

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO ALTERNATIVAS EN DERMATOMICOSIS

Dra. M^a José Iglesias Sánchez*, Ana M^a Pérez Pico, José Román Muñoz del Rey, Dra. Raquel Mayordomo Acevedo¹.

1. Titulación de Podología, Centro Universitario de Plasencia, Universidad de Extremadura.

CORRESPONDENCIA

Centro Universitario de Plasencia
Grado de Podología
Avda Virgen del Puerto 2
10600 PLASENCIA (CÁCERES)
maiglesiass@unex.es
rmayordo@unex.es

RESUMEN

La prevalencia de las micosis en general, se ha visto incrementada en las últimas décadas al mismo tiempo que aumentaba el número de personas con inmunodeficiencias, trasplantados, tratados con corticoides o antineoplásicos. La gravedad de las infecciones fúngicas invasivas ha supuesto un reto para los profesionales de la salud a la hora de mejorar el diagnóstico para abordar los tratamientos con mayor prontitud y eficacia.

El avance de la biología molecular en los últimos años ha aportado nuevas soluciones para este reto.

En el presente trabajo revisamos estas nuevas técnicas comparándolas con los métodos tradicionales, que siguen siendo la referencia necesaria en cuanto a sensibilidad y especificidad.

Estas nuevas técnicas empleadas ahora para el diagnóstico de infecciones graves, irán incorporándose a la práctica de la dermatología y la podología, ya que, aunque las dermatomicosis son enfermedades que no requieren un diagnóstico urgente, están demandando una "actualización", debido a que constituyen un grupo de patologías muy frecuentes en la práctica clínica (dermatológica y podológica).

El laboratorio de diagnóstico clínico está en un proceso de cambio fundamental, con el desarrollo de técnicas que proveen una confirmación más exacta de la presencia de infección.

Analizaremos, en primer lugar, las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de dermatofitos y posteriormente aportamos datos so-

bre métodos colorimétricos que nos permiten distinguir entre distintas subespecies de Cándidas. A pesar de no ser técnicas ampliamente utilizadas suponen en general una mejora en la especificidad, eficacia y tiempo de diagnóstico que es importante tener en cuenta a la hora de elegir un tratamiento largo y costoso en la mayoría de los casos.

PALABRAS CLAVE

Dermatomicosis, Diagnóstico, Nuevas técnicas, PCR, métodos colorimétricos.

ABSTRACT

Mycosis prevalence has been increasing in the last decades, because the number of patients with immunodeficiencies, or with treatments like corticosteroids or cytotoxic drugs has been growing too.

Diagnostic can be critically important in the management of fungal infections in high-risk patients. The conventional culture methods are time-consuming showing a low specificity.

Molecular Biology Methods have seen significant advances in the last years and have been applied to Medical practice in others pathologies.

This work describes the new techniques in Mycosis detection, comparing it with the traditional culture methods.

Human pathogenic dermatophytes are moulds that infect human skin, nails and hair. Onychomycosis, or fungal infection of nails, is a very common pathology in clinic practicing, and

the importance of that mycosis has increased in the latest years.

These changes provide a challenge to the clinical dermatology, because laboratory diagnosis is in a process of major change, with the rapid development of new techniques that rely on the application of new scientific skills that provide more accurate and faster confirmation of the presence of infection.

In this review we analyze first molecular te-

chniques applied to the diagnosis of dermatophytes and then provide data on colorimetric methods that allow us to distinguish between different subspecies from candida.

KEY WORDS

Dermatomycosis, Diagnosis, New Alternative Techniques, PCR, colorimetric cultures.

INTRODUCCIÓN

Las dermatomicosis son infecciones superficiales causadas por hongos, que comprenden un grupo de microorganismos relacionados que pertenecen a diferentes géneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, entre los hongos dermatofitos y levaduras del género *Candida*. Cada uno de los generos mencionados incluye a su vez varias especies. Los hongos dermatofitos son organismos queratinofílicos e infectan tejidos superficiales queratinizados (piel, pelo y uñas) de humanos y animales causando micosis cutáneas llamadas también dermatomicosis¹. Las candidas, sin embargo son organismos comensales que resultan infecciosos en determinados casos como por ejemplo en individuos con diabetes mellitus que presentan lesiones mucocutáneas localizadas.

La prevalencia de las dermatomicosis en países europeos varía entre un 3 y un 22%, pero además, se ha producido un incremento reciente a nivel global que se atribuye al incremento de los estados inmunodeprimidos tales como el SIDA, diabetes mellitus, trasplante de órganos y el uso de corticoides y anti-neoplásicos².

La necesidad de un diagnóstico rápido en las infecciones fúngicas invasivas ha forzado la aparición de técnicas de diagnóstico alternativas al cultivo, debido a la gravedad de estas patologías y la urgencia de implantar un tratamiento adecuado.

El desarrollo de la biología molecular y la accesibilidad de las bases de datos de secuencias génicas, han permitido, en general, la mejora en la sensibilidad y especificidad de muchos métodos de diagnóstico en clínica, aunque en el campo de las micosis, esta aplicación es sólo incipiente^{3, 4, 5, 6}.

El diagnóstico y tratamiento de las infecciones por hongos constituyen un problema de importancia creciente debido a la frecuencia y gravedad de las infecciones fúngicas diseminadas en pacientes inmunocomprometidos.

Los signos y síntomas no son específicos, es difícil distinguir entre colonización y enfermedad invasiva (o diseminada), y los cultivos de sangre son a menudo negativos. Esta situación conduce a la aplicación de una terapia empírica con un alto riesgo para el paciente.

Los métodos de cultivo de hongos tradicionales son particularmente lentos y presentan una baja sensibilidad. Por ello, se están desarrollando métodos basados en la detección de antígenos y anticuerpos,

compuestos metabólicos y secuencias génicas específicas para mejorar el diagnóstico y tratamiento^{6,7,8}.

Los principales hongos patógenos causantes de estas infecciones sistémicas o diseminadas son: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides Brasiliensis*, *Coccidioides immitis*. Además existen hongos oportunistas que en determinadas situaciones pueden originar *Candidosis*, *Aspergilosis* y *Criptococosis*⁹.

Las pruebas serológicas para hongos son sencillas y rápidas, aunque su principal inconveniente son los falsos negativos en caso de inmunodepresión por falta de anticuerpos, y falsos positivos por reactividad cruzada en caso de detección de antígenos.

Clasificamos las técnicas diagnósticas en varios apartados:

- a) Detección de Antígeno
- b) Detección de Anticuerpos
- c) Detección de metabolitos y componentes estructurales no antigénicos

Existen métodos comercialmente disponibles que detectan Antígenos, como polisacáridos capsulares o componentes de la pared celular y que son útiles en aspergilosis, criptococosis, histoplasmosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis y penicilliosis marneffeii.

En aspergilosis, la detección del antígeno galactomanano en sangre es rutinaria en algunos centros europeos con metodología EIA (Enzima Inmunoensayo) que presenta mayor sensibilidad que la aglutinación.

Los tests serológicos para detectar anticuerpos de histoplasmosis, candidiasis y coccidiomicosis¹⁰ también son útiles aunque su sensibilidad puede disminuir en caso de inmunosupresión¹¹, siendo nula la respuesta humoral en criptococosis¹².

En los últimos años se han obtenidos altos índices de sensibilidad y especificidad utilizando estos métodos para detectar anticuerpos contra *Candida*^{8,9,13}.

La detección de metabolitos y componentes estructurales no antigénicos como el D-arabinol y la manosa, parecen prometedores aunque aún no están comercializados.

Aunque en un futuro puedan llegar a estar disponibles técnicas similares para la detección de hongos dermatofitos, en la actualidad sólo se aplican a micosis sistémicas.

Sin embargo, las técnicas basadas en la detección del ADN, ya se utilizan ampliamente en el diagnóstico de infecciones sistémicas, pero también empiezan a aplicarse en dermatomicosis, debido a su mayor sencillez y coste.

LAS TÉCNICAS BASADAS EN LA DETECCIÓN DE ADN

Estas técnicas tienen en común la detección de secuencias diana de nucleótidos específicas de hongos, y que no están presentes en las células animales.

Existe una gran cantidad de posibles secuencias diana dentro del genoma, y una gran variedad de técnicas que permiten detectarlas.

Las secuencias diana en micosis incluyen tanto genes nucleares como mitocondriales, de una o múltiples copias. En general, la diana multicopia más utilizada son los genes ribosómicos (18S, 5.8S y 28S). Estos genes contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos y también, dominios variables y regiones espaciadoras internas (ITS), altamente variables. Las secuencias conservadas se pueden utilizar para detectar la infección fúngica, mientras que las variables se pueden emplear para la identificación de las especies implicadas^{8,9,10}.

En cuanto a las técnicas utilizadas, existe también una gran variedad. A continuación describimos las más utilizadas.

- Las técnicas de hibridación emplean sondas de ADN para detectar la presencia de un organismo determinado. La sonda es una cadena simple de ADN sintetizada para que sea complementaria a la secuencia que se quiere detectar y que va marcada para poder identificarla después de la hibridación.
- La PCR, o reacción en cadena de la polimerasa se ha impuesto a otras técnicas de diagnóstico basadas en los ácidos nucleicos, debido a su simplicidad, sensibilidad, rapidez y especificidad. La reacción consiste en una amplificación de un fragmento de genoma, mediante una pareja de oligonucleótidos específicos de la secuencia diana^{9,10,14}.
- PCR anidada. Se incorpora una segunda pareja de cebadores para una segunda amplificación en la que se utiliza como diana el producto amplificado en la primera PCR, lo cual aumenta mucho su sensibilidad^{8,10}.
- PCR múltiple. Varias parejas de cebadores se utilizan en una misma PCR. Este método ha sido ensayado en identificación de hongos filamentosos y diferentes especies de *Candida*¹⁵.
- RAPD-PCR: Produce una amplificación al azar de fragmentos de ADN utilizando oligonucleótidos inespecíficos^{8,16}.
- PCR-RFLP: (Restriction Fragment Length Polymorphism) digestión con enzimas de restricción del producto de una amplificación por PCR.
- Real-time PCR o PCR a tiempo real: Con esta técnica, la recolección y el análisis de datos se producen al mismo tiempo que la reacción de amplificación de diana, de manera que es posible recoger y analizar los datos al mismo tiempo⁹.
- EIA: esta técnica, utiliza la PCR para obtener una gran cantidad de fragmento diana y, posteriormente, lo hibrida con una sonda complementaria y la detecta mediante inmunoanálisis

que proporciona una lectura colorimétrica o fluorescente automatizada.

- PCR y secuenciación del ADN. Este método aporta la máxima información, puesto que se obtiene la secuencia de nucleótidos detallada, de manera que puede compararse con la secuencia de la cepa de referencia que se encuentra disponible en los bancos de datos como el Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>) o el EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>)^{8,17}.

Por último se están probando nuevas tecnologías como los Microarrays o la Tecnología Luminex xMAP que permiten la obtención de varias determinaciones diferentes al mismo tiempo, y garantizan una mejora para el uso en diagnóstico rutinario^{8,10,18}.

En general, todas estas técnicas presentan una serie de ventajas frente a los métodos tradicionales: una alta sensibilidad y especificidad para la detección e identificación de especies, una mayor objetividad, mayor sencillez técnica que no exige experiencia en el manejo de hongos, pero sobre todo proporcionan resultados en muy poco espacio de tiempo.

Muchos laboratorios han puesto a punto técnicas de estos tipos, aunque de momento no son fácilmente aplicables al uso rutinario en clínica. En estos momentos se están desplazando del ámbito de la investigación a los laboratorios clínicos, pero aún no se dispone de productos comerciales.

Puesto que los laboratorios están incrementando la fiabilidad en secuenciación de ADN para la identificación de hongos, deben promoverse la validación de aislados de referencia y un control de calidad en las bases de datos de secuencias^{19,20,21}. En este sentido, se necesita una actualización y crecimiento de estas bases de datos y estudios para determinar zonas de homología de secuencia.

Aunque estos métodos estarán disponibles para la práctica clínica en un futuro próximo, en la actualidad, se considera que un abordaje que combine los métodos morfológicos y moleculares asegura un mayor éxito en el manejo de pacientes con infecciones fúngicas.

TÉCNICAS ALTERNATIVAS EN DERMATOMICOSIS

El aumento reciente en la prevalencia de estas infecciones, y la necesidad de establecer diagnósticos diferenciales, está provocando la aplicación de nuevas técnicas, como las descritas en el apartado anterior, al campo de la dermatología.

Cerca de la mitad de los casos en que existe la sospecha clínica de onicomicosis corresponden a otras patologías. Con la excepción de tinea versicolor (pitiriasis versicolor), pocas infecciones fúngicas superficiales pueden ser diagnosticadas basándose exclusivamente en signos y síntomas clínicos.

En onicomicosis, la confirmación por parte del laboratorio es necesaria para el diagnóstico diferencial con otras onicopatías como psoriasis, liquen plano, paroniquias crónicas, traumatismos, hemorragias del lecho ungueal, onicogriposis, los cambios fisiológicos del envejecimiento, la distrofia mediana canalicular, el síndrome de uñas amarillas, el melanoma maligno

no subungueal y el carcinoma escamocelular subungueal²¹.

El diagnóstico habitual de las dermatomicosis está basado en la detección de estructuras típicas de hongos por observación directa al microscopio de una preparación de la muestra con KOH al 10 %, seguida por el cultivo in vitro y la identificación morfológica de los hongos^{22, 23, 24, 25, 26}.

También se utiliza la biopsia con tinción ácida de Schiff y menos frecuentemente técnicas de inmunohistoquímica, RFLPs y PCR²⁶.

Sin embargo, esta metodología presenta dos inconvenientes principales: por un lado, el examen directo al microscopio da resultados falsos negativos en un 5 a un 15% de los casos²⁷; y en segundo lugar, la siembra en placa con medios de cultivo específicos requiere de 2 a 4 semanas para la identificación de la especie^{22,23,24}.

Dada la mayor prevalencia de dermatofitos como agentes causales de onicomiosis (90%), algunos microbiólogos recomiendan la utilización de una prueba más específica y más rápida para alcanzar el diagnóstico definitivo. El DTM (Dermatophyte Test Media) es un medio de cultivo que contiene nutrientes promotores del crecimiento de hongos dermatofitos y antibióticos inhibidores del crecimiento de mohos y bacterias contaminantes^{22,24,25,26}.

El examen histopatológico puede ser necesario en aquellos casos en que las preparaciones con KOH y los cultivos son negativos en repetidas ocasiones y persiste la sospecha clínica de onicomiosis. Otras técnicas, utilizadas con menor frecuencia para el diagnóstico de infecciones micóticas de la lámina ungueal son la inmunohistoquímica (exposición de la muestra frente a anticuerpos específicos contra determinadas especies de hongos y visualización por inmunofluorescencia) y la citometría de flujo dual (diferenciación molecular entre los posibles agentes infecciosos)^{23,25,26}.

Durante las tres últimas décadas se ha producido un gran avance en las técnicas de biología molecular, que han sido aplicadas con gran éxito al diagnóstico de múltiples patologías, ya sean de origen genético o infeccioso.

La aplicación de estas técnicas a las patologías causadas por hongos está aún en una etapa inicial debido a algunas particularidades en este campo.

Concretamente en el caso de los dermatofitos, a pesar de estar entre los organismos más frecuentemente observados en biomedicina, aún no se ha establecido una taxonomía que permita identificar y nombrar las aproximadamente 25 especies patógenas implicadas. Algunos biotipos que fueron considerados especies en el pasado, basados en profundas diferencias morfológicas y patrones de infección, parecen ser la misma especie en modernos análisis moleculares.

Una serie de trabajos, que encuentran resultados contradictorios, ha llevado a replantear la taxonomía de los hongos dermatofitos²⁸.

Se ha visto que algunas características morfológicas asignadas tradicionalmente a varias especies de *Trichophyton* por los métodos tradicionales se correspondían con sólo dos especies del mismo género por comparación de secuencias²⁹. Los datos moleculares sugieren una reinterpretación de los resultados de pruebas fenotípicas tradicionales^{28,30,31}.

Existen muchos trabajos que comparan unas técnicas con otras con diferentes resultados^{32,33,34,35}. Por

ejemplo Gupta y col (36) llegan a la conclusión de que el estudio de la región ITS1 por PCR proporciona una proporción de detección de *T. rubrum* mayor que por cultivo.

Existe actualmente un equipo comercial llamado Onychodiag (BioAdvance), que detecta dermatofitos en uñas, y que fue evaluado resultando tener una sensibilidad del 83,6% frente al cultivo.

El éxito de las aproximaciones basadas en la secuencia del ADN dependerá de la diana elegida, la fiabilidad del resultado, y de la disponibilidad de bases de datos de secuencias validadas.

La principal aportación de estas técnicas es la rapidez del diagnóstico y la especificidad en la identificación del microorganismo.

TECNICAS EN DERMATOMICOSIS PARA DETECTAR CÁNDIDA

Para el cultivo de *Cándida* se han venido utilizando diferentes medios. Entre ellos, el más empleado es el agar de peptona-glucosa (dextrosa) o peptona-maltosa, que al ser descrito en 1896 por Sabouraud adoptó su nombre. Con el fin de evitar el crecimiento de la flora bacteriana comensal posee un pH inferior a 6; e incluso pueden incorporarse distintos tipos de antibióticos (cloranfenicol, penicilina, estreptomina y ciprofloxacino). Por otro lado, no permite diferenciar las distintas especies de *Candida*³⁷.

Pruebas específicas de identificación de especies de *Candida*:

- Formación de tubo germinativo en suero, clara de huevo etc.
- Auxograma o asimilación de carbohidratos.
- Zimograma o fermentación de carbohidratos.
- Microcultivos en agar maíz arroz.
- Producción de velo en medio Sabouraud líquido.
- Utilización del sistema API 20 C Biomeriux.

Existen otros medios de cultivo que permiten diferenciar colorimétricamente a especies concretas de *Candida*. Se basan en la reducción que experimentan determinados componentes agregados al medio de cultivo en presencia de estas.

Tal es el caso de medios con sulfito de hidroxibismuto (Medio de Nickerson) o con trifeniltetrazol que permite identificar diferentes especies de *Candida* (Medio de Pagano-Levin)³⁸. Este último presenta el inconveniente de inhibir, a altas concentraciones, el crecimiento de la *C. albicans* y la *C. glabrata*. El fosfomolibdeno permite diferenciar la *C. albicans*, de otras especies³⁹. Más recientemente, se ha introducido el medio de CROMagar; este contiene un sustrato cromogénico que permite diferenciar las colonias de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*⁴⁰.

C. albicans apenas crece bajo condiciones anaeróbicas, en cuyo caso las colonias adoptan una forma estrellada^{37,41,42}. Sin embargo, generalmente la identificación de la especie de *Candida* se realiza en base a una combinación de las características morfológicas y fisiológicas. Además, existen en el mercado sistemas comercializados que permiten al clínico la identificación rápida de la especie de *Candida* aislada^{37,41}.

Los métodos diagnósticos utilizados para la detección de *cándidas*, que emplean medios cromogé-

nicos fundamentalmente han sido utilizados en investigaciones de tipo comparativo, en las que no se indicaba el género ni el número total de los pacientes, pero se mencionan la cantidad de especímenes y el lugar de donde habían sido extraídos. Por ejemplo, un estudio realizado con 282 especímenes clínicos que incluían fluidos orofaríngeos; vaginales, muestra traqueoesofagal (TVPs) y de sangre para comparar CA (CHROMagar Candida) y m-CA (Método de Filtración de Membrana) el cual presentaba una mayor sensibilidad (16.7%)⁴³.

Para Berardinelli y col.⁴⁴ que usaron 122 aislamientos clínicos y demostraron que el uso de ese medio de cultivo era menos costoso e igual de efectivo para el diagnóstico que los anteriormente utilizados.

En cuanto a los cultivos tomados para el ensayo de Cooke y col.⁴⁵ provenían de diferentes laboratorios clínicos y usaron una modificación del medio agar cromogénico para identificar más rápidamente las especies de *Candida*. Aplicaron tres pruebas diferentes; una reformulado denominado Candida Diagnostic agar (CDA), y las convencionales CHROMagar Candida y Candida ID agar para confirmar el diagnóstico obteniéndose una sensibilidad de 97.6%, 100%, 72.7% y especificidad de 100%, 96.8%, 98.1% respectivamente.

Stephen⁴⁶ describió un método que utilizaba dos pruebas de enzimas en un formato (Albistrip) y la midió con GT (Tubo Germinal), para saber cual de ambas presentaba mayor sensibilidad en la identificación de las muestras clínicas obteniéndose una sensibilidad de 98% para ambas y una especificidad de 95% y 98% individual y respectivamente. En otro estudio, Yucesoy al concluir enfatizó que el BIGGY agar (sensibilidad 87.0% y especificidad, 75.2%) no fue propuesto para sustituir el otro medio de diagnóstico (CA) (sensibilidad 94% y especificidad 100%) y puede ser usado solo o con otros medios para la identificación de las muestras en los laboratorios de una clínica microbiológica.

Pfaller y col.³⁸ citan que el medio CHROMagar Candida juega un papel importante en el laboratorio de microbiología clínica al identificar la entidad micótica en cultivos mixtos, además de poder ser usado como medio primario de cultivo y como medio diagnóstico.

Heelan y col.⁴⁷ describe que por muchos años ha sido usado la producción de tubo germinal para identificar *Candida albicans* y que existen otros métodos que han sido desarrollados para detectar la producción de enzimas (L - prolino aminopeptidasa y B- galactosaminidasa) en los cultivos. Compararon varios métodos de producción de enzimas tales como Bactiscard *Candida* (BC), Murex *Candida albicans* (CA), Tube germ (GT) obteniendo en sensibilidad, especificidad y valor predictivo 100%; en cuanto a *Albican sure* (AS) fue de sensibilidad 100%; especificidad 97%; valor predictivo negativo 100%; y el positivo 96%, para probar los resultados se aplicó API y en cada una de las pruebas se siguieron las instrucciones del fabricante.

En cuanto a Jabra-Rizk y col.⁴⁰ reformularon el método CHROMagar *Candida* obteniendo buenos resultados (91,3% frente al 90, 8%) en la identificación de los aislamientos clínicos individuales y mixtos.

Letscher-Bru y col.⁴¹ tomaron 786 especímenes de diferentes laboratorios y compararon el *Candida* ID sensibilidad de (97.7%); con *Candiselect*.

Para Merlino y col.⁴² en su estudio uso CHROMagar *Candida* basado en la GT como medio primario

para identificar la entidad micótica (63% de sensibilidad). En cuanto a Quindos y col.⁴⁸ en su estudio evaluó la capacidad de Bichro-latex *albicans* para identificar *Candida albicans* en los aislamientos clínicos (99,74% de sensibilidad y una especificidad del 99,87%. En el estudio de Rousselle y col.⁴⁹ concluyen que el medio cromogénico *Albicans* ID y el fluorplate son dos medios que permiten una identificación macroscópica entre las especies. La sensibilidad para ambas pruebas fue del 93.8% y la especificidad 98.6%.

PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO ALTERNATIVO

Teniendo en cuenta la posibilidad de utilizar métodos alternativos, nuestro grupo de investigación ha iniciado el estudio comparativo entre una PCR y el método tradicional para la detección de hongos dermatofitos.

El estudio se ha desarrollado en el Servicio de Diagnóstico adscrito a la Clínica Podológica Universitaria de la UEx, con las muestras recibidas en dicha clínica durante el año 2009. Se han tomado muestras consecutivas de fresado y/o trozos de uña en 57 pacientes con sospecha de infección fúngica ungueal y se ha procedido al cultivo para determinar la presencia de hongos dermatofitos.

El medio inicial fue AGAR Sabraud + cloranfenicol que es selectivo para aislar dermatofitos y levaduras.

A continuación, se realizó el análisis molecular a partir de un fragmento de la misma muestra. En primer lugar se procede a la extracción del ADN mediante según instrucciones del fabricante (Instagene Matrix®).

La PCR múltiple, se realizó con cuatro oligonucleótidos diferentes: Derm1, Derm2, Tr y uni. El primer par amplifica un fragmento de la Quitina sintasa 1 específica de hongos dermatofitos con un tamaño de 366 pb, y el segundo amplifica una secuencia específica de *Trichophyton rubrum* localizada en una región espaciadora intergénica del ADN ribosomal. La longitud del ADN amplificado es de 203 pb. (Fig. 1)

Por último, para aumentar la sensibilidad de la amplificación, diseñamos otro par de oligonucleótidos, N1 y N2, para realizar una PCR anidada, que amplifica un fragmento de 269 pb.

Los resultados se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, y teñido con bromuro de etidio. En la Figura 1 se representa el aspecto de un gel.

Para estandarizar las reacciones, se probaron diferentes condiciones de concentración de reactivos, y diferentes temperaturas de los ciclos (datos no mostrados).

El método molecular y el clásico coincidieron en el 89% de las muestras analizadas, aunque el resultado fue discordante en 6 de 54 (11,1%). (Tabla 1).

Nuestro método puede ofrecer un resultado a las 24 horas (48 horas en el caso de necesidad de confirmación) frente a las dos o tres semanas que puede tardar el cultivo, con lo que ya estamos obteniendo un avance significativo en la confirmación de un diagnóstico clínico.

Además, el estudio comparativo demuestra que

el método supone un aumento de sensibilidad de casi un 2% respecto al cultivo en placa (27,7% frente a 25,9%) (ver Tabla 2).

Otra ventaja de este método es que permite la identificación de la especie más frecuente en dermatomycosis: *Trichophyton rubrum*, sin necesidad de una prueba complementaria.

Su aplicación ha supuesto una notable mejora en la diagnosis de las onicodistrofias en nuestra clínica podológica, especialmente en la reducción del tiempo de confirmación diagnóstica.

En referencia a la utilización de métodos cromogénicos para la identificación de especies de *Candida*, nuestro grupo de investigación también ha puesto en marcha un estudio en el que se recogen muestras de más de 100 pacientes encontrándose 5 especies diferentes de *Candida* y siendo *C. albicans* una de las menos prevalentes (aproximadamente sólo un 4% de las muestras dieron positivas para dicha especie). Las especies que se aislaron con mayor porcentaje (más del 40%) fueron *C. Parasilopsis* y *C. glabrata*. En nuestra experiencia cabe destacar el aislamiento de *C. krusei* en las muestras de uñas procesadas en nuestro laboratorio. Esta especie es resistente a los azoles por lo que es muy importante discriminar su presencia si se persigue la total curación del paciente. De lo contrario, su permanencia en la zona lesionada está asegurada a pesar del tratamiento. Es necesario proponer un tratamiento alternativo frente al aislamiento de *C. krusei*.

CONCLUSIÓN

El cultivo sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de micosis porque permite la identificación del agente etiológico y el posterior estudio de sensibilidad a antifúngicos; pero sus dos principales inconvenientes son la baja especificidad y la lentitud del método.

Sin embargo, las modificaciones que se están haciendo sobre esta metodología, como la utilización de medios cromogénicos como el que hemos expuesto anteriormente para *Candida*, favorece su continuidad como referencia para el diagnóstico.

Por otro lado, la biología molecular ha supuesto un gran avance en las técnicas de diagnóstico en muchos campos de la medicina. En el caso de las micosis es necesario avanzar en este campo, para disminuir el tiempo de espera en la confirmación del diagnóstico y la instauración de un tratamiento adecuado.

En la actualidad, muchos hospitales utilizan métodos basados en la biología molecular como complemento de las técnicas clásicas en el diagnóstico de las micosis invasoras, ya que se considera que asegura un mayor éxito en el manejo de situaciones graves.

Por otro lado, la difusión de las técnicas de cuantificación de ácidos nucleicos, como la PCR en tiempo real, pueden ayudar a la implantación del diagnóstico molecular en la práctica microbiológica asistencial. Estas técnicas están automatizadas, parcial o totalmente, y aportan sistemas comerciales que permiten la posibilidad de elaborar protocolos estandarizados, aplicables a los laboratorios clínicos, con fiabilidad metodológica y, quizá, rentabilidad diagnóstica.

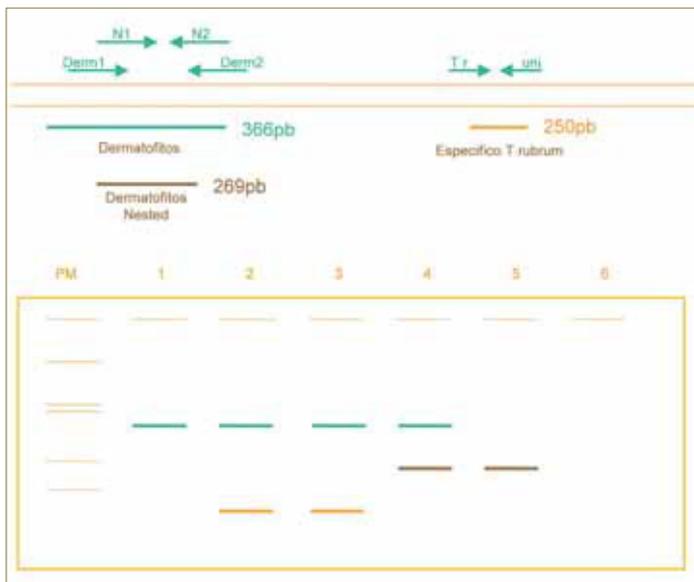


Fig. 1. Representación esquemática del planteamiento y el resultado de la PCR.

El genoma se representa por dos líneas paralelas, las flechas representan a los oligonucleótidos utilizados, y los fragmentos amplificados corresponden a las líneas gruesas con sus longitudes respectivas. En el rectángulo se han representado los diferentes resultados que se pueden encontrar en un gel de agarosa: Las líneas 4 y 5 corresponderían a *T. rubrum*, mientras que las líneas 1, 2 y 3 son los hipotéticos resultados de cualquier especie de dermatofito que no sea *T. rubrum*.

Nº MUESTRA	RESULTADO CULTIVO	RESULTADO PCR	DISCORDANCIAS
5	+	+	
7	-	+	+
11	+	+	
16	+	-	-
20	+	+	
25	+	+	
29	+	+	
33	+	-	-
34	+	+	
37	+	+	
38	+	+	
39	+	+	
40	+	+	
42	-	+	+
44	-	+	+
47	-	+	+
52	+	+	
57	+	+	

Tabla 1. Resultados positivos del análisis realizado por los métodos tradicional y molecular, con las discordancias encontradas entre los dos.

MÉTODO	% POSITIVOS	% DISCORDANTES	% NEGATIVOS
Cultivo+PCR	31,5 % (17/54)	11,1% (6/54)	68,5%
Cultivo	25,9 % (14/54)	3,7 % (2/54)	74,1%
PCR	27,8 % (15/54)	7,4% (4/54)	72,2 %

Tabla 2. Comparación de los resultados del análisis de muestras de uña obtenidos por el método convencional y el que se basa en la PCR.

BIBLIOGRAFÍA

- Liu, D., Coloe S., Baird R., and Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. med. Microbiol.* 2000; 49:493-497.
- Shehata A. S., Mukhetjee P.K., Aboulatta H.N., Akhras A.I., Abbadi S.H., Ghannoum M.A. Single-Step PCR Using (GACA)₄ Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 2641-2645.
- Elewski, B. E., Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11: 415-428
- Mahoney, J. M., Bennet J., and Olsen B. The diagnosis of onychomycosis. *Dermatol. Clin.* 2003; 21:463-467.
- Mayordomo Acebedo R., Hidalgo Ruiz S., Pérez Pico A.M. Estudio de la eficacia de la sospecha clínica en la detección de onicomicosis. *Rev. Esp. Podología.* 2007; 18 (3) 114-120.
- Gadea I, Cuenca-Estrella M, Martín E, Pemán J, Pontón J, Rodríguez-Tudela JL. Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2007; 25(5):336-40.
- Martínez Roig, A., Micosis cutáneas. *Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos en Dermatología Pediátrica* 65-73, 2002.
- Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol.* 2007 Sep;45(6):475-90.
- Pemán J, Martín-Pozuelos E, Rubio Calvo MC. Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. *Revista Iberoamericana de Micología.* Edición CD 2010.
- Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. *J. Antimicrob. Chem.* (2002)49, Suppl. S1,11-19.
- Lopes da Silva R., Ribeiro P, Abreu N, Ferreira T, Fernandes T, Monteiro A, Costa F, Caldas J, Silva M, Carande L, Ferreira G, Conduto A, Cruz E, Henrique Sousa M, Silva Rodrigues A, Costa I, Veiga J and Botelho de Sousa A. Early diagnosis of Invasive Aspergillosis in Neutropenic Patients. Comparison between Serum Galactomannan and Polymerase Chain Reaction. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2010;4, 81-88.
- Mensa J. Guía de Terapéutica antimicrobiana. 2010., Editorial Antares.
- Cercenado E; Cantón R; *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a los antifúngicos.* 2006.
- Rodríguez-Tudela JL, Cuesta I, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M. Molecular techniques in mycology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 Nov;26 Suppl 13:47-53.
- Palanco, A.; Mellado, E.; Castilla, C.; y Rodríguez-Tudela, J.L. *Mycology*, 1999. 34: 177-183.
- Gentles, J. C., laboratory investigations of dermatophyte infections of nail. *Sabourdia* 1971;9:149-152.
- Rodríguez-Tudela JL, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Aug;58(4):435-40. Epub 2007 May 16.
- Gräser Y, Scout J, Summerbell R. *Mycopathologia* 2008; 166 (5-6): 239-56.
- Petrini, B., and M. L. von Rosen, Optimal dermatophyte diagnosis requires both microscopy and culture. *Lakartidningen* 2002;99:4084
- Weinberg J.M.; Koestenblatt, E.K.; Tutrone, W.D.; et al. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*, 2003; 49: 193-197.
- Yang J., Chem L., Wang L., Zhang, W., Liu T., and Jin Q. TrED: the Trichophyton rubrum expression Database. *BMC Genomics*, 2007;8:250.
- Ballesté R, Mousques N, Gezeule E. Onicomicosis: Revisión del tema. *Rev Med Uruguay* 2003; 19: 93 - 106.
- Mahoney J, Bennet J, Olsen B. The diagnosis of onychomycosis. *Dermatologic Clinics* 2003; 21 (3): 463 - 67.
- Gupta A, Ryder J, Baran R. The use of topical therapies to treat onychomycosis. *Dermatologic Clinics* 2003; 21 (3): 481 - 89.
- Loo DS. Cutaneous Fungal Infection in the elderly. *Dermatologic Clinics* 2004; 22 (1): 33 - 50.
- Denning DW, Evans EGV, Kibbler CC, Roberts MM, Rogers TR, Warnock DW, Warren RE. *Farmightly Review: fungal nail disease: A guide to good practice (Report of a working group of the British Society for Medical Mycology).* *BMJ* 1995; 311: 1277 - 1281.
- Brillowska-Dabrowska, A., Saunte D.M., and Arendrup M.C. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:1200-1204.
- Graser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. *Mycopathologia* 2008;166: 239-56.
- Gräser Y, Kuijpers AF, Presber W, et al. Molecular taxonomy of Trichophyton mentagrophytes and T. tonsurans. *Med Mycol* 1999;37: 315-30.
- S Seyfarth F, Ziemer M, Gräser Y, Elsner P, Hipler UC. Widespread tinea corporis caused by *Trichophyton rubrum* with non-typical cultural characteristics—diagnosis via PCR. *Mycoses* 2007; 50 suppl 2: 26-30.
- Welsh O, Vera-Cabrera L, Wels E. Onychomycosis. 2010 28, 151-159.
- Roderick J. Hay, DM, Rachael Morris Jones. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clinics in Dermatology* (2010) 28, 190–196.
- Savin C, Huck S, Rolland C, et al. Multicenter evaluation of a commercial PCR-enzyme-linked immunosorbent assay diagnostic kit (Onychodag) for diagnosis of dermatophytic onychomycosis. *J Clin Microbiol* 2007;45:1205-10.
- Howell SA, Barnard RJ, Humphreys F. Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections. *J Med Microbiol* 1999;48:33-40.
- 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;98:224-8.
- 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.
- Fernández S. Pita, Pèrtegas Díaz, S. Pruebas diagnósticas. (serial online). Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitaria Juan canalejo, A Coruña (España) *Cad Aten Primaria* 2003; 10: 120 - 4
- Pfaller M. A., Houston A., Coffman S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of Clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology.* January 1996; 34 (1): 58-61
- Heelan J. S., Siliezer D., Coon K. Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology.* Nov. 1996; 34 (1): 2847-9
- Jabra-Rizk M. A., Brenner T. M., Romagnoli M., Baqui A. M. A., Merz W. G., Falkler Jr., Meiller T. F. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida. *Journal of Clinical Microbiology.* May 2001; 39 (5): 2015-6
- Letscher-Bru V., Meyer M. H., Galois A. C., Waller J., Candolfi E. Prospective Evaluation of the New Chromogenic Medium Candida ID, in Comparison with Candiselect, for Isolation of Molds and Isolation and Presumptive Identification of yeast Species. *Journal of Clinical Microbiology.* April 2002; 40 (4): 1508-1510
- Merlino J., Tambosis E., Veal D. Chromogenic Tube Test for Presumptive Identification or Confirmation of Isolates as *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology.* April 1998; 36 (4): 1157-9.
- Bauter T. G., Nelis H. J. Comparison of Chromogenic and Fluorogenic Membrane Filtration Methods for Detection of Four *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology.* May 2002; 40(5):1838-9.
- Berardinelli S., Opheim D. J. New Germ Tube Induction Medium for the Identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology.* Nov 1985; 22 (5):861-2.
- Cooke V. M., Miles R. J., Price R. G., Midgley G., Khamry W., Richardson A. C. New Chromogenic Agar Medium for the Identification Of *Candida* spp. *Applied and Environmental microbiology.* July 2002; 68 (7): 3622-7.
- Stephen F. D. *Candida albicans* Colony Identification in 5 minutes in a General Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology.* May 1991; 29 (5): 1081-2.
- Heelan J. S., Siliezer D., Coon K. Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology.* Nov. 1996; 34 (1): 2847-9.
- Quindos G., San Millán R., Robert R., Bernard C., Ponton J. Evaluation of Bichro-latex *Albicans*, a New Method for Rapid Identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology.* May 1997; 35 (5): 1263-2.
- Rouselle P., Freydiere A. M., Couillerot P. J., Monylos H., Gille Y. Rapid Identification of *Candida albicans* by using *Albicans II*. *Journal of Clinical Microbiology.* December 1994; 32 (12): 3034-6.