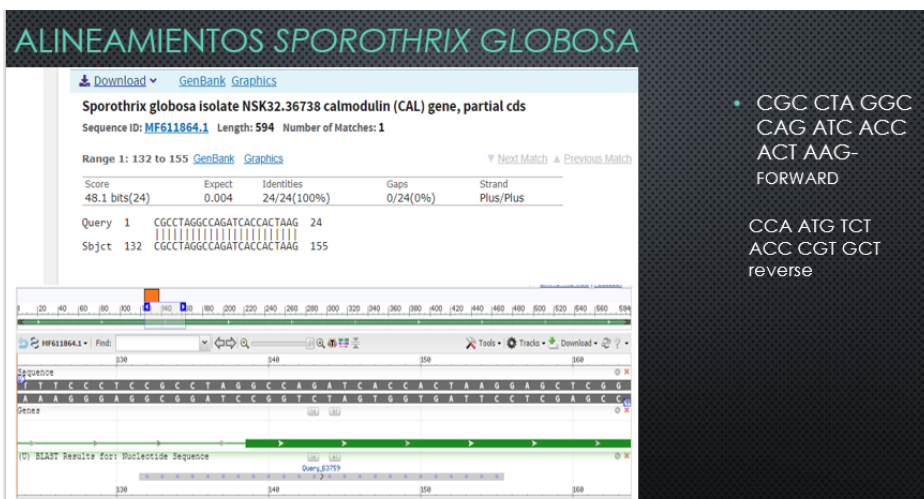
Figura 5 alineamientos de los oligonucleótidos al gen de calmodulina de *Sporothrix schenkii*



TCT CTG
CCG ACA
ATT CTT TCT
C - FORWARD

GGA AAG
CGG TGG
CTA GAT GC-
reverse

Figura 6. Alineamientos de los oligonucleótidos al gen de calmodulina de *Sporothrix mexicana*.



CGC CTA GGC
CAG ATC ACC
ACT AAG-
FORWARD

CCA ATG TCT
ACC CGT GCT
reverse

Figura 7. Alineamientos de los oligonucleótidos al gen de calmodulina de *Sporothrix globosa*

Con base en los alineamientos mostrados en las figuras 10,11 y 12, pudimos comprobar que los oligonucleótidos tienen un 100% de identidad a las secuencias de interés, por lo que se podían esperar resultados positivos en el PCR.

8.- Discusión

Los resultados obtenidos muestran que con respecto a la identificación no se puede discernir entre las especies del género *Sporothrix* a simple vista, sin embargo, el perfil de resistencia y la capacidad que tienen para producir biopelícula pueden ser herramientas útiles para identificarlos fenotípicamente.

La morfología colonial en la forma filamentosa es similar en todas las especies del género, se describen como redondas, blancas y duras, en algunos casos de apariencia vellosa y en algunas ocasiones oscuras por la producción de melanina, sin embargo, esta última no es dependiente del género, ya que las vías no son tan descritas, diversos autores infieren que podría por la temperatura de crecimiento, variabilidad genética e incluso la cantidad de resiembras del aislado. (20)

De igual manera, se han descrito variaciones morfológicas entre aislados de la misma especie, posiblemente relacionado con la localización geográfica de la muestra y variaciones intraespecíficas, siendo estas diferencias mejor descritas y más presentadas en aislados de *Sporothrix mexicana*, que se consideran morfológicamente atípicos (21).

Con respecto a los perfiles de resistencia se pudo observar que aunque todos son sensibles a ketokonazol, el halo de inhibición fue mucho menor en el caso de *S. mexicana* que en *S. schenckii* y en *S. globosa*. Por lo que, en alguna muestra de origen silvestre o clínico, sin identificar, podría hacerse un perfil de resistencia y comenzar a descartar alguna de las especies. De igual manera se debe considerar que los perfiles de resistencia pueden variar dependiendo de la procedencia de la muestra, dada la diversidad genética en las especies del género *Sporothrix*. (22)

Una vez tomando en cuenta los perfiles de resistencia, en cuanto a los métodos de identificación fenotípica se refiere, el siguiente en tomar en cuenta es la capacidad de formación de biopelícula de las distintas especies del género *Sporothrix*. Los ensayos realizados en esta tesis dan prueba de que los 3 géneros comparados producen diferentes cantidades de biopelícula. *S. schenckii* no produce de manera mínima, *S. mexicana* la produce de manera abundante y *S. globosa* la produce en medida media. Sin embargo, como sólo se tomó una muestra de cada especie, es pertinente mencionar que alguna variante encontrada en diferente suelo o paciente podría generar datos diferentes a los obtenidos, como los

reportados en la literatura por Sánchez-Herrera et. al. a finales del 2020. Dichos datos reportan la relación entre la formación de biopelícula y la resistencia a fluconazol en algunos aislados de *Candida spp.* y de *Sporothrix schenckii*, que a pesar de haberse reportado previamente sin la capacidad de formación de biopelícula se ha encontrado que dicha posible formación pueda ser condicionada por un pH menor a 5. Igualmente, se menciona que más investigación es necesaria para comprobar las condiciones de formación de biopelícula, así como su relación con la resistencia a antifúngicos en los demás miembros del género *Sporothrix spp.* (23).

Debe mencionarse que las características fenotípicas que se han descrito en la literatura también tienen variaciones descritas, de las que se consideran responsables del tiempo y conservación de la muestra, ya que se ha encontrado que algunas muestras conservadas por largo tiempo han generado resiembras con capacidades distintas a las reportadas previamente, como la producción de melanina, la pérdida de la habilidad de dimorfismo e incluso la producción de biopelícula. (24)

La identificación genotípica, a pesar de sus altos costos, ofrece las respuestas que muchas veces la identificación fenotípica no puede ofrecer, la más popular, la secuenciación ha sido utilizada en años recientes para identificar muchos de los aislados en el laboratorio de micología médica del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (ICUAP), los cuales fueron utilizados para los experimentos en esta tesis. Sin embargo, la técnica a desarrollar y estandarizar, el PCR touchdown usando oligonucleótidos género específicos, propone una alternativa de bajo costo comparada con la secuenciación.

También debe recalarse la importancia de los recientes análisis genómicos en las especies del género *Sporothrix*, que, aunque son comparativas con otros hongos dimórficos con relaciones filogenéticas distantes, han brindado datos que podrían ayudar a la creación de métodos diagnóstico-rápidos, con base en las vías metabólicas, que, a pesar de no estar descritas, podrían ser utilizadas en el futuro cercano. (25)

Debido a la pandemia de SARS-COV2, iniciada a principios del 2021, la estandarización de esta nueva técnica no fue posible, se realizaron varios ensayos de extracción de DNA de conidios, PCR de conidios y PCR de colonia, pero ninguno fue exitoso. Se estaban realizando planeaciones para utilizar un diferente tipo de extracción de DNA para concluir la

estandarización de la técnica, pero el aislamiento inminente no permitió la conclusión de dichos procesos.

9.- Conclusiones

Aunque los métodos de diagnóstico e identificación fenotípicos son más sencillos y baratos, aún tienen oportunidad de mejorar su especificidad. Como se ha discutido previamente, muchas de las características que permiten la identificación fenotípica pueden presentar variaciones fuera de lo reportado por la literatura, por lo que se deben usar como diagnósticos presuntivos y no definitivos.

Con respecto a la resistencia a antifúngicos en este trabajo, así como en la literatura no hay una diferencia significativa entre las resistencias a antifúngicos, sin embargo, sí se encontró una diferencia entre las formaciones de biopelícula de los aislados.

Es de suma importancia generar más metodologías de identificación genotípicas rápidas y de bajo costo para su uso clínico o incluso casero, ya que las diferencias fenotípicas pueden parecer subjetivas además de tomar más tiempo.

10.- Referencias

- 1.- Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. 2006. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78:293–308.
- 2.- Rodrigues AM, de Hoog S, de Camargo ZP. 2013. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Medical Mycology* 51:405–412.
- 3.- Marimon R, Cano J, Gené Josepa, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. 2007. *sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *sporothrix* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology* 45:3198–3206.

- 4.- Bravo TC. 2012. Esporotricosis: Avances Recientes en el diagnóstico de ... - medigraphic. www.mediagraphic.org.mx.
- 5.- Waller SB, Dalla Lana DF, Quattrin PM, Ferreira MR, Fuentefria AM, Mezzari A. 2020. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: An overview. *Brazilian Journal of Microbiology* 52:73–80.
- 6.- Marimon R, Serena C, Gené Josepa, Cano J, Guarro J. 2008. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:732–734.
- 7.- Almeida-Paes R, Frases S, Araújo Gde, de Oliveira MM, Gerfen GJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. 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* 78:8623–8630.
- 8.- Morris-Jones R, Youngchim S, Gomez BL, Aisen P, Hay RJ, Nosanchuk JD, Casadevall A, Hamilton AJ. 2003. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infection and Immunity* 71:4026–4033.
- 9.- Barros MB, de Almeida Paes R, Schubach AO. 2011. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews* 24:633–654.
- 10.- Brilhante RS, Pereira VS, Nobre AF, Oliveira JS, Fernandes MR, Costa Ada, Rodrigues AM, Camargo ZP, Pereira-Neto WA, Sidrim JJ, Rocha MF. 2020. Exogenous fungal quorum sensing molecules inhibit planktonic cell growth and modulate filamentation and biofilm formation in the *Sporothrix schenckii* complex. *Biofouling* 36:909–921.
- 11.- Sánchez-Herrera R, Flores-Villavicencio LL, Pichardo-Molina JL, Castruita-Domínguez JP, Aparicio-Fernández X, Sabanero López M, Villagómez-Castro JC. 2020. Analysis of biofilm formation by *Sporothrix schenckii*. *Medical Mycology* 59:31–40.

- 12.- Al-Fattani MA, Douglas LJ. 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical Composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology* 55:999–1008.
- 13.- De las biopelículas en la práctica médica I. Artículo de revisión [Internet]. Medigraphic.com. 2010 [citado el 12 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2010/rmd101d.pdf>
- 14.- López-Romero E, Reyes-Montes Mdel, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagómez-Castro JC, Mora-Montes HM, Flores-Carreón A, Toriello C. 2011. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiology* 6:85–102.
- 15.- de Meyer EM, de Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AM, de Hoog GS, Vismer HF, Wingfield MJ. 2008. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in *Theophiostoma Stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* 100:647–661.
- 16.- Marimon R, Gené Josepa, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazéra Márcia, Guarro J. 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology* 44:3251–3256.
- 17.- Valle-Aviles L, Valentin-Berrios S, Gonzalez-Mendez RR, Rodriguez-del Valle N. 2007. Functional, genetic and bioinformatic characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*. *BMC Microbiology* 7.
- 18.- MG; BJHGHCKHRR. Fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Sporothrix schenckii*. successful treatment with itraconazole. *Archives of pathology & laboratory medicine*. U.S. National Library of Medicine.
- 19.- Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. 2015. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9.

- 20.- Sánchez Herrera R, Flores Villavicencio LL, Padilla Guerrero I, Barbosa Sabanero G, Sabanero López M. 2015. Formación de biopelículas en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii*: Desarrollo, Arquitectura y Características bioquímicas. *Acta Universitaria* 24:11–15.
- 21.- Dias NM, Oliveira MM, Portela MA, Santos C, Zancope-Oliveira RM, Lima N. 2011. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. *Emerging Infectious Diseases* 17:1975–1976.
- 22.- Flórez-Muñoz SV, Alzate JF, Mesa-Arango AC. 2018. Molecular identification and antifungal susceptibility of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* complex in Medellín, Colombia. *Mycopathologia* 184:53–63.
- 23.- Sánchez-Herrera R, Flores-Villavicencio LL, Pichardo-Molina JL, Castruita-Domínguez JP, Aparicio-Fernández X, Sabanero López M, Villagómez-Castro JC. 2020. Analysis of biofilm formation by *Sporothrix schenckii*. *Medical Mycology* 59:31–40.
- 24.- Barreira T, Corrêa-Moreira D, Borba C, Moraes A, Oliveira M. 2022. Molecular and phenotypic reidentification of *Sporothrix schenckii* clinical isolates preserved under mineral oil for 34 to 64 years in a culture collection in Brazil. *Current Research in Microbial Sciences* 3:100128.
- 25.- Teixeira MM, de Almeida LG, Kubitschek-Barreira P, Alves FL, Kioshima ÉS, Abadio AK, Fernandes L, Derengowski LS, Ferreira KS, Souza RC. 2014. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genomics* 15.