

Métodos diagnósticos en onicomycosis. Del KOH a la biología molecular

Diagnostic tools in onychomycosis:

From KOH to molecular biology

Edoardo Torres Guerrero*, Ixchel Landgrave*, Ramón Fernández**, Roberto Arenas***

* Residente

** Adscrito a la sección de Micología

*** Jefe de la sección de Micología del Hospital "Dr. Manuel Gea González", Secretaría de Salud

RESUMEN

Las tiñas o dermatofitosis son un grupo de micosis superficiales de la piel y sus anexos, causadas por dermatofitos. "Onicomycosis" es el término para definir la afección micótica de las uñas, que representa más de 50% de las enfermedades de éstas y se clasifica en seis formas clínicas: 1) onicomycosis subungueal distal lateral, 2) onicomycosis blanca proximal subungueal, 3) onicomycosis blanca superficial, 4) onicomycosis distrófica total, 5) endonix y 6) perionix.

El diagnóstico de onicomycosis debe confirmarse por la identificación de los hongos mediante varias técnicas como la microscopía directa con hidróxido de potasio (KOH), combinación de KOH con DMSO y negro de clorazol, estudio histomicológico con ácido peryódico de Schiff (PAS) y cultivos en agar de *Sabouraud* y agar micobiótico o DTM (*Dermatophyte test médium*).

En la última década se registraron grandes avances en los métodos moleculares para la identificación rápida y sensible de dermatofitos, lo que contribuyó al mayor conocimiento de la taxonomía y relaciones filogenéticas de estos hongos. Hace poco se aplicaron técnicas de biología molecular para identificar especies de dermatofitos, como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, o una combinación de PCR con secuenciación de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la cual se realiza en muestras de biopsia o de queratina. Dichas pruebas no presentan tasas altas de resultados falsos negativos como los estudios de rutina y resultan de gran importancia, dada la creciente cantidad de nuevos antimicóticos con espectro diferente de actividad y la emergencia de hongos, en especial mohos no dermatofíticos, menos sensibles o que no responden a la terapia con antimicóticos orales.

PALABRAS CLAVE: onicomycosis, KOH, PCR, técnicas moleculares

ABSTRACT

Tinea or dermatophytoses are a group of superficial mycoses caused by dermatophytes. Onychomycosis is a fungal nail infection and represents about 50% of nail diseases. Onychomycoses are classified in 6 clinical forms: 1) subungal distal and lateral onychomycosis, 2) white subungal proximal onychomycosis, 3) white superficial onychomycosis, 4) total dystrophic onychomycosis, 5) endonyx and 6) paronychia.

Diagnosis must be confirmed by fungal identification though several diagnostic techniques such as direct microscopic examination with potassium hydroxide, KOH plus DMSO and chlorazole black, histomycologic stains with PAS and cultures in Sabouraud agar, mycobiologic and DTM agar.

In the last decade significant advances have been made in molecular techniques for rapid and sensitive identification of dermatophytes improving our knowledge in taxonomy and filogenetics. Nowadays molecular biology is used to identify dermatophytes as polymerase chain reaction (PCR) in real time, or a combination of PCR with restriction fragment length polymorphism (RFLP) that could be performed in biopsy or keratin samples to identify dermatophytes species. These tests don't have a high ratio of negative results as routine tests.

New procedures have an actual relevance for testing antifungal drugs and also to detect the emergence of resistant fungi.

KEYWORDS: Onychomycosis, KOH, PCR, molecular biology

CORRESPONDENCIA

Doctor Roberto Arenas ■ rarenas98@hotmail.com

Introducción

Los hongos son organismos eucariotas abundantes en el medio natural. En el cuerpo humano existen como saprófitos o parásitos. Cuando el parásito ocasiona una enfermedad declarada en un individuo expuesto, se llama patógeno.^{1,2}

Las infecciones micóticas en el ser humano se dividen en micosis superficiales, subcutáneas y sistémicas. Las formas superficiales se limitan a piel, pelo, uñas y mucosas, clasificadas de la siguiente forma:

- Dermatofitosis
- Candidiasis cutáneo mucosa
- Pitiriasis versicolor y otras infecciones del género *Malassezia*
- Micosis superficiales menos frecuentes, como tiña negra y pedras.¹

Las tiñas o dermatofitosis son un grupo de enfermedades micóticas superficiales de la piel y anexos cutáneos, causadas por hongos parásitos de la queratina, que invaden, parasitan y se desarrollan en estructuras que contienen este material.^{2,3}

Desde los antiguos griegos y romanos se describieron las micosis superficiales, pero fue hasta 1845 cuando Malmstein creó el género *Trichophyton* e identificó a *T. tonsurans*. En 1847, Robin habló de *T. mentagrophytes*,² y en 1927 Weidman registró la primera infección podal por *T. rubrum*.^{2,4}

Los dermatofitos constituyen un grupo extenso y homogéneo de hongos con características taxonómicas, fisiológicas, antigénicas y patogénicas similares, y sólo presentan leves diferencias nutricionales y enzimáticas.

Con base en su distribución ecológica se dividen en geófilos o telúricos, zoofílicos y antropofílicos. Los hongos geófilos se consideran ancestros de los dermatofitos patógenos, y pasaron del suelo al ser humano; los zoofílicos evolucionaron parcialmente del suelo hacia los animales,² y los hongos antropofílicos evolucionaron a partir de especies antropofílicas y pasan de una persona a otra por medio de epitelios en descamación y pelos.⁵

Los dermatofitos se dividen clásicamente en tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, ninguno de los cuales forma parte de la flora normal de la piel.¹ Se distinguen entre sí por sus conidios, que corresponden a la espora externa asexual, en especial por sus macroconidios, específicos de cada género. Para los dos primeros, sus teleomorfos o estados perfectos de reproducción sexual pertenecen al género *Arthroderma*, phylum *Ascomycota*. No se ha descrito forma perfecta para el tercer género, que sólo presenta dos especies, de las cuales únicamente *E. floccosum* es patógena para los seres humanos.²

Las tiñas inician con la colonización de la capa córnea de la piel, el pelo o las uñas por alguna de las especies de dermatofitos. La capacidad de los dermatofitos para invadir diferentes tipos de queratina varía de una especie a otra. Todas pueden invadir la piel, pero sólo algunas invaden el pelo o las uñas; *T. rubrum* raramente invade el pelo, aunque con frecuencia se encuentra en la uñas.¹

Onicomycosis

Onicomycosis es el término para definir la afección micótica de las uñas. Tradicionalmente se reservaba para las infecciones ungueales causadas por hongos no dermatofitos, mientras que con el término “tiña ungueal” se denominaban afecciones ungueales causadas por dermatofitos; en la actualidad se utiliza como término general para toda infección fúngica del aparato ungueal.⁶

La onicomycosis es la infección fúngica crónica del aparato ungueal de las uñas tanto de los pies como de las manos, y representa más de 50% de las enfermedades de las uñas.⁷ Los dermatofitos se encuentran en 90% de onicomycosis de las uñas de los pies y 50% de las micosis ungueales de las manos.⁸ Las onicomycosis destacan por su cronicidad y dificultad diagnóstica.^{1,9}

En México, según el Consenso Nacional de Micosis, las tiñas se observan con una frecuencia de 30% en la población general^{2,10} y constituyen 10% de las dermatofitosis;¹¹ los principales grupos afectados se encuentran entre la tercera y sexta décadas de vida, con mayor frecuencia entre los 26 y 35 años,¹⁰ y se incrementa en ancianos y personas con factores predisponentes, como diabetes, insuficiencia arterial, inmunodepresión, psoriasis, tiña de los pies, con historia de trauma crónico en las uñas de los pies o en quienes presentan algún hábito en particular, como deportistas o fumadores.⁷ Se encuentran portadores sanos en 13.5%.²

En la población pediátrica mexicana, Arenas encontró una incidencia de 1.3 a 4.8%,¹² y de esta población, el sector más afectado fueron los adolescentes.¹³ Por otra parte, en Estados Unidos se encuentra afectada de 2 a 13% de la población general.^{9,14}

Entre las onicomycosis causadas por dermatofitos predomina *Trichophyton rubrum* con 87% en nuestro medio,^{11,15} mientras que en Europa se encuentra hasta en 90% de los casos.¹⁶ *T. mentagrophytes* causa 20% de onicomycosis,¹⁷ mientras que levaduras y hongos oportunistas causan 1.7%.^{9,11}

Estudios realizados en Dinamarca demostraron una frecuencia de hasta 27.1% de onicomycosis en pacientes con psoriasis, asociada a alteraciones ungueales propias de esta enfermedad.¹⁸ En México, Arenas y colaborado-

res encontraron en un estudio realizado con 101 pacientes con psoriasis, una frecuencia de 28.7% de onicomicosis por examen directo y de 22% por cultivo, con 11% correspondiente a dermatofitos y 12% a *Candida* sp.¹⁹

Los factores favorecedores son calor, sudor, calzado estrecho o de plástico, enfermedad vascular periférica y depresión de la inmunidad. Se relaciona asimismo con la mala higiene y la costumbre de no secarse los pies. En la actualidad suele asociarse al uso de zapatos tenis.¹¹

En las uñas, el dermatofito penetra por la queratina blanda del hiponiquio, por el borde lateral de la uña o por la lúnula, y afecta el eponiquio; casi nunca lo hace por la superficie de la lámina ungueal. Después afecta el lecho y la uña misma por actividad enzimática, para extenderse por una red de túneles excavados en la queratina sin invadir la matriz.²

En 1998, Baran y colaboradores establecieron la clasificación actual de las onicomicosis según seis variaciones clínicas, sea por la localización de la infección o por el hongo que la causa: 1) onicomicosis subungueal distal lateral, 2) onicomicosis blanca proximal subungueal, 3) onicomicosis blanca superficial, 4) onicomicosis distrófica total, 5) endonix (invasión entre las capas de la lámina ungueal) y 6) perionixis, o inflamación de tejidos periungueales.^{2,7,17,20}

Dentro de estas variedades, las más frecuentes en nuestro medio son la onicomicosis subungueal distal y lateral, y la onicomicosis distrófica total, ambas a menudo causadas por *T. rubrum*, al igual que la onicomicosis blanca subungueal proximal.^{6,13}

La onicomicosis subungueal distal lateral se caracteriza por la invasión ungueal a partir del hiponiquio, la capa epidérmica donde se asienta el borde libre de la uña, con migración de los microorganismos en sentido proximal. Existe inflamación leve, hiperqueratosis (aumento del grosor de la capa córnea) subungueal y paraqueratosis (alteración de la queratinización en la que persisten los núcleos celulares en el estrato córneo), con dos consecuencias: engrosamiento de la lámina ungueal y onicolisis, o despegamiento distal de la uña. El espacio subungueal funciona como reservorio de los hongos y bacterias que se agregan y sobreinfectan, lo cual confiere a la lámina ungueal un color amarillo a café negruzco.

En la modalidad distrófica total hay invasión de la lúnula, las uñas se rompen y desmoronan, tienen aspecto de madera carcomida y dejan un lecho engrosado que también puede quedar destruido. Puede ser secundaria a cualquiera de las demás variedades en su fase terminal.^{2,6}

Respecto de la onicomicosis blanca proximal subungueal, se trata de un subtipo menos frecuente, cuando

los microorganismos invaden la uña a partir del pliegue proximal y migran distalmente. El patrón de crecimiento parte de la lúnula, y conforme avanza abarca todas las capas del plato ungueal. La presentación clínica incluye leuconiquia, hiperqueratosis subungueal, onicomadesis (despegamiento de la uña en el nivel de la lúnula) y destrucción proximal de la lámina ungueal.

A pesar de ser una variante clínica relativamente infrecuente en la población general, suele presentarse en pacientes con sida, y se considera un marcador temprano de la infección por VIH.⁶ Se formuló la hipótesis de que procede de un probable foco infeccioso a distancia que alcanza el aparato ungueal por vía hematógena o linfática, y que es consecuencia, al igual que en pacientes inmunocompetentes, sobre todo de dermatofitos.²¹

La gravedad de los síntomas ungueales varía según el grado de afectación de las estructuras. El padecimiento puede ser asintomático o sólo causar alteraciones estéticas, pero en casos más graves, causa incomodidad e interfiere con la capacidad para realizar tareas manuales o la deambulación.²² Por su implicación en los complejos modelos de la sociedad, las uñas se consideran importantes componentes de la imagen personal que se proyecta hacia los demás.²³ Así, las onicomicosis llegan a tener significativos efectos adversos en los pacientes en los aspectos emocional, social y ocupacional, además de traducirse en altos costos para los servicios de salud.

Por otra parte, las onicomicosis en pacientes inmunocomprometidos, como los infectados con VIH, constituyen un fuerte problema de salud no sólo por la dificultad de tratamiento, sino por su mayor probabilidad de diseminar la infección, pues son más propensos a ello.⁶

Métodos de diagnóstico

Los síntomas clínicos se confirman con la identificación de los hongos como agentes productores de infecciones^{17,20} mediante varias técnicas diagnósticas, como microscopía directa con hidróxido de potasio (KOH), combinación de KOH más dimetilsulfóxido (DMSO), combinación de KOH con DMSO y negro de clorazol, estudio histomológico con ácido peryódico de Schiff (PAS) y cultivos en agar de *sabouraud* y agar micobiótico o DTM (*Dermatophyte test médium*).⁹

Asimismo, se han desarrollado otras técnicas de biología molecular que contribuyeron al mayor conocimiento de la taxonomía y relaciones filogenéticas de los dermatofitos, pues muchas veces son difíciles de identificar por su pleomorfismo.² Se han diseñado varios sistemas para la detección de ADN fúngico, entre los cuales destacan el análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de

restricción, PCR, PCR arbitrario, análisis polimórfico de ADN amplificado aleatoriamente o secuencias de transcritos internos espaciadores (ITS).¹⁶

El examen directo con microscopía óptica consiste en la observación de las escamas obtenidas por raspado en portaobjetos con KOH a 10 o 20%, y permite la confirmación inmediata de los elementos fúngicos en la muestra.^{1,17,20,24} Tiene buena sensibilidad y es más específico que el cultivo, con 76.5% de sensibilidad y 86.1% de valor predictivo negativo para el diagnóstico de onicomicosis, en comparación con 53.2% de sensibilidad y 69% de valor predictivo negativo con el cultivo. No obstante, requiere destreza para descartar artefactos del laboratorio y genera falsos negativos en 5 a 15% de casos;^{8,17,20,24} además, no determinan la especie del agente causal (fotografía 1).



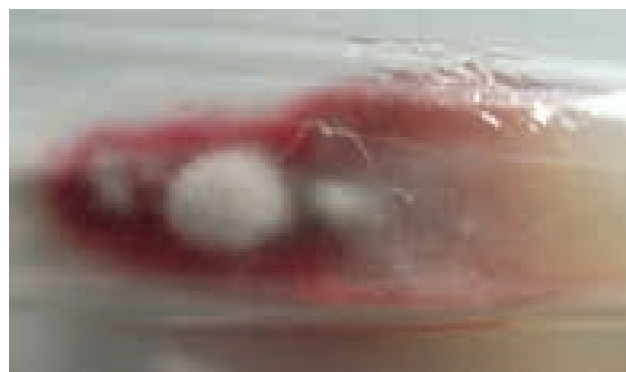
Fotografía 1. Examen directo con KOH, 40x.

La identificación de agentes patógenos mediante cultivos implica la inoculación de tejido ungual pulverizado en medios especiales con nitrógeno orgánico, agua, glucosa y peptona. Los hongos se identifican con base en la velocidad de crecimiento en una temperatura de 26° a 30° C durante cuatro semanas, al contrario de las levaduras y otros hongos.^{1,8,24} Con el empleo de cultivos, la tasa de resultados falsos negativos se encuentra en 30 a 60%.⁸ Asimismo, esta técnica requiere personal capacitado y experimentado en el manejo de especímenes micológicos, sobre todo por los errores en la interpretación de los organismos cultivados (fotografías 2, 3 y 4).¹⁵

La sensibilidad de la microscopía directa mejora mediante tinciones especiales, como tinta Parker azul o fluorocromos específicos, en microscopio de fluorescencia. No obstante, se producen falsos negativos según los métodos de recolección y procesamiento de las muestras, pues, en



Fotografía 2. Cultivo de *Trichophyton rubrum*.



Fotografía 3. Pigmento producido por *T. rubrum*.



Fotografía 4. *T. rubrum*, presencia de microconidios.

el caso de los cultivos, la contaminación con bacterias u hongos no dermatofitos puede evitar el crecimiento de los verdaderos agentes patógenos, o enmascarar su presencia en el caso de sobrecrecimiento de otras especies. En cuanto a la microscopía directa, puede haber artefactos que confundan al observador, como fibras, burbujas de aire, fragmentos de queratina y otros materiales que mimetizan las estructuras fúngicas.²⁵

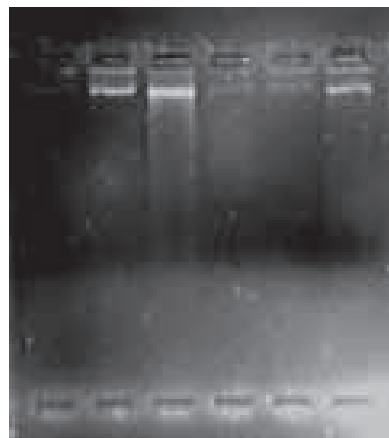
La microscopía confocal es una técnica muy discriminatoria que facilita la exploración del tejido vivo. La luz reflejada sirve para penetrar en distintas profundidades de la uña. La detección de estructuras fúngicas depende de la penetración de la luz y la refractariedad de las estructuras observadas.²⁴ Sin embargo, esta técnica tiene capacidad limitada para distinguir hifas de dermatofitos de estructuras fúngicas, de otros microorganismos no dermatofíticos o pseudohifas de *Candida* sp, además de que es muy costosa.⁷

Otro método diagnóstico en micología es la histomicrología, la cual consiste en la observación de cortes histológicos de uña teñidos con PAS para documentar la presencia de hongos con altos niveles de sensibilidad y especificidad;^{1,25} no obstante, ante personal no capacitado puede obtenerse resultados falsos positivos debido a la presencia de partículas de almidón, fragmentos de fibras textiles, plasma o células paraqueratinizadas;²⁵ además, es una técnica difícil y laboriosa, consume mucho tiempo^{25,26} y requiere de experiencia, pues no permite identificar especies de hongos ni diferenciar entre hifas vivas o muertas.²⁷ Sin embargo, se considera el estándar de oro que demuestra de manera absoluta el diagnóstico de onicomicosis.^{21,28}

Para el análisis directo con microscopía de fluorescencia (lámpara de mercurio, objetivos específicos y filtros para trabajar con longitudes de onda de 390 a 420 nm) se utiliza blanco de calcoflúor, que emite fluorescencia al activarse con luz ultravioleta. Los hongos se manifiestan cuando las partículas de calcoflúor se unen a polisacáridos, como celulosa y quitina, presentes en las paredes celulares.^{2,29} A pesar de ello, esta técnica no basta para la identificación, porque algunos organismos presentan características morfológicas muy parecidas.³⁰

El *dermatophyte test medium* (DTM) es un medio de cultivo con nutrientes que promueven el crecimiento de dermatofitos y de inhibidores bacterianos y fúngicos, como cicloheximida y gentamicina, además de contener rojo fenol, el cual funciona como marcador de pH, pues los dermatofitos se desarrollan mejor en medios alcalinos; pueden verse de 10 a 14 días después de la siembra con el cambio de amarillo a rojo.^{24,31,32}

No obstante, puede tardar varias semanas o resultar negativo.²⁴ Sus limitantes son un número relativamente frecuente de falsos negativos causados por mala técnica concerniente a periodos de incubación, tamaño y características de los cultivos, así como concentración insuficiente de antibióticos inhibitorios para permitir el desarrollo de levaduras no dermatofíticas que generen confusión.³¹



Fotografía 5. Gel de agarosa para determinar ADN.

La técnica de inmunohistoquímica consiste en exponer muestras de tejido ungueal a anticuerpos marcados y específicos para los agentes patógenos causales. Se emplean anticuerpos monoclonales anti-*Trichophyton* spp. (para identificar dermatofitos), anti-*Candida* spp. (para identificar levaduras) y anti-aspergiláceas. La visualización se realiza mediante inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa, lo que complica el método. Además, cuenta con un número muy limitado de anticuerpos monoclonales contra los que se “enfrenta” a la muestra, por lo tanto, no permite identificar todos los patógenos potenciales.^{9,25}

La técnica de citometría de flujo, se basa en la identificación de variaciones moleculares entre las diferentes especies fúngicas. Las muestras de tejido queratinizado se digieren y después se recolectan las células fúngicas, que se analizan con el fin de detectar ADN y proteínas para ordenarlas de acuerdo con el tamaño celular. Con los datos y el software de análisis se estudian varias especies de hongos; sin embargo, es una técnica muy complicada y costosa, que además requiere personal especializado y con experiencia en el manejo del software.⁹

Las dificultades en el diagnóstico de las onicomicosis resultan de la diversidad de agentes etiológicos en la naturaleza,⁹ por lo que las técnicas moleculares permiten estudiar cualidades estables e inmodificables por el ambiente, como el ADN y el ARN molecular (fotografía 5).² Por ejemplo, a menudo varía la expresión de caracteres fenotípicos (formación de conidios o producción de pigmento) de las muestras de tejido que se cultivan, en cuyo caso puede confundirse *T. rubrum* con *T. mentagrophytes* var. *inetrdigitale*. Además, cerca de 30% de los cultivos procesados a partir de muestras procedentes de examen directo no se desarrolla, lo que hace que, en comparación, los métodos basados en aislamientos genotípicos sean más estables.¹⁶

La importancia de esto se observa sobre todo cuando nos encontramos ante especies de dermatofitos que mimetizan en los cultivos de *T. rubrum*, como *T. raubitschekii*, *T. kanei*, *T. krajdeni*, *T. fischeri* y en ocasiones *T. mentagrophytes*, el cual es capaz de producir un pigmento rojizo o confundirse con la variante amarilla de *T. rubrum*.³³

En la última década se registraron grandes avances en los métodos moleculares para la identificación rápida y sensible de dermatofitos. Desde fechas recientes se aplican técnicas de biología molecular como herramientas diagnósticas: la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, o una combinación de PCR con secuenciación de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción,⁸ la cual se realiza en muestras de biopsia o de queratina obtenidas por raspado, aplicables cuando las lesiones son muy sugerentes o cuando la microscopía directa y el cultivo resultan negativos;³⁴ por otro lado, se registra una alta tasa de resultados falsos negativos con los estudios de laboratorio rutinarios.³⁵

Menotti y colaboradores reportaron una excelente sensibilidad y especificidad del PCR con ensayo de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción, para el diagnóstico rápido de especies de dermatofitos y *Scytalidium spp.*⁸

Discusión

Durante el proceso de diagnóstico, una exploración física cuidadosa es el primero y más importante de los pasos. Sin embargo, la observación de una uña clínicamente alterada en la que no se confirma la presencia del dermatofito no basta para establecer el diagnóstico de onicomicosis,³⁶ pues hay otras entidades que clínicamente se pueden confundir, como psoriasis, onicogriposis, distrofia traumática, onicólisis crónica, alopecia areata, paroniquia crónica, hemorragia, distrofia canalicular, carcinoma espinocelular de aparato ungueal o liquen plano.^{37,9} Por tanto, es necesario el diagnóstico de laboratorio.³

No obstante, aún así es difícil demostrar la presencia de hongos, pues tanto el examen directo como el cultivo pueden resultar negativos,¹ además de conllevar errores en la interpretación de los organismos cultivados,¹⁵ por lo cual los métodos basados en aislamientos genotípicos parecen más estables.¹⁶

La técnica de amplificación por PCR se basa en la ampliación de un segmento de ADN. En el caso de dermatofitos se realiza a partir de muestras obtenidas de cultivos, y, en el caso de raspado ungueal, a partir de especímenes obtenidos directamente del paciente.

Los métodos de diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proveen una detección sensible

y específica de secuencias de ADN. La subsiguiente digestión por enzimas de restricción permite identificar especies fúngicas y sus subtipos. Esto sirve para diferenciar dermatofitos, levaduras no dermatofíticas y otros hongos por medio de cebadores (*primers*) amplificadores especiales, pues permiten distinguir un aislamiento de otro.^{2,7}

Algunos estudios moleculares de especies complejas han encontrado que sólo las regiones genéticas con más alta variabilidad pueden situarse para determinar la filogenia de las especies.

Con el propósito de identificar dermatofitoides semejantes a *T. rubrum* (como *T. mentagrophytes* y *T. krajdenii*) y distinguirlos de éste último se diseñaron sondas de ADN para el diagnóstico diferencial.

Para ello se realizó en Ontario, Canadá, una secuenciación de ADN_r en la que se incluyeron 15 especies de dermatofitos y de hongos no dermatofitos, con lo que se obtuvo una secuencia total de 866 posiciones de nucleótidos.³³ Sólo se detectaron señales de hibridación para *T. rubrum*, sin observarse para ninguno de los demás especímenes ni presentarse reacciones cruzadas con otras especies, ni con ADN humano.¹⁶

En la bibliografía se documenta que esta técnica, además de proveer resultados rápidos para la identificación de dermatofitos, es capaz de diferenciar las variedades de *T. mentagrophytes* cuando se utilizan oligonucleótidos repetitivos como cebadores.³⁷

Algunas técnicas se basan en el estudio de las regiones ribosomales de ADN, que consiste en secuencias de transcriptores internos espaciadores (ITS) 1 y 2, y su subunidad intermediaria 5.8S, la cual exhibe una variabilidad de ADN capaz de determinar la filogenia de las especies.³³

Estudios realizados en Inglaterra y Alemania lograron elaborar una sonda génica específica para *T. rubrum* a partir de amplificaciones de las regiones ITS1 e ITS2. Estos fragmentos amplificados cuentan con longitudes de 0.7 a 0.8 kb. Esta sonda deriva de la región ITS2 del DNA ribosomal y se conoce como TR20S, la cual se probó mediante hibridación *dot blot* con productos amplificados de ITS para 13 diferentes microorganismos eucariotas capaces de causar infecciones cutáneas y ungueales, 45 variedades de hongos de la familia Arthrodermataceae y 50 aislados de *T. rubrum*.¹⁶

También se comparó la eficacia de esta técnica con los procedimientos tradicionales de laboratorio para identificar dermatofitos, los cuales consumen mucho tiempo y generan falsos resultados con relativa frecuencia.

En Ontario, Canadá, se comparó la eficacia de la PCR con el cultivo tradicional en agar de *sabouraud* con ci-

cloheximida: se aplicaron ambas técnicas a 62 muestras de pacientes con onicomicosis (de los cuales 15 se encontraban en tratamiento antimicótico), y se observó que, de las 62 muestras obtenidas, 48 (77.4%) fueron positivas con el examen directo con KOH, pero el cultivo para *T. rubrum* resultó positivo sólo en 14 de 62 muestras (22.6%); asimismo, se encontró positividad en 37 de 62 muestras (59.7%) tras realizar el análisis con PCR con genes de actina, y en 28 de 62 muestras (45.2%) con PCR por región ITS1, con una *p* menor que 0.001 y una menor de 0.008, respectivamente. El ensayo con ambas técnicas de PCR combinadas generó resultados positivos en 43 de 62 muestras (69.4%). Estos resultados sugieren que la reacción en cadena de la polimerasa es una técnica más sensible, precisa y rápida que el cultivo estándar, y que además es capaz de detectar ADN de dermatofitos aún en pacientes con tratamiento antifúngico.³⁸ Se reportó lo anterior en un estudio realizado en Noruega, donde se encontró que de 346 muestras, 49 cultivos fueron positivos, mientras que 67 muestras resultaron positivas para la secuenciación por PCR 18S.³⁹

En un análisis multicéntrico realizado en Francia se analizaron 546 muestras de tejido ungueal obtenidas por raspado, 236 muestras tomadas de la lámina proximal, 75 del borde libre ungueal, 127 muestras no etiquetadas en cuanto al sitio de origen y 108 controles sanos. Se encontró que el cultivo fue positivo en 106 de las 236 muestras de la lámina proximal, mientras que el examen directo resultó positivo en 151, de las cuales en las 45 muestras por las que esta última técnica superó al cultivo se desarrollaron después hongos no dermatofitos. De las 106 muestras en las que se desarrolló el cultivo, la técnica de PCR fue positiva en 83 de 106 (78.3%). Por otro lado, el PCR se reportó positivo en 103 de las 151 muestras en las que el examen directo mostró organismos fúngicos.

En cuanto a las 75 muestras tomadas del borde libre de la uña, se reportó el cultivo positivo en 53 de ellas, y en 65 se encontró positivo el examen directo. De las 53 muestras con desarrollo en el cultivo, en 49 de ellas (92.5%) fue positiva la PCR. De las 65 muestras en las que el examen directo resultó positivo, el PCR lo fue en 55 de ellas. De las 127 muestras sin etiquetar, se reportó el cultivo, examen directo y PCR positivos en 34 de éstas. En las muestras de controles sin manifestaciones clínicas de onicomicosis se encontró positiva la PCR en cuatro de ellas, con exámenes directos y cultivos negativos en su totalidad.

Este estudio concluye que la PCR tiene una sensibilidad de 78.3 a 83.9%, y especificidad de 76.9 a 88.2%, para muestras tomadas de lecho proximal. En cuanto a muestras tomadas de borde libre, tuvo una sensibilidad de 92 a 100%, y especificidad de 73 a 100%.⁸

El estudio de Uchida (entre otros) para comparar los métodos de diagnóstico tradicionales con PCR a partir de 126 muestras de escamas obtenidas de lesiones en piel lampiña y 80 muestras obtenidas de raspado ungueal, encontró una tasa de 67 y 33% de resultados positivos para ambas muestras, respectivamente, mientras que con PCR se obtuvo de 95 a 99% de resultados positivos, por lo que se concluyó que este último resulta mucho más ventajoso para detectar e identificar dermatofitos.⁴⁰

A pesar de que es difícil comprobar la eficacia de un nuevo método diagnóstico, los resultados obtenidos comparados con el cultivo, muestran que la PCR es útil como herramienta diagnóstica para obtener confirmación rápida en la práctica clínica,⁸ pues hace poco se determinó una frecuencia de hasta 20% de onicomicosis causadas por hongos no dermatofitos, los cuales muestran una respuesta deficiente o nula a las terapéuticas sistémicas tradicionales y requieren consideraciones especiales para su manejo,⁴¹ por lo que la obtención de un resultado positivo en un estudio paraclínico para confirmar la presencia de dermatofitos antes de iniciar tratamiento oral con antifúngicos ha mostrado una mejor rentabilidad.¹⁴ Lo anterior demostró, por otra parte, que la principal causa de fallas terapéuticas es el diagnóstico incorrecto.¹⁵

Esto cobra importancia por las crecientes cantidades de antimicóticos nuevos que poseen espectros diferentes de actividad y de algunos hongos, en especial las levaduras patógenas y hongos no dermatofíticos, que son menos sensibles o no responden a la terapia con antimicóticos orales. Por tanto, es necesario evitar una terapéutica costosa que resulte ineficaz, con recurrencia de la enfermedad y efectos tóxicos potenciales por el tratamiento farmacológico.^{16,25}

REFERENCIAS

1. Clayton YM. "Superficial fungal infections". En Harper J, Oranje A, Prose N (eds.). *Textbook of pediatric dermatology*, Londres, Blackwell Science, 2000, 447-472.
2. Arenas R. *Micología médica ilustrada*, 3a ed, México, McGraw-Hill, 2008, 61-94.
3. Bologna J, Jorizzo J, Rapini R. *Dermatología*, 1a ed, Barcelona, Elsevier, 2005, 1171-1186.
4. Arenas R. "Dermatofitosis en México". *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 63-67.
5. Saúl A. *Lecciones de Dermatología*, 14a ed, México, Méndez, 2006, 266-282.
6. Elewski BE. "Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management". *Clin Microbiol Rev* 2008; 11: 415-429.
7. Aditya K, Gupta A, Ricci MJ. "Diagnosing onychomycosis". *Dermatol Clin* 2006; 24: 365-369.

8. Savin C, Huck S, Rolland C, Benderdouche M, Faure O, Noacco G, Menotti J, Candolfi E, Pelloux H, Grillot R, Coupe S, Derouin F. "Multicenter evaluation of a commercial PCR- enzyme- linked immunosorbent assay diagnostic kit (onychodiag) for diagnosis of dermatophytic onychomycosis". *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1205-1210.
9. Finch J, Warshaw E. "Toenail onychomycosis: Current and future treatment options". *Dermatol Therapy* 2007; 20: 31-46.
10. Balderrama CV, Mayorga JR, Barba AB, Tarango VM. "Frecuencia de onicomycosis en la quinta uña distrófica del pie". *Med Cutan Iber Lat Am* 2007; 35: 280-284.
11. Arenas R. "Las onicomycosis. Aspectos clínicos, epidemiológicos, micológicos y terapéuticos". *Gac Med Mex* 1990; 126: 84-91.
12. Villanueva-Reyes J, Arenas R. "Onicomycosis en niños. Estudio en una población mexicana". *Dermatol Pediatr Lat* 2007; 4(3): 197-203.
13. Vásquez del Mercado E, Arenas R. "Onicomycosis en niños. Estudio retrospectivo de 233 casos mexicanos". *Gac Med Mex* 2008; 144: 7-10.
14. Lilly KK, Koshnick RL, Grill JP, Khalil ZM, Nelson DB, Warshaw EW. "Cost- effectiveness of diagnostic test for toenail onychomycosis: A repeated measure, single- blinded, cross sectional evaluation of 7 diagnostic test". *J Am Acad Dermatol* 2006; 55: 620-626.
15. Robert DT, Taylor WD, Boyle J. "Guidelines for treatment of onychomycosis". *Br J Dermatol* 2003; 148: 402-410.
16. Fari EM, Tietz HJ, Presber W, Sterry W, Graser Y. "Development of an oligonucleotide probe specific for *Trichophyton rubrum*". *Br J Dermatol* 1999; 141: 240-245.
17. Faergemann J, Baran A. "Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis". *Br J Dermatol* 2003; 149(supl. 65): 1-4.
18. Gitte KL, Merete H, Svegaard E. "The prevalence of onychomycosis in patients with psoriasis and other skin diseases". *Acta Derm Venereol* 2003; 83: 206-209.
19. Muñoz HL, Leyva J, Arenas R. "Onicomycosis. Su frecuencia en pacientes con psoriasis". *Dermatología Rev Mex* 1999; 43(2): 41-45.
20. Andrews DM, Burns MT. "Common tinea infections in children". *Am Fam Phys* 2008; 77: 1415-1420.
21. Moreno-Coutiño G, Toussaint-Caire S, Arenas R. "Clinical, mycological and histological aspects of white onychomycosis". *Mycoses* 2009; 53: 1-4.
22. Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S. "Onychomycosis caused by nondermatophyte molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases". *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 217-224.
23. Dahdah M, Scher R. "Nail diseases related to nail cosmetics". *Dermatol Clin* 2006; 24: 233-239.
24. Carrillo-Muñoz JA. "Medios de cultivo en micología médica y veterinaria". *Cuadernos de Microbiología* 1995; 3: 2-3.
25. Pierard GE, Quatresooz P, Arrese JE. "Spotlight on nail histomycology". *Dermatol Clin* 2006; 24: 371-374.
26. Chang A, Wharton J, Tam S, Kovich O, Kamino H. "A modified approach to the histologic diagnosis of onychomycosis". *J Am Acad Dermatol* 2007; 57: 849-853.
27. Société Française de Dermatologie. "Modalités de diagnostic et prise en charge". *Ann Dermatol Venereol* 2007; 134-S: 7-16.
28. Saez de Ocariz MM, Arenas R, Ranero Juárez GA, Farrera EF, Monroy Ramos E. "Frequency of toenail onychomycosis in patients with cutaneous manifestations of chronic venous insufficiency". *Int J Dermatol* 2001; 40: 18-25.
29. Torres E, Arenas R, Atoche C. "Infecciones causadas por el género *Malassezia*". *Med Cutan Iber Lat Am* 2008; 36: 265-284.
30. Ramos L, Mellado S, Ramadán S, Bulacio L, López C. "Empleo de blanco de calcoflúor para el diagnóstico de las especies de *Malassezia* por microscopía electrónica". *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 4-8.
31. Mahoney JM, Bennet J, Olsen B. "The diagnosis of onychomycosis". *Dermatol Clin* 2003; 21: 463-467.
32. Weinberg J, Koestenblatt E, Tutrone W, Tishler H, Najarian L. "Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis". *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 193-197.
33. Summerbell RC, Haughland RA, Li A, Gupta AK. "rRNA internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual antropophilic dermatophytes related to *Trichophyton rubrum*". *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4005-4011.
34. Durant JF, Fonteyne PA, Richez P, Marot L, Belkhir L, Tennstedt D, Gala JL. "Real- time PCR sequencing for detection and identification of *Trichophyton rubrum* as cause of culture negative of chronic granulomatous dermatophytosis". *Med Mycol* 2008; 16: 1-7.
35. Gupta AK, Zaman M, Singh J. "Diagnosis of *Trichophyton rubrum* from onychomycotic nail samples using polymerase chain reaction and calcofluor white microscopy". *J Am Podiatr Med Assoc* 2008; 98: 224-228.
36. Scher RK, Tavakol A, Sigurgeirsson B, Hay RJ, Joseph WS, Tosti A, Fleckman P, Ghannoum M, Armstrong DG, Markinson BC, Elewski BE. "Onychomycosis: Diagnosis and definition of cure". *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 939-944.
37. Shehata AS, Mukherjee PK, Aboulatta HN, el-Akhras AI, Abbadi SH, Ghannoum MA. "Single- step PCR using (GACA) 4 primer: Utility for rapid identification of dermatophyte species and strains". *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2641-2645.
38. Gupta AK, Zaman M, Singh J. "Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double round polymerase chain reaction based assay". *Br J Dermatol* 2007; 157: 698- 703.
39. Walberg M, Mork C, Sandven P, Jorde AT, Bjoras M, Gaustad P. "18s rDNA polymerase chain reaction and sequencing in onychomycosis diagnostics". *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 223-226.
40. Uchida T. "Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples". *J Dermatol* 2009; 36(4): 202-208.
41. Binstock JM. "Molecular biology techniques for identifying dermatophytes and their possible diagnosing onychomycosis in human toenail: A review". *J Am Podiatr Med Assoc* 2007; 97: 134-144.