

# Dermatofitos en onicomycosis de una muestra de la población argentina

## Dermatophytes on Onychomycosis of an Argentinian Population Sample

Adriana Raquel Rinflerch,<sup>1</sup> Viviana Flores,<sup>2</sup> Pablo Francisco Argibay,<sup>3</sup> Ricardo Luis Galimberti<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Licenciada en genética, Doctora en ciencias biológicas, Unidad de Dermatología Experimental, Servicio de Dermatología

<sup>2</sup> Bioquímica y farmacéutica especialista en micología, Unidad de Dermatología Experimental, Servicio de Dermatología

<sup>3</sup> Doctor en medicina, director del ICBME, Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires

<sup>4</sup> Jefe del servicio de dermatología del Hospital Italiano de Buenos Aires, profesor titular en la Universidad de Buenos Aires

Fecha de aceptación: febrero, 2015

### RESUMEN

La onicomycosis afecta a entre 5 y 20% de la población mundial. Puede ser causada por tres tipos de hongos: dermatofitos, levaduras y mohos, de los cuales los más comúnmente encontrados son los dermatofitos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia y sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR) para identificar género y especie de *Trichophyton rubrum* y *T. interdigitale*, y conocer la incidencia de los dermatofitos como causantes de esta afección en una muestra de la población argentina.

Se evaluaron 60 muestras clínicas por microscopía y RT-PCR (a partir del ADN extraído de muestras clínicas). Se detectó la presencia de ADN fúngico en 58 muestras (95%) mediante RT-PCR, mientras que fueron positivos al examen directo por microscopía óptica sólo 41 muestras (68%). De las 58 muestras clínicas positivas por RT-PCR, 53 (91%) fueron identificadas como *T. rubrum* y 5 (9%) como *T. interdigitale*.

La técnica de PCR en tiempo real demuestra ser mucho más sensible que el examen micológico directo y más rápida que el cultivo convencional. Sin embargo, pueden obtenerse falsos positivos ya que esta técnica no evalúa la viabilidad de los dermatofitos, motivo por el cual consideramos que dicha técnica podría ser útil para pacientes sin tratamiento previo.

### ABSTRACT

Onychomycosis affects 5-20% of the world population. It could be caused by three types of fungi: dermatophytes, yeasts, and molds; being the dermatophytes, the most commonly found. The aim of this study was to evaluate the efficacy and sensitivity of real time PCR (RT-PCR) to identify specie and gender *Trichophyton rubrum* and *T. interdigitale*, and the incidence of dermatophytes as causing agent of onychomycosis in a sample of argentinian population.

A total of 60 clinical samples were examined by both microscopic and RT-PCR (using DNA extracted directly from clinical samples). In 58 (95%) of the samples, fungal DNA was detected by RT-PCR, while only 41 (68%) were positive by microscopy. Out of 58 RT-PCR positive clinical samples, 53 (91%) were identified as *T. rubrum* and 5 (9%) as *T. interdigitale*.

The RT-PCR approach is more sensitive to detect dermatophytes in a clinical sample than the microscopic method, and faster than conventional culture. However, false positive results are a concern, since this method cannot evaluate the viability of the fungi. Then, RT-PCR approach may be useful for non-treated patients.

### Introducción

La onicomycosis se define como toda infección causada por hongos que afecta a las uñas (lámina, lecho ungueal o matriz), y se estima que actualmente afecta a entre 5 a 20% de la población mundial, de acuerdo con la localización geográfica del país.<sup>1,9</sup>

Diferentes factores contribuyen a su desarrollo, algunos de ellos ambientales, como la humedad, el calor o

zapatos cerrados, y otros individuales, como la edad, predisposición genética, diabetes, enfermedades inmunológicas o inmunosupresión.

La onicomycosis puede ser causada por tres tipos de hongos: dermatofitos, levaduras y mohos, de los cuales los más comúnmente encontrados son los primeros. Los dermatofitos son hongos queratinofílicos integrados por tres géneros: *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. y *Epidermophyton*

### CORRESPONDENCIA

Dra. Adriana R. Rinflerch ■ [Adriana.rinflerch@hospitalitaliano.org.ar](mailto:Adriana.rinflerch@hospitalitaliano.org.ar)

J.D. Perón 4230, piso 1, CABA, Buenos Aires, Argentina, CP 1199. Teléfono/fax: +54 1149590392

spp. En las uñas, las infecciones más comunes son causadas por *Trichophyton rubrum* y *T. interdigitale*.

El método convencional de diagnóstico de onicomicosis a partir de las muestras clínicas consiste en la observación rápida de estructuras fúngicas mediante microscopía directa, luego del tratamiento con KOH (hidróxido de potasio) al 10-40%. Este método carece de especificidad, por lo que se requiere la confirmación de la especie infectante mediante cultivos en medio selectivos, como Lactimel, Agar glucosado de Sabouraud con y sin cicloheximida y Agar harina de maíz con tween y glucosa, entre otros.<sup>2</sup> Los cultivos tienen la desventaja del tiempo requerido, la baja tasa de crecimiento de los hongos y el riesgo de contaminación de la muestra.

El diagnóstico micológico es esencial para el tratamiento de las onicomicosis, y definir la especie de dermatofito infectante permite indicar un tratamiento correcto.

En los últimos tiempos las técnicas de biología molecular han facilitado los diagnósticos clínicos, y diversos métodos son aplicables para identificar directamente los dermatofitos en las muestras clínicas. Con el propósito de identificar especies distintas, se han utilizado las sutiles diferencias en la secuencia de ADN de genes específicos, como la enzima que sintetiza la quitina de las paredes del hongo, la quitina sintasa I (CHS1).

Considerando los métodos existentes, utilizamos la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real, para identificar las especies de hongos del género *Trichophyton* spp. a partir de muestras clínicas, protocolo publicado en el año 2013 por Bergman y colaboradores.<sup>5</sup>

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia y sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real (RT PCR) para identificar género y especie de *Trichophyton rubrum* y *T. interdigitale*, y comparar con otras publicaciones la incidencia de onicomicosis por dermatofitos en nuestra población.

## Métodos

### Muestras

El total de 60 muestras clínicas de pacientes con sospecha de onicomicosis fueron recibidas para análisis de rutina en el servicio de dermatología del Hospital Italiano de Buenos Aires, durante un mes (mayo de 2014). El único criterio de inclusión en este estudio fue que la cantidad de muestra obtenida brindara material suficiente para ambos estudios, tanto para el examen micológico directo, como para extracción de ADN y posterior análisis por RT PCR. La procedencia de las muestras correspondieron a: uñas de pies en 56 de los casos y cuatro de uñas de las manos. Uno de los pacientes presentaba infección tanto en pies como manos.

Las muestras se tomaron mediante raspado de la lesión con bisturí estéril sobre una placa de vidrio estéril, para su posterior procesamiento tanto en el método directo, por microscopía óptica, como por extracción de ADN.

### Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras clínicas se realizó de acuerdo con la técnica publicada en 2014 por Vuran y colaboradores,<sup>6</sup> a partir de la muestra clínica obtenida.

### PCR en tiempo real

Los oligonucleótidos cebadores o *primers* de pan-dermatofytes, así como *T. rubrum* y *T. interdigitale*, para amplificar la secuencia específica del gen que codifica para quitina sintasa I (CHS1) y el programa para RT PCR, fue de acuerdo con lo publicado por Bergman y colaboradores.<sup>5</sup>

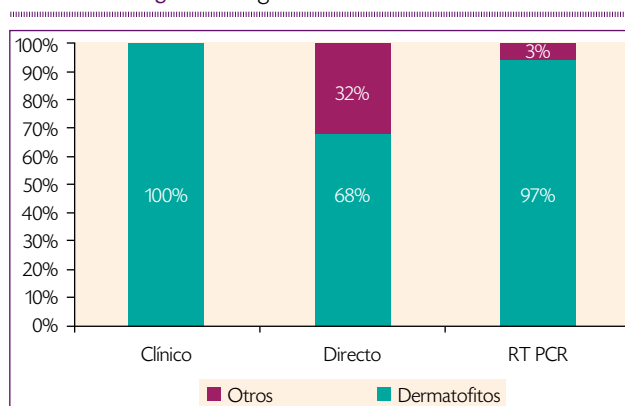
## Resultados

Se recopilaron 60 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis durante mayo de 2014 en el servicio de dermatología del Hospital Italiano de Buenos Aires. En el examen directo en 41 (68%) muestras se observaron filamentos compatibles con dermatofitos. Mientras que por PCR se detectaron ácidos nucleicos fúngicos en 58 (95%) (figura 1). De estas 58 muestras clínicas positivas por PCR, 53 (91%) fueron identificadas como *T. rubrum* y 5 (9%) como *T. interdigitale* (figura 2).

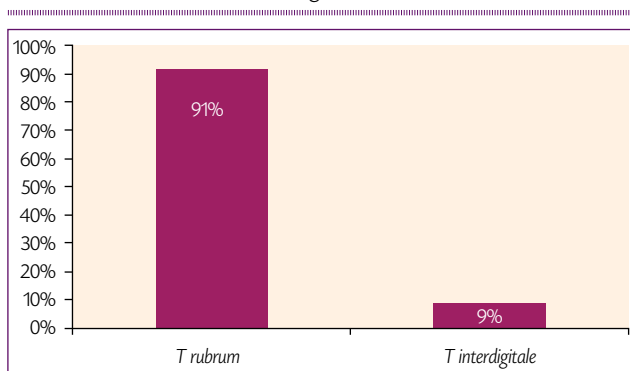
El porcentaje de pacientes clasificados por sexo, infectados por onicomicosis que se presentaron en dicho mes es de 30 (60%) mujeres y 20 (40%) hombres. La edad promedio de las mujeres fue de 63 años (DS = 14,88) y la de los hombres de 51 años (DS = 16,44).

La localización anatómica de la infección, correspondió en 55 (92%) de los casos a las uñas de los pies, tres (5%) a las manos y un caso tanto manos como pies afectados.

Figura 1. Diagnóstico de onicomicosis



**Figura 2.** Determinación mediante RT PCR de muestras clínicas con *Trichopyton spp.*: 58 fueron positivas para dermatofitos, de las cuales 53 fueron *T. rubrum* (91%) y cinco fueron *T. interdigitale* (9%)



## Discusión

Durante muchos años, los métodos convencionales para el diagnóstico de onicomicosis han sido la observación microscópica de filamentos de Eumicetos en las escamas de pacientes y el cultivo en medios selectivos.

El diagnóstico correcto por este método depende de la capacidad del profesional para la toma de muestra y la observación microscópica. La confirmación de la especie infectante se realiza mediante cultivo. Las desventajas del cultivo son el tiempo requerido (a veces hasta cuatro semanas) para obtener el resultado y la menor sensibilidad a la hora de obtener cultivos positivos.<sup>8</sup>

A partir de 1990 se ha intentado mejorar estos inconvenientes con diversas técnicas. La técnica de RT PCR es un efectivo método diagnóstico para detectar el agente causal de la onicomicosis de alta sensibilidad, y que ocupa poco tiempo.<sup>7</sup> Es rápido, reproducible y relativamente fácil de implementar como rutina diagnóstica. Incluso permite identificar la especie de dermatofito patógeno.<sup>5</sup>

En nuestro trabajo encontramos un mayor porcentaje de mujeres que concurren a la consulta para tratamiento de las onicomicosis; aunque consideramos que es muy probable que exista una proporción similar de hombres infectados, sin embargo, éstos son menos proclives a la búsqueda de tratamiento mientras no sientan dolor.

Otro dato a evaluar es la edad promedio, que es mayor en las mujeres con respecto a los hombres. Esto puede deberse a diversos factores, entre ellos el más destacado son las diferencias en hábitos de calzado.

La identificación de especies de *Trichopyton spp.* nos brinda la posibilidad de analizar epidemiológicamente las especies que se encuentran en nuestra población y ob-

tener información que permita, por ejemplo, desarrollar tratamientos más específicos y por lo tanto efectivos.

Por otro lado, las recurrencias de esta infección son un hecho común en la onicomicosis. La identificación de la especie infectante primaria, y la reinfección, nos permitirá determinar si se debe al mismo patógeno o a uno diferente, lo que orientará al profesional respecto a las modificaciones en el tratamiento, ya sea el medicamento y/o el tiempo de tratamiento.

## Conclusión

La implementación del método diagnóstico basado en técnicas de RT PCR es rápida, reproducible y relativamente fácil de establecer como rutina. Sin embargo, es realmente útil para muestras de pacientes sin tratamiento previo, y en caso de reinfección postratamiento, servirá para identificar la especie y determinar si se trata de una falla del tratamiento, o reinfección por la misma especie o por otra u otro patógeno.

## REFERENCIAS

- Ghannoum, M, Hajjeh, R, Scher, R, Konnikov, N, Gupta, A, Summerbell, R, Sullivan, S, Daniel, R, Krusinski, P, Fleckman, P, Rich, P, Odom, R, Aly, R, Pariser, D, Zaia, M, Rebell, G, Leshner, J, Gerlach, B, Ponce-de-Leon, G, Ghannoum, A, Warner, J, Isham, N, Elewski, B, "A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns", *J Am Acad Dermatol*, 2000, 43 (4): 641-6488.
- Cuenca Estrella, M, Gadea Gironés, I, Mazuelos, E, Pernán García, J, Pontón, J, Rodríguez Tudela, J, "Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Procedimientos en microbiología clínica", recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2006.
- Jackson, C, Barton, R, Kelly, S, Evan, G, "Strain Identification of *Trichopyton rubrum* by Specific Amplification of Subrepeat Elements in the Ribosomal DNA Nontranscribed Spacer", *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 4527-4534.
- Paugama, A, L'Ollivier, C, Viguié, C, Anaya, L, Maryb, C, de Ponfily, G, Ranque, S, "Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis", *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 95: 218-222.
- Bergman, A, Heimer, D, Kondori, N, Enroth, H, "Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR", *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19: 205-211.
- Vuran, E, Karaarslan, A, Karasartova, D, Turegun, B, Sahin, F, "Identification of Malassezia Species from Pityriasis Versicolor Lesions with a New Multiplex PCR Method", *Mycopathologia*, 2014, 177: 41-49.
- Jensen, R.H, Arendrup, M.C, "Molecular diagnosis of dermatophyte infections", *Curr. Opin. Infect. Dis*, 2012, 25: 126-134.
- Robert, R, Pihet, M, "Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis", *Mycopathologia*, 2008, 166: 295-306.
- Relloso, S, Arechavala, A, Guelfand, L, Maldonado, I, Walker, L, Agorio, I, Reyes, S, Giusiano, G, Rojas, F, Flores, V, Capece, P, Posse, P, Nicola, F, Tutzer, S, Bianchi, M, "Onicomicosis, estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico", *Rev Iberoam Micol*, 2012, 29 (03): 157-163.