

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA  
DE DERMATOFITOS CAUSANTES  
DE ONICOMICOSIS**

**Por**

**Med. C. BYRON ANTHONY BODDEN MENDOZA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en  
Microbiología Médica**

**Diciembre, 2014**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA  
DE DERMATOFITOS CAUSANTES DE ONICOMICOSIS**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dr. C. Carmen Amelia Molina Torres**  
Director de Tesis



---

**Dr. C. Lucio Vera Cabrera**  
Co-Director de Tesis



---

**Dr. C. Gloria María González González**  
Miembro de la Comisión



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE  
DERMATOFITOS CAUSANTES DE ONICOMICOSIS**

Presentado por: Med. C. Byron Anthony Bodden Mendoza

Éste trabajo se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. C. Carmen Amelia Molina Torres.

---

**Dr. C. Carmen Amelia Molina Torres**  
Director de Tesis

## **DEDICATORIA**

Dedico ésta tesis a mis padres quienes me han dado la vida, educación, apoyo y amor.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por el don de la vida y permitir que llegara hasta aquí.

A mis padres, por el amor incondicional que siempre me han brindado y por inculcarme valores que me han servido para ser una mejor persona.

A mi hermana Bridgett Bodden, por su apoyo, cariño y palabras de ánimo cuando más lo necesitaba.

A mi comisión de tesis, la Dra. Carmen Molina por guiarme con paciencia y esmero en el camino de la investigación, así como al Dr. Lucio Vera y la Dra. Gloria González por sus enseñanzas y consejos.

A mis maestros del Departamento de Microbiología, quienes me enseñaron con mucha dedicación el apasionante mundo de la microbiología.

A todo el personal del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, en especial a la Q.F.B. Anabel Gallardo Rocha (AGR) micóloga por excelencia, a la Q.F.B. Wendy Escalante por sus *tips* y consejos y al T.L.C. Carlos Paz por su invaluable ayuda.

Al M.C. Neri Alejandro Álvarez Villalobos por su gran apoyo en la estadística.

A todos mis amigos y compañeros de la maestría, en especial Paola C. Rivera, Rogelio Treviño, Alexandra Mendoza, Álvaro Colin, Selene Jacobo, Abraham Díaz, Rita Moreno, Sonia Ocampo y Thelma Quiroga, quienes de alguna u otra forma me brindaron su apoyo e hicieron de la maestría un período fascinante en mi vida, ¡muchas gracias!

A las residentes de dermatología Sylvia Martínez, Laura Barbosa, Irma Pérez, Juany Garza, Cecilia García, Daniela Castrejón y Lorena Tamez por su amistad y todos los momentos que compartimos en el laboratorio.

A mis queridos amigos Yaneli Guevara y Adán Perera por creer en mi y darme ánimo, consejos y motivación para seguir adelante.

Al CONACyT y proyecto PAICyT-UANL por el soporte económico otorgado para la realización del presente trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	<b>1</b>
1.1 Dermatomitos . . . . .	1
1.1.1 Clasificación . . . . .	1
1.2 Epidemiología . . . . .	3
1.2.1 Prevalencia . . . . .	3
1.2.2 Factores que Contribuyen al Desarrollo de la Onicomycosis . . . . .	4
1.3 Manifestación Clínica . . . . .	5
1.3.1 Onicomycosis por Dermatomitos ( <i>Tinea Unguim</i> ) . . . . .	6
1.3.2 Clasificación Clínica de la Onicomycosis . . . . .	6
1.4 Diagnóstico de Laboratorio . . . . .	8
1.4.1 Toma de Muestra . . . . .	9
1.4.2 Métodos Microbiológicos . . . . .	9
1.4.2.1 Examen Microscópico Directo . . . . .	9
1.4.2.2 Cultivo Micológico . . . . .	11
1.4.2.3 Histopatología . . . . .	12
1.4.3 Ensayos Moleculares . . . . .	13
1.5 Tratamiento . . . . .	14
1.5.1 Tratamiento Tópico . . . . .	15
1.5.1.1 Amorolfina . . . . .	15
1.5.1.2 Ciclopirox . . . . .	16
1.5.2 Tratamiento Oral . . . . .	16
1.5.2.1 Terbinafina . . . . .	17
1.5.2.2 Itraconazol . . . . .	18
1.5.2.3 Fluconazol . . . . .	18
1.5.3 Tratamiento Mecánico . . . . .	19
1.5.4 Tratamiento Químico . . . . .	19
1.6 Susceptibilidad y Resistencia Antifúngica . . . . .	20
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> . . . . .	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> . . . . .	<b>23</b>
3.1 Objetivo General . . . . .	23
3.2 Objetivos Específicos . . . . .	23

<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> . . . . .	24
4.1 Área de Trabajo y Equipo . . . . .	24
4.2 Material Biológico . . . . .	25
4.3 Estrategia General . . . . .	26
4.4 Identificación de Hongos Causantes de Onicomycosis . . . . .	26
4.5 Identificación Molecular . . . . .	27
4.5.1 Obtención del ADN . . . . .	27
4.5.2 PCR <i>Multiplex</i> . . . . .	28
4.6 Susceptibilidad Antifúngica <i>In Vitro</i> . . . . .	30
4.6.1 Agentes Antifúngicos . . . . .	31
4.6.2 Preparación del Inóculo . . . . .	32
4.6.3 Prueba de Microdilución en Placa . . . . .	33
4.7 Análisis Estadístico . . . . .	35
<b>5. RESULTADOS</b> . . . . .	36
5.1 Identificación Convencional . . . . .	36
5.2 Identificación Molecular . . . . .	37
5.3 Identificación Convencional <i>versus</i> Molecular . . . . .	39
5.4 Susceptibilidad Antifúngica <i>In Vitro</i> . . . . .	42
<b>6. DISCUSIÓN</b> . . . . .	44
<b>7. CONCLUSIONES</b> . . . . .	51
<b>8. PERSPECTIVAS</b> . . . . .	52
<b>9. REFERENCIAS</b> . . . . .	53
<b>RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO</b> . . . . .	63

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Especies de Dermatofitos de acuerdo a su Clasificación Ecológica . . . . .	3
2. Factores Predisponentes para la Onicomycosis . . . . .	5
3. Secuencia de Iniciadores utilizados para la Identificación de Dermatofitos por PCR <i>Múltiplex</i> basados en el Gen Quitina Sintetasa 1 y Gen ITS 1-2 . . . . .	29
4. Rangos de CMI Establecidos por el CLSI® para las Cepas Control . .	34
5. Comparación de los resultados de identificación de hongos por KOH-DMSO, Cultivo y PCR <i>Multiplex</i> de Uñas con Sospecha de Onicomycosis . . . . .	41
6. Análisis Comparativo de KOH-DMSO, Cultivo y PCR <i>Multiplex</i> para la Identificación de Dermatofitos en Uñas . . . . .	42
7. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>T. rubrum</i> y <i>T. mentagrophytes</i> a ciclopirox, Fluconazol, Itraconazol, Terbinafina y Voriconazol . . . .	43



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Metodología para la Extracción de ADN e Identificación Molecular de Dermatofitos en Muestras de Uñas . . . . .	30
2. Metodología para el Ensayo de Susceptibilidad Antifúngica <i>in vitro</i> . . .	34
3. Hongos Aislados por Cultivo de Pacientes con Sospecha de Onicomycosis . . . . .	37
4. Resultados de PCR <i>Multiplex</i> para Especies de Dermatofitos, Levaduras y Hongos Filamentosos No-Dermatofitos . . . . .	38
5. Resultados de PCR <i>Multiplex</i> de Muestras Clínicas . . . . .	39

## ABREVIATURAS

<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APD:</b>	Agar papa dextrosa
<b>ATCC:</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>CLSI:</b>	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI:</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>g:</b>	Fuerza gravitacional
<b>°C:</b>	Grados Celsius
<b>ITS:</b>	Espaciador transcripcional interno
<b>KOH:</b>	Hidróxido de potasio
<b>MG:</b>	Media geométrica
<b>m/s:</b>	Metros por segundo
<b>µL:</b>	Microlitro
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>MOPS:</b>	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
<b>nm:</b>	Nanómetro
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>pMol:</b>	Picomolar
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RPMI:</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>UFC:</b>	Unidad formadora de colonia

# RESUMEN

Byron Anthony Bodden Mendoza Fecha de Graduación: Diciembre, 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE DERMATOFITOS CAUSANTES DE ONICOMICOSIS**

Número de páginas: 63

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Médica**

**Área de Estudio: Micología Médica**

**Propósito y Método de Estudio:** La onicomiosis es la distrofia ungueal de mayor incidencia a nivel mundial, siendo los dermatofitos los agentes etiológicos predominantes. El principal objetivo de éste estudio fue identificar con base en pruebas moleculares dermatofitos causantes de onicomiosis en 135 aislamientos clínicos con base en pruebas moleculares, así como determinar sus perfiles de susceptibilidad antifúngica. Para realizar éste estudio se utilizó la técnica molecular PCR *multiplex* con la finalidad de identificar los dos dermatofitos responsables del 90% de los casos: *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Los perfiles de susceptibilidad antifúngica a ciclopirox, fluconazol, itraconazol, terbinafina y voriconazol se determinaron siguiendo el protocolo M38A-2 establecido por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI®).

**Contribuciones y Conclusiones:** *Trichophyton rubrum* fue el dermatofito más frecuente tanto por cultivo (13%) como por PCR *multiplex* (60%). La PCR *multiplex* empleada mostró mayor sensibilidad que el cultivo para la identificación de dermatofitos. Con respecto a los ensayos de susceptibilidad, la terbinafina fue el antifúngico más efectivo para inhibir el crecimiento *in vitro* de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* con una CMI<sub>90</sub> de 0.008µg/ml (p<0.0001). El fluconazol fue el antifúngico menos efectivo para inhibir el crecimiento *in vitro* de ambas especies, con una CMI<sub>90</sub> de 8µg/ml para *T. rubrum* y de 4µg/ml para *T. mentagrophytes* (p<0.0001).

---

**Dr. C. Carmen Amelia Molina Torres**  
Director de Tesis

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

La onicomycosis se refiere a la infección fúngica de la uña que ocasiona una destrucción gradual del plato ungueal (1). Las onicomycosis son las enfermedades más frecuentes de las uñas, constituyendo más del 50% de las onicopatías y son causadas por tres grupos de hongos: dermatofitos, levaduras y hongos filamentosos no dermatofitos, con una frecuencia de 50%, 27% y 23% respectivamente (1-6).

### **1.1 Dermatófitos**

Los dermatofitos son un grupo de hongos morfológicamente, fisiológicamente y genéticamente relacionados que poseen la propiedad de ser queratinofílicos y queratinolíticos. Tienen la capacidad de infectar tejidos queratinizados, como son la piel, uñas y pelo, esto gracias a las queratinasas que producen, y llegan a ocasionar lo que se denomina dermatofitosis o tiña (7, 8).

#### **1.1.1 Clasificación**

Taxonómicamente los dermatofitos pertenecen al reino *Eumycota*, división *Ascomycota*, clase *Euascmycetes*, orden *Onygenales*, y familia

*Arthrodermataceae*, la cual comprende de tres géneros, que se clasifican en su fase anamórfica (asexual o imperfecta) de acuerdo a las características de las macroconidias y microconidias en: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton* (9, 10). Se conocen aproximadamente 42 especies de dermatofitos de los cuales al menos 31 se consideran importantes como hongos patógenos (11).

Los dermatofitos son ubicuos y en base a su nicho ecológico pueden clasificarse como: geofílicos, zoofílicos o antropofílicos (**Tabla 1**).

- ❖ Dermatofitos geofílicos: éstos hongos se encuentran en la tierra y en raras ocasiones afectan a las personas o animales. La especie más frecuente es *Microsporum gypseum*, que produce tiñas del cuerpo, cabeza y uñas (7, 10).
- ❖ Dermatofitos zoofílicos: Se encuentran colonizando a los animales y, por el contacto de éstos con el humano, pueden infectarlo. Se estima que son responsables del 30% de las dermatofitosis en humanos (11). En este grupo sobresale *Microsporum canis*, que tiene como reservorio natural a perros y gatos. Los dermatofitos zoofílicos que infectan a humanos ocasionan cuadros clínicos más agresivos, probablemente por el escaso reconocimiento inmunológico que tienen las variantes antigénicas con respecto al sistema inmune humano (7, 10, 12).
- ❖ Dermatofitos antropofílicos: son los que afectan principalmente el tejido humano, en un 70% de los casos, y rara vez a los animales (7, 11). Éstos a su vez pueden subdividirse en:
  - Dermatofitos antropofílicos cosmopolitas

- Dermatofitos antropofílicos de distribución regional
- Dermatofitos antropofílicos estrictos

Cabe mencionar que si bien es cierto que para cada especie se tiene un hábitat predominante, éste no es exclusivo. Los dermatofitos zoofílicos y geofílicos en general tienden a producir mayores lesiones inflamatorias que aquellas producidas por los dermatofitos antropofílicos (7, 10).

**Tabla 1**

ESPECIES DE DERMATOFITOS DE ACUERDO A SU CLASIFICACIÓN ECOLÓGICA  
(7, 10)

Geofílico	Zoofílico	Antropofílico
<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>	<i>T. rubrum</i>
<i>M. fulvum</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>T. tonsurans</i>
<i>M. cookei</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
<i>M. nanum</i>	<i>T. equinum</i>	var. <i>interdigitale</i>
<i>M. amazonicum</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. soudanese</i>
<i>M. praecox</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. violaceum</i>
<i>M. boullardii</i>	var. <i>mentagrophytes</i>	<i>T. schoenleinii</i>
<i>M. racemosum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. concentricum</i>
<i>T. flavescens</i>	var. <i>quinckeanum</i>	<i>T. raubitschekii</i>
<i>T. terrestre</i>	<i>T. simii</i>	<i>T. megninii</i>
<i>T. ajelloi</i>	<i>T. sarkisorii</i>	<i>Epidermophyton</i>
<i>T. gloriae</i>		<i>floccosum</i>
<i>T. longifusum</i>		<i>M. ferrugineum</i>
<i>E. stockdaleae</i>		<i>M. audouinii</i>

## 1.2 Epidemiología

### 1.2.1 Prevalencia

La onicomycosis es una de las infecciones dermatológicas más comunes a nivel mundial. En Europa se estima una prevalencia del 26.8% (13). En un

estudio llevado a cabo en España, reportaron una prevalencia de onicomicosis por dermatofitos del 2.8%, 4% para hombres y 1.7% para las mujeres. El agente etiológico principal encontrado fue *Trichophyton rubrum* (82.1%), seguido de *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* (14.3%) (14). En México, las dermatofitosis constituyen del 70 al 80% de todas las micosis. La tiña de las uñas se presenta en un 30% de las dermatofitosis y en el 85-87% de las onicomicosis. La relación hombre:mujer es de 2:1 y el agente causal mas frecuentemente aislado de las onicomicosis en general es *Trichophyton rubrum*, seguido de *Trichophyton mentagrophytes*, ambos sumando mas del 90% de los casos (15, 16). En el 2006, Welsh y cols., realizaron un estudio epidemiológico, en el cual de 2,397 casos de dermatofitosis reportados en la ciudad de Monterrey, México, 613 fueron por *tinea unguium* siendo *Trichophyton rubrum* el principal agente causal en un 60% (17).

En pacientes pediátricos, la prevalencia de onicomicosis se ha incrementado en los últimos años. Es mayor en países en vías de desarrollo, y el grupo más afectado es el de 12 a 16 años, las uñas de los pies son las más afectadas y *Trichophyton rubrum* es el principal agente etiológico (18).

### **1.2.2 Factores que contribuyen al desarrollo de onicomicosis**

Un número considerable de factores contribuyen al desarrollo de onicomicosis (**Tabla 2**). El factor más prevalente es la edad avanzada, la cual se reporta de 18.2% en pacientes de 60-79 años, comparada con 0.7% en pacientes menores de 19 años (9). Los hombres son tres veces mas propensos que las mujeres a tener onicomicosis. En el caso de pacientes con procesos crónicos o

debilitantes como el cáncer e inmunodeficiencia, las tiñas se incrementan y extienden con facilidad (7, 13). Aproximadamente el 34% de los diabéticos tienen onicomycosis y son casi tres veces más propensos a desarrollar onicomycosis que las personas no diabéticas (1). Son de igual importancia los malos hábitos higiénicos, el hacinamiento y el uso de zapatos cerrados (19).

**TABLA 2**  
**FACTORES PREDISPONENTES PARA LA ONICOMICOSIS (1, 9, 18)**

---

**Características del hospedero**

- Edad avanzada
- Género
- Incapacidad de mantener higiene adecuada
- Factores genéticos
- Historia familiar
- Tabaquismo
- Ocupación
- Hiperhidrosis

**Condiciones sistémicas**

- Deficiencia inmunológica
- Diabetes
- Enfermedad vascular periférica
- Medicamentos inmunosupresores
- Factores ambientales
- Calzado oclusivo
- Actividades deportivas
- Trauma ungueal

**Otras**

- Infecciones fúngicas concomitantes (*tinea unguium*)
  - Psoriasis
  - Síndrome de Down
- 

### **1.3 Manifestación Clínica**

Tradicionalmente las infecciones causadas por dermatofitos se han nombrado de acuerdo a la región anatómica involucrada, anteponiendo la palabra “*tinea*” antes de la región corporal en latín: *tinea barbae* (tiña de la



barba y bigote), *tinea capitis* (tiña de la cabeza), *tinea corporis* (piel glabra), *tinea cruris* (inguinal), *tinea favus* (tiña fávica, por *Trichophyton schoenleinii*), *tinea imbricata* (causado únicamente por *Trichophyton concentricum*), *tinea manuum* (tiña de las manos), *tinea pedis* (tiña de los pies) y *tinea unguium* (tiña de la uña) (7, 10).

### **1.3.1 Onicomycosis por dermatofitos (*Tinea Unguium*)**

La onicomycosis dermatofítica afecta en mayor proporción las uñas de los pies (90%) que las uñas de las manos (10%). Es una dermatofitosis crónica, de inicio insidioso, que afecta una o varias uñas. Los signos y síntomas iniciales de la onicomycosis son variados e incluyen coloración de la uña, hiperqueratosis, onicolisis, descamación de la uña y dolor. La coloración es usualmente el primer signo y la uña puede tomar un color blanco-amarillento, pero también café, naranja o negro, dependiendo del agente infeccioso. El dolor generalmente se debe al engrosamiento de la lámina ungueal que hace presión con el calzado (7, 13).

### **1.3.2 Clasificación Clínica de la Onicomycosis**

Tradicionalmente, la onicomycosis se clasifica de acuerdo a la zona de infección de la lámina ungueal en:

#### **a. Onicomycosis Subungueal Distal-Lateral**

Es la variedad clínica más frecuente. La infección inicia desde el hiponiquio, avanza por los márgenes distales laterales de la uña hasta llegar a la base o matriz ungueal. Los agentes principales son

*Trichophyton* spp. y ocasionalmente por *Scytalidium* spp., *Candida* spp., y otros hongos filamentosos no dermatofitos. El espacio subungueal puede ser ocupado por bacterias infecciosas, causando coloración amarillenta de la uña (1).

b. Onicomycosis Subungueal Proximal

La infección inicial en el borde proximal (matriz ungueal), las esporas penetran por debajo de la cutícula y avanzan hacia el borde libre. Éste tipo clínico se ha visto con mayor frecuencia en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) así como otros tipos de inmunocompromiso, y es considerado un marcador temprano de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los principales agentes etiológicos son *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. y *Scopulariopsis brevicaulis* (1, 2, 7).

c. Onicomycosis blanca superficial

Implica una afección superficial de la uña que se presenta como parches blancos opacos distribuidos en la superficie dorsal ungueal. *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* son los principales patógenos, sin embargo algunos hongos filamentosos no dermatofitos también pueden ser la causa (1).

d. Endónix (*endonyx*)

Es una forma clínica descrita recientemente de característica laminar con parches blancos, y que afecta de manera subungueal la parte media y proximal de la uña. El hiponiquio es respetado, no hay engrosamiento de

la uña ni cambios inflamatorios. Éste tipo de invasión fúngica es producida por *Trichophyton soudanese* y *Trichophyton violaceum* (1, 2, 7).

e. Onicomycosis distrófica total

Se caracteriza por la destrucción completa de la uña, y es el estadio final de cualquier tipo de onicomycosis crónica. La uña sufre de gran engrosamiento, pérdida de brillo y consistencia. *Trichophyton rubrum* es el agente más común, seguido de *Trichophyton mentagrophytes* (2, 7, 19).

### **1.4 Diagnóstico de Laboratorio**

El diagnóstico oportuno de la onicomycosis es importante para un tratamiento exitoso. El costo y la duración de la terapia antifúngica, el riesgo de reacciones adversas a fármacos y posibles interacciones con otros medicamentos hacen que el diagnóstico de la patología sea muy importante antes de iniciar la terapia. Las características clínicas de las uñas distróficas deben alertar al clínico de la posibilidad de una infección ungueal de origen fúngico, pero también tomar en cuenta que el 50% de las afecciones ungueales que se creen son por hongos, en realidad no lo son. En éste grupo de condiciones clínicas que mimetizan la onicomycosis y que deben tomarse en cuenta como diagnóstico diferencial están: psoriasis de la uña, eccema, liquen plano, acrodermatitis enteropática, melanoma subungueal maligno, carcinoma subungueal de células escamosas, deficiencias vitamínicas, onicodistrofias traumáticas y el síndrome de la uña amarilla (1, 7).

### **1.4.1 Toma de Muestra**

El primer aspecto crítico para el diagnóstico es la recolección de muestra. Una toma de muestra adecuada es esencial para lograr aislar al agente fúngico etiológico. En primera instancia se debe hacer asepsia de la uña con alcohol etílico 70% y posteriormente tomar la muestra dependiendo del patrón clínico. En aquellos casos con onicomicosis subungueal distal-lateral, se debe cortar la uña para exponer el lecho ungueal y hacer un raspado de los detritos subungueales lo más cerca del lecho ungueal posible, ya que es más probable recuperar inóculo viable en ésta zona. En la onicomicosis subungueal proximal se debe tomar del lecho en el área más cercana a la lúnula y, si es necesario, se puede realizar una biopsia o curetaje. Para la blanca superficial y endónix, se raspa el área afectada, descartando la capa más externa para reducir la presencia de contaminantes. Finalmente, en las distróficas totales se deben obtener fragmentos de la lámina ungueal. La muestra debe ser recolectada en un recipiente estéril y permanecer en seco hasta su utilización (10, 19).

### **1.4.2 Métodos Microbiológicos**

Para el diagnóstico de onicomicosis, se requiere de la sospecha clínica y el aislamiento del hongo. Por ésta razón, el estándar de oro es el examen microscópico directo de la muestra clínica (piel, cabello y uña) y el cultivo (11).

#### **1.4.2.1 Examen Microscópico Directo**

El examen microscópico directo se emplea para confirmar la presencia de elementos fúngicos en la muestra. Aunque con ésta prueba se reporten falsos

negativos de entre 5-15%, es una técnica de cribaje altamente eficiente (10). Las escamas y fragmentos ungueales se colocan entre portaobjetos y cubreobjetos con soluciones como KOH al 20% que disuelven la queratina y permiten ver elementos fúngicos (hifas, pseudohifas, esporas, artroconidios, levaduras) utilizando microscopio de luz (7). El DMSO (20-40%) se puede utilizar en la solución de KOH al 20% para aumentar la sensibilidad de la reacción y acortar el tiempo para disolver la queratina y así aclarar la muestra (20).

También pueden emplearse diferentes tinciones a la muestra tratada con KOH para facilitar la visión del hongo. El Azul de Evans, Gram, Giemsa y negro de clorazol se pueden emplear con microscopio de luz. El blanco de calcoflúor es un colorante que se une a la celulosa y quitina del hongo que emite fluorescencia cuando se expone la muestra a la radiación ultravioleta. Con ésta técnica se obtienen menos falsos negativos que únicamente empleando KOH, pero se requiere de microscopio de fluorescencia, por lo que su uso es limitado (2, 21).

Las ventajas del examen microscópico directo son la rapidez (20-30 minutos) y bajo costo. Sin embargo, requiere experiencia con el consiguiente problema de falsos negativos y no brinda información de las especies. Además, tampoco demuestra la viabilidad de los elementos encontrados. Su sensibilidad es variable (10-82.5%), posiblemente por factores que dependen del observador, de la técnica de preparación, de la calidad de la muestra y de la cantidad de microorganismos presentes en la misma (19).

### 1.4.2.2 Cultivo Micológico

El cultivo es esencial en todas las infecciones fúngicas de la uña y en cualquier infección que se trate con medicamentos sistémicos. Los medios rutinarios para el aislamiento de los dermatofitos son: agar dextrosa de Sabouraud y agar Sabouraud adicionado con cicloheximida y cloranfenicol, que disminuyen la posibilidad de aislar hongos contaminantes y bacterias (2). Las muestras normalmente se incuban a 25-30 °C por, al menos, cuatro semanas, esto debido al crecimiento lento de los dermatofitos. Posteriormente se hace la identificación según el aspecto macroscópico y microscópico de las colonias. Las características macroscópicas que se deben tomar en cuenta son la velocidad de crecimiento, tamaño, color, textura y producción de pigmento. Las características microscópicas que se deben observar son el tipo de hifa, macroconidias, tabiques, microconidias, clamidoconidias e hifas especiales (en espiral, raqueta o pectinadas). Éstas características macroscópicas y microscópicas son las que orientan hacia el género y especie. Sin embargo, algunos aislados presentan características atípicas, haciendo que la identificación sea muy difícil. Existen pruebas complementarias que ayudan a identificar al agente fúngico en esos casos de aislamientos atípicos. Los siguientes medios de cultivo estimulan la esporulación en aquellas cepas poco productoras de conidias: agar papa dextrosa, agar avena y agar lactrimel. El agar de urea (agar de Christensen) se utiliza para identificar a un pequeño número de especies de dermatofitos que son ureasa negativos, particularmente *Trichophyton rubrum*, de las especies ureasa positivas, como *Trichophyton mentagrophytes*. Se debe interpretar con cautela dada la prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos que podrían encontrarse en las colonias,

dando un resultado falso positivo. También se debe tomar en cuenta que las especies antes consideradas como variedad granular y Africana de *Trichophyton rubrum*, ahora son *Trichophyton raubitscheckii*, que es ureasa positiva (2, 10, 22).

Una prueba confirmatoria para aislados atípicos es la perforación de cabello *in vitro* de Ajello y Georg (23). Se basa en el desarrollo, por ciertos dermatofitos, de órganos perforantes que invaden el cabello formando agujeros cónicos perpendiculares al eje longitudinal del cabello. El uso más común de ésta prueba es para diferenciar aislamientos atípicos de *Trichophyton mentagrophytes* (positivos) de aislamientos atípicos de *Trichophyton rubrum* (negativos), pero también es útil para otras determinaciones incluyendo la diferenciación de *Microsporum canis* (positivo) de *Microsporum audouinii* y *Microsporum equinum* (negativos) (10).

El cultivo micológico es una técnica altamente específica, pero con altos porcentajes de falsos negativos, impidiendo que sea una técnica sensible. La ventaja es que se logra la identificación del agente causal y demuestra su viabilidad (19, 21).

#### **1.4.2.3 Histopatología**

Cuando el examen microscópico directo y el cultivo no son diagnósticos, se requiere del examen histopatológico para la identificación del hongo. Éste método requiere de un examen histológico de diferentes secciones de la uña posterior a la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) o metenamina de plata de Grocott (GMS). La lectura se puede hacer en 24 a 48 horas. La técnica con PAS utiliza el ácido periódico para oxidar grupos hidroxilos de los polisacáridos

de la pared celular en aldehído, el cual reacciona con el reactivo Schiff. El fondo es verde, mientras que el hongo se tiñe de rojo. La técnica con GMS utiliza ácido crómico para oxidar los polisacáridos de la pared celular, convirtiéndolos en aldehídos. Esto resulta en la reducción del complejo nitrato-plata metenamina, tiñendo las células de un color café oscuro en un fondo verde pálido. Otras tinciones útiles incluyen Fontana-Masson, hematoxilina y eosina, inmunofluorescencia y mucicarmina de Mayer (19, 21). El estudio histopatológico es el método de mayor sensibilidad pero, al igual que el KOH, no determina viabilidad ni la especie del agente infeccioso (2).

### **1.4.3 Ensayos Moleculares**

En años recientes se han desarrollado nuevas técnicas utilizando herramientas moleculares para el diagnóstico de las dermatofitosis, específicamente en las infecciones ungueales. Y aunque aún no hay un uso generalizado de técnicas de biología molecular, si hay suficiente información que apoya su uso en el diagnóstico de las onicomicosis, particularmente debido a la identificación precisa a nivel de especie. Un número considerable de estrategias basadas en el ADN se han utilizado para identificar los hongos causantes de las onicomicosis. La técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (24-27). Algunos genes que son estudiados para la identificación fúngica, utilizando la técnica de PCR, incluyen el gen de la topoisomerasa II de ADN (28), el espaciador transcripcional interno (ITS) del ADN ribosomal y el gen de la quitina sintetasa 1 (CHS1) (29). La PCR puede emplearse en la modalidad *multiplex* (30-32), anidada (33), o combinada con



otras técnicas como el análisis de fragmentos de longitud polimórfica (RFLP) (34-38), y el análisis de fragmentos de longitud polimórfica terminal (TRFLP) (39). Hay reportes en el cual se puede detectar el agente causal de la onicomycosis en tan solo 5 horas utilizando un método de extracción de ADN de 2 pasos y el uso de PCR multiplex (40). La PCR también se puede usar en la modalidad de tiempo real (41), y no solo PCR punto final, para cuantificar los niveles relativos de transcritos y estimar la viabilidad de la muestra. Se debe tener precaución para cerciorarse de que las muestras no estén contaminadas, ya que la PCR amplificará cualquier ADN fúngico presente, sin importar su viabilidad, potencialmente dando falsos positivos (21).

Las ventajas de la PCR al compararlo con los métodos microbiológicos son que la PCR se puede desarrollar en 2-3 días, no requiere de conocimientos ni experiencia en identificación microscópica ni macroscópica de hongos y que provee un resultado objetivo de la presencia o ausencia de ADN fúngico. Todas esas características, si se automatizan, tienen el potencial de proveer un diagnóstico oportuno que con KOH, PAS y cultivo (26).

## **1.5 Tratamiento**

Es importante considerar varios factores antes de iniciar una terapia antifúngica. La severidad de la onicomycosis, el agente causal, el número de uñas afectadas, el uso de fármacos, comorbilidades, la resistencia antifúngica, el costo del tratamiento y la preferencia del paciente son aspectos importantes a considerar. En general las modalidades de tratamiento para la onicomycosis

incluyen: tópico, oral, químico o mecánico. Su combinación logra aumentar la actividad antifúngica y la liberación del medicamento (19).

### **1.5.1 Tratamiento Tópico**

La eficacia de la monoterapia con antifúngicos tópicos es limitada por la penetración incompleta del antifúngico en la lámina ungueal y por su habilidad de mantener una concentración sostenida que sea mayor a la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el hongo infectante. Sin embargo, las lacas de amorolfina y ciclopirox han demostrado ser efectivas en el manejo de la onicomicosis. Las lacas de uñas reducen la pérdida transungueal de agua y tienen el potencial de inducir la germinación de conidias resistentes a drogas (42), lo que ayudaría a erradicar el hongo y prevenir la recurrencia de la onicomicosis. El riesgo de efectos secundarios e interacciones con otros fármacos es menor con el tratamiento tópico que con el tratamiento sistémico. La monoterapia tópica está indicada en pacientes que tengan alguna contraindicación de terapia sistémica, en la onicomicosis blanca superficial, y también podría emplearse en la onicomicosis distal-lateral cuando esté afectada menos de 50% de la superficie ungueal, sin compromiso de la matriz ungueal. También se recomienda en niños con uñas delgadas y de rápido crecimiento (1, 43).

#### **1.5.1.1 Amorolfina**

La amorolfina es un agente antifúngico derivado de morfolina que inhibe a las enzimas reductasa D14 y la isomerasa D7-8 de la síntesis de ergosterol.

Ésta inhibición lleva a una actividad fungistática y fungicida contra dermatofitos, levaduras y hongos filamentosos no dermatofitos. La amorolfina al 5% se aplica una o dos veces por semana durante 6 a 12 meses. Antes de aplicarla se debe limar la uña, limpiarla y desengrasarla. Algunos de los efectos secundarios reportados son quemazón, prurito, eritema y dolor (19, 43).

#### **1.5.1.2 Ciclopirox**

El ciclopirox 8% es un derivado sintético de la hidroxipirodona que tiene actividad fungistática, fungicida y antibacteriana gracias a sus múltiples mecanismos de acción. Al unirse a cationes trivalentes ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ), ciclopirox inhibe varias enzimas dependientes de metales (p.ej., citocromos). También se ha demostrado que el ciclopirox afecta la producción de energía en los procesos de transporte de electrones en la mitocondria; reduce la actividad de la catalasa y peroxidasa, que son responsables de la degradación de peróxidos tóxicos; y afectan el influjo de nutrientes y la síntesis asociada de proteínas y ácidos nucleicos. Se aplica diariamente por 6 a 12 meses. Tiene actividad contra dermatofitos, algunos hongos filamentosos no-dermatofitos, especies de *Candida* y algunas bacterias (19, 43).

#### **1.5.2 Tratamiento Oral**

El tratamiento antifúngico oral sistémico es generalmente más efectivo que los tratamientos tópicos; sin embargo, también se han asociado a mayores riesgos de efectos adversos y de interacciones con otras drogas. La terapia oral se recomienda en la onicomiosis subungueal proximal y en pacientes que no

han tenido una respuesta satisfactoria en 6 meses de tratamiento tópico. En el pasado, la griseofulvina y el ketoconazol se consideraban los medicamentos de elección, pero se han reemplazado por nuevos antifúngicos orales, con mayores tasas de curación, menos recaídas, menos efectos secundarios y menor tiempo de duración. Los principales antifúngicos empleados actualmente para el tratamiento de la onicomicosis son terbinafina, itraconazol y fluconazol (43).

### **1.5.2.1 Terbinafina**

La terbinafina es el fármaco de elección para el manejo de la onicomicosis. Es un derivado de alilamina que evita la síntesis de ergosterol al inhibir la enzima escualeno epoxidasa. La acumulación intracelular de escualeno inicia una cascada de eventos que llevan a la actividad fungicida de la terbinafina, mientras que la falta de ergosterol conlleva a su acción fungistática. En adultos, se administra una dosis diaria de 250 mg de terbinafina durante 6 semanas en las onicomicosis de las manos y durante 12-16 semanas en la de los pies. La terbinafina ha demostrado ser el más efectivo de los azoles para el manejo de la onicomicosis por dermatofitos. Su uso se ha asociado con menor recurrencia que con itraconazol. La terapia con terbinafina es más segura que con itraconazol en pacientes diabéticos ya que no induce a la hipoglicemia en pacientes diabéticos que toman hipoglucemiantes metabolizados por CYP3A4. Algunas de las desventajas de la terbinafina es que se ha asociado a falla hepática, alteraciones en el olor y el gusto, síntomas depresivos, neutropenia severa y necrólisis dérmica tóxica (2, 43).

### **1.5.2.2 Itraconazol**

El itraconazol fue el primer agente antifúngico sistémico aprobado para el tratamiento de la onicomicosis. Es un triazol que inhibe la enzima lanosterol 14 alpha-desmetilasa, ocasionando que tenga una actividad principalmente fungistática. Tiene gran afinidad por tejidos queratinizados, resultando en niveles mas altos en los tejidos que en plasma. Por ésta razón se administra de forma intermitente o en “pulsos”. Una terapia de pulso consiste en dar 200 mg de itraconazol dos veces al dia durante una semana, luego 3 semanas de descanso entre cada pulso. Típicamente las onicomicosis de las manos requieren dos pulsos y la de los pies requieren 3 o 4 pulsos. En cuanto a las desventajas, el uso prolongado de itraconazol puede llevar a desarrollar neuropatía periférica. También se ha asociado con falla hepática, por lo que se deben monitorear a los pacientes adecuadamente. El itraconazol es un potente inhibidor de CYP3A4, y puede tener interacciones con muchas otras drogas (1, 43).

### **1.5.2.3 Fluconazol**

El fluconazol es un triazol que inhibe a la enzima lanosterol 14 alfa-desmetilasa (dependiente de CYP450) de la vía de la síntesis de ergosterol. Éste mecanismo resulta en la depleción de ergosterol con la consecuente actividad fungistática. Debido a su vida media plasmática larga (entre 20 y 50 horas), se puede administrar de forma mas espaciada. Para el manejo de la onicomicosis, se recomienda una terapia en pulso con 150, 300 o 450 mg una vez a la semana durante 6-9 meses para las onicomicosis de las manos y 12-18 meses para la onicomicosis de los pies. Como resultado de su menor concentración residual en

la uñas, la terapia con fluconazol debe ser más prolongada que con terbinafina e itraconazol. El fluconazol se debe administrar con precaución en pacientes con disfunción renal y hepática (2, 19, 43).

### **1.5.3 Tratamiento Mecánico**

El desbridamiento, el raspado (*curettage*) del lecho, la abrasión ungular, la avulsión quirúrgica (completa o parcial) e incluso el simple recorte de las uñas, son diferentes métodos mecánicos que se pueden emplear pero no llevan a la curación por si solos. El objetivo es reducir el grosor de la lámina, con el fin de disminuir la carga fúngica, el dolor y actuar como adyuvantes aumentando la penetración de los tratamientos tópicos y sistémicos (19).

### **1.5.4 Tratamiento Químico**

El objetivo de la avulsión química es desintegrar la unión que hay entre la lámina ungueal y el lecho ungueal, y también reblandecer la lámina ungueal. Al igual que el tratamiento mecánico, se utiliza como adyuvante al tratamiento tópico u oral. Se utilizan diferentes ungüentos o pastas a base de urea (p.ej., urea al 40%, urea al 20% con ácido salicílico al 10%, urea al 40% combinado con tolnatato al 2% o bifonazol al 1%) las cuales se colocan en la uña afectada y se ocluyen por una o dos semanas para finalmente remover la uña afectada. El procedimiento se puede repetir cuantas veces sea necesario. Se recomienda emplear éste método para el manejo de una uña afectada y que sea de reciente inicio (10, 43).

## 1.6 Susceptibilidad y Resistencia Antifúngica

Las pruebas de susceptibilidad antifúngica siguen siendo un área de profundo interés. Éstas pruebas son utilizadas para determinar la eficacia relativa de diferentes agentes antifúngicos y para detectar el desarrollo de organismos drogo-resistentes, siendo útiles para orientar al clínico en la elección de agentes antifúngicos que tengan un mejor efecto en las micosis (44).

El valor de la concentración mínima inhibitoria (concentración mínima requerida de una droga para inhibir el crecimiento *in vitro* de un microorganismo) de cualquier droga va a depender de: la calidad de la muestra, tipo de medio en el que se cultiva, cantidad de inóculo, composición y pH del medio, temperatura y tiempo de incubación, solvente y curva de crecimiento (45). Recientemente, en el año 2008, el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorios (CLSI por sus siglas en inglés) en el documento M38-A2 incluye, dentro del protocolo "*The Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*", a los dermatofitos con todos los parámetros estandarizados (46). Antes de ese año no existía un consenso global para la determinar los perfiles de susceptibilidad antifúngica de los dermatofitos. Por ésta razón existen muchos estudios publicados en donde describen diferentes métodos de susceptibilidad antifúngica en dermatofitos, cuyos resultados no son comparables entre si. Cabe mencionar que aún no se han acordado los puntos de corte de sensibilidad y resistencia de los antifúngicos para los dermatofitos. La razón es que se necesitan estudios de correlación entre las CMIs *in vitro* de los dermatofitos y el resultado clínico. Se han descrito mecanismos putativos de resistencia a diferentes antifúngicos por

parte de los dermatofitos, principalmente *Trichophyton rubrum*. Los dos principales son por bombas de eflujo y la respuesta celular al estrés. Las bombas de eflujo son proteínas transmembranales que permiten la salida de diferentes compuestos química y estructuralmente diferentes, entre ellos las moléculas activas de las drogas. La respuesta celular al estrés se refiere a la capacidad del microorganismo de responder a dosis no-letales de agentes químicos (drogas) o físicos, de sintetizar proteínas específicas y compuestos de bajo peso molecular que se cree actúan como protectores o efectores que promueven el desarrollo de respuestas de defensa o tolerancia (45).

Por todo lo anterior, en éste trabajo de tesis nos dimos a la tarea de identificar dermatofitos causantes de onicomycosis utilizando un método molecular que aventajara al método tradicional de identificación (microscopía directa y cultivo) en cuanto a la rapidez, sensibilidad y reproducibilidad. Además, como existen pocos estudios, en éste trabajo determinamos los perfiles de susceptibilidad antifúngica de los dos principales dermatofitos causantes de onicomycosis frente a los antifúngicos de uso común y uno para micosis profundas.



## **CAPÍTULO 2**

### **JUSTIFICACIÓN**

La onicomicosis es la principal causa de onicodistrofias a nivel mundial, siendo los dermatofitos los agentes etiológicos predominantes. Debido a que el método convencional para el diagnóstico es tardado y requiere personal experimentado, es de interés realizar una rápida y correcta confirmación de onicomicosis, necesaria para evitar un diagnóstico erróneo e instaurar un tratamiento antifúngico apropiado.

En años recientes los agentes causales de onicomicosis han desarrollado resistencia a los antifúngicos. En México se carece de información de susceptibilidad antifúngica de las especies más comunes de dermatofitos que causan onicomicosis.

## **CAPÍTULO 3**

### **OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Identificar dermatofitos causantes de onicomicosis en aislamientos clínicos con base en pruebas moleculares, y determinar sus perfiles de susceptibilidad antifúngica.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Identificar mediante métodos moleculares dermatofitos causantes de onicomicosis directamente de muestras clínicas.
2. Determinar los perfiles de susceptibilidad *in vitro* de los dermatofitos frente a varios antifúngicos.

## **CAPÍTULO 4**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.1 Área de Trabajo y Equipo**

La parte experimental de éste trabajo se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se utilizaron los siguientes aparatos: agitador (Vortex-Genie 2<sup>®</sup>, Scientific Industries, Inc., NY, USA), autoclave (Harvey Sterile Max, Fisher Scientific, Iowa, USA), balanza analítica (Sartorius CP225D, Germany), balanza digital (Sartorius AG Göttingen, Germany), baño de agua (Precision Scientific Inc., 180 Series Water Bath), cámara de electroforesis (Owl Separation Systems, Inc., Portsmouth, NH USA Modelo B1A), campana de bioseguridad (NUAIRE<sup>™</sup> Labgard Class II, Type A/B3 Laminar Flow), congelador -80 °C (NuAire -85°C Ultralow Freezer), espectrofotómetro (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), fotodocumentador (Epichemi<sup>3</sup> Darkroom, UVP Bioimaging Systems), homogeneizador (MP<sup>™</sup> FastPrep<sup>®</sup>-24), incubadora 30 °C (Precision Scientific Inc., Low Temperature Incubator 815), incubadora 35 °C (Thermo Scientific, Precision), microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5417C), microscopio óptico (Carl Zeiss Standard 25, Germany), pH-metro (AR 20

Accumet® Research, Fisher Scientific), pipeteadora (Stripettor™ Plus, Corning, NY, USA), y termociclador (MS Research PTC-2000 Peltier Thermal Cyclor).

También se utilizó el siguiente material: asas bacteriológicas, gradillas, guantes (Supreno® SE Microflex® NV, USA), hisopos estériles (Protec<sup>MR</sup> Degasa, Morelos, México), laminillas (Corning Inc., NY, USA), cubreobjetos (Corning Inc., NY, USA), papel de parafina (Parafilm® M, WI, USA), pipetas lineales desechables de 5 y 10 mL (Costar® Stripette® Corning Inc., NY), pipetas manuales de 0.5-1000 µL (BioPette™ Labnet International Inc., NJ, USA), pipeta manual multicanal de 50-300 µL (BioPette™ Labnet International Inc., NJ, USA), placas de Petri (S y M Laboratorios, Puebla, México), puntillas de 0.2 a 1000 µL sin filtro para pipetas (Corning Inc., NY, USA), puntillas de 0.5-10 µL con filtro (Costar® Corning Inc., NY, USA), puntillas de 1-30 µL con filtro (Corning Inc., NY, USA), puntillas de 1-200 µL con filtro (Costar® Corning Inc., NY, USA), puntillas de 101-1000 µL con filtro (Fisherbrand® Fisher Scientific, USA), tubos de centrífuga de 15 y 50 mL (Fisherbrand® Fisher Scientific, USA), tubos de microcentrifugación de 0.2 mL (Thermowell® Gold PCR Tubes, Corning Inc., NY, USA), y tubos de microcentrifugación de 2 mL (Axygen® Inc., CA, USA).

## **4.2 Material Biológico**

Se trabajó con 135 muestras de uñas recolectadas de 2013 a 2014 y que se almacenaron en cajas de Petri estériles y selladas con papel parafina en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Dichas muestras fueron recolectadas en

cantidad representativa de la lesión y de forma aséptica por personal experimentado del mismo laboratorio.

### **4.3 Estrategia General**

Para dar cumplimiento al objetivo del trabajo se estableció la siguiente estrategia general: partiendo de 135 uñas con sospecha de onicomicosis, cada muestra se dividió en tercios para realizar en primer lugar microscopía directa con solución de KOH al 20% y 40% DMSO para visualizar presencia fúngica en la muestra. En segundo lugar se cultivaron para lograr la identificación a nivel especie (microcultivo y pruebas bioquímicas en caso necesario) y el resto de la muestra se utilizó para la extracción de ADN directamente de la muestra clínica y se llevó a cabo la genotipificación mediante la técnica molecular PCR *multiplex*, amplificándose los genes quitina sintetasa 1 e ITS 1 y 2. Adicionalmente, se determinó la susceptibilidad de las especies *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* frente a los antifúngicos ciclopirox, fluconazol, itraconazol, terbinafina y voriconazol.

### **4.4 Identificación de Hongos Causantes de Onicomicosis**

A cada una de las 135 muestras de uñas se les realizó examen directo al colocar una porción de la muestra en una laminilla y una gota de una solución de 20% KOH y 40% DMSO, dejando actuar 20 minutos antes de observar al microscopio. Esto con la finalidad de observar presencia fúngica en la muestra: levaduras, esporas, y/o hifas.

Otra porción de la muestra fue sembrada en los agares Sabouraud (Bioxon® Becton Dickinson, México) y Sabouraud adicionado con cicloheximida y cloranfenicol (BBL™ Mycosel™ Agar Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD USA) e incubada a 30 °C durante 4 semanas. Posteriormente se procedió a la identificación a nivel de especie, por una micóloga experimentada (AGR), al observar las características morfológicas macroscópicas de la colonia (tamaño, textura y color) y microscópicas (presencia de levaduras, hifas, presencia o ausencia y disposición de macroconidias y microconidias) al realizar un examen directo con cinta adhesiva y azul de algodón. En caso de ser necesario, se realizaron microcultivos en agar avena (DIFCO™ Oatmeal Agar. Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD USA) y prueba de la ureasa en agar de Christensen (47).

## **4.5 Identificación Molecular**

Para la genotipificación de los hongos en las muestras de las uñas, se utilizó la técnica molecular de PCR *multiplex*. En la **Figura 1** se presenta la metodología que se siguió para la identificación molecular.

### **4.5.1 Obtención del ADN**

Para llevar a cabo la obtención del material genético fúngico de las muestras de uñas, se incubaron de 2 a 120 mg de fragmentos ungueales a temperatura ambiente durante 12 horas en 500 µL de solución queratinolítica compuesta de 1 gramo de sulfuro de sodio (Jalmek®, NL, México), 7.5 mL de agua bidestilada estéril y 2.5 mL de etanol (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO

USA). Posterior a esto, las muestras se centrifugaron a 6,000 x g durante dos minutos y se descartó el sobrenadante. En seguida se realizaron tres lavados del precipitado con agua bidestilada estéril, centrifugando a 6,000 x g durante dos minutos y descartando el sobrenadante entre cada uno de los lavados. A continuación las muestras se homogeneizaron a 6.0 m/s durante 40 segundos y se utilizó el FastDNA™ kit (MP™ Biomedicals CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante y se realizó dentro de la campana de bioseguridad. Finalmente, el DNA obtenido de las muestras fue cuantificado por medio de espectrofotometría y almacenado en congelación a -20 °C hasta su utilización.

#### **4.5.2 PCR *Multiplex***

El ADN obtenido se utilizó como templado para realizar la amplificación de los genes quitina sintetasa y el espaciador transcripcional interno 1 y 2 (ITS1-2) mediante una PCR *multiplex*. Se utilizaron tres pares de iniciadores, previamente reportados en el 2013 por Dhib y cols. (48). En la **Tabla 3** se muestra las secuencias y el tamaño esperado de los amplicones.

**TABLA 3**

SECUENCIA DE INICIADORES UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DERMATOFITOS POR PCR *MULTIPLEX* BASADOS EN EL GEN QUITINA SINTETASA 1 Y GEN ITS 1-2

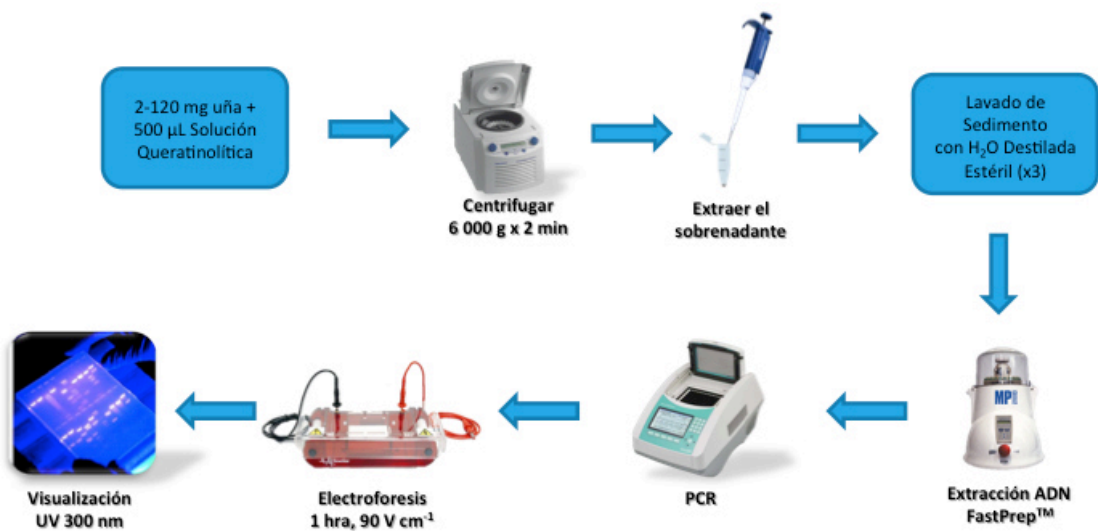
<b>Nombre del Iniciador</b>	<b>Secuencia Nucleotídica</b>	<b>Gen</b>	<b>Amplicón (pb)</b>
Derm F	5'-GAA GCC TGG AAG AAG ATT GTC G-3'	Quitina Sintetasa 1	432
Derm R	5'-CCT TGA TTT CAC CGC AGG-3'		
TR F	5'-CCC CCC ACG ATA GGG ACC G-3'	ITS 1-2	214
TR R	5'-GAC TGA CAG CTC TTC AGA GAA TT-3'		
TM F	5'-GCC CCC CAC GAT AGG GCC AA-3'	ITS 1-2	132
TM R	5'-CTC GCC GAA CGG CTC TCC TG-3'		

La concentración de cada iniciador se ajustó a 1 µg/µL; y posteriormente se hicieron soluciones *stock* de cada par de iniciadores compuesto de 12.5 µL del iniciador *forward*, 12.5 µL del iniciador *reverse* y 225 µL de agua libre de nucleasas (Nuclease-Free Water, IDT®) para utilizarse como soluciones de trabajo. La mezcla de reacción de volumen final de 25 µL estuvo conformada de la siguiente manera: 2.5 µL de ADN fúngico (50-120 ng/µL), 2.5 µL de cada par de iniciadores (DERM, TR y TM), 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp. WI, USA) y se ajustó a 25 µL con agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación de la PCR *multiplex* fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 minutos a 95 °C para la desnaturalización inicial, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 60 °C por 30



segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos. La extensión final fue a 72 °C por 10 minutos.

Finalmente se montó una electroforesis convencional en un gel de agarosa (Invitrogen™, CA, USA) al 2% teñido con bromuro de etidio (2 µg/mL), con la finalidad de verificar, tras observar el gel a través de un transiluminador UV a 365 nm, la presencia de los amplicones esperados: 432, 214 y 132 pb. Se utilizaron controles positivos y negativos en todos los ensayos.



**Figura 1.** Metodología para la Extracción de ADN e Identificación Molecular de Dermatofitos en Muestras de Uñas.

#### 4.6 Susceptibilidad Antifúngica *in vitro*

Los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* se efectuaron siguiendo el método de microdilución en placa, de acuerdo con los lineamientos estipulados en el documento M38-A2 del CLSI® de los Estados Unidos de América (46). En la **Figura 2** se esquematiza la metodología para la prueba de susceptibilidad *in vitro*.

#### 4.6.1 Agentes Antifúngicos

Los siguientes cinco agentes antifúngicos fueron evaluados en el estudio: ciclopirox (Fluka® Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO USA), fluconazol (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO USA  $\geq 98\%$  (HPLC)), itraconazol (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO USA  $\geq 98\%$  (HPLC)), terbinafina (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO USA  $\geq 98\%$  (HPLC)) y voriconazol (VFEND® Pfizer Inc., NY, USA).

Se prepararon soluciones *stock* para cada uno de los antifúngicos utilizando DMSO (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO USA) como disolvente, a excepción de fluconazol, con el cual se utilizó agua bidestilada estéril. Luego se hicieron alícuotas de 1.2 mL y se almacenaron en congelación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Para realizar las diluciones, se descongeló una alícuota del antifúngico y se efectuaron diluciones seriadas en tubos de centrifugación de 50 mL, haciendo una dilución 1:50 utilizando medio RPMI-1640 con glutamina y sin bicarbonato (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO USA) amortiguado con MOPS (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO USA) a un pH de 7. Posteriormente se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones en las placas de poliestireno de 96 pocillos, fondo redondo y claro (Costar® 3788, Corning, NY, USA). En el pocillo que correspondía al control de crecimiento únicamente se depositaron 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI-1640 (sin antifúngico) y en el pocillo que correspondía al control de esterilidad se depositaron 200  $\mu\text{L}$  de medio RPMI-1640 (sin antifúngico). Cada placa de 96 pocillos contenía las 10 diluciones de un antifúngico y los controles de crecimiento y esterilidad. Finalmente las placas se rotularon y se almacenaron en congelación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El rango de las

concentraciones que se manejó para los antifúngicos utilizados fue el siguiente: 0.06-32 µg/mL para ciclopirox, 0.125-64 µg/mL para fluconazol y 0.001-0.5 µg/mL para itraconazol, terbinafina y voriconazol.

#### **4.6.2 Preparación del Inóculo**

Para determinar la susceptibilidad antifúngica *in vitro* se utilizaron 28 cepas de dermatofitos, de las cuales 14 pertenecían a la especie *Trichophyton rubrum* y las otras 14 a *Trichophyton mentagrophytes*. Dichas cepas estaban almacenadas en congelación a -80 °C y fueron sembradas en agar papa dextrosa (DIFCO™ Potatoe Dextrose Agar, Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD USA), a excepción de las 14 cepas de *Trichophyton rubrum* que se sembraron en agar avena. Todas las cepas se incubaron a 30 °C durante dos semanas o hasta la obtención de suficiente cantidad de microconidias, observadas al realizar un examen directo con cinta adhesiva y azul de algodón. Una vez transcurrido el tiempo necesario de incubación, se procedió a la recolección de las microconidias de cada uno de los cultivos. Se humedeció un hisopo y se procedió a hacer un raspado delicado de las colonias para luego introducir el hisopo nuevamente al tubo de microcentrifugación y agitar el hisopo para desprender las microconidias en la solución salina. La suspensión de microconidias se dejó precipitar durante 10-20 minutos y el sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrifugación para finalmente tomar 10 µL de ésta suspensión y colocarlas en el hematocitómetro (Bright-Line™, Cambridge Instruments Inc., NJ, USA) para realizar el conteo de microconidias y ajustar la concentración a 3,000 UFC/mL.

#### 4.6.3 Prueba de Microdilución en Placa

Para llevar a cabo el método de microdilución en placa, primero se descongelaron las placas de poliestireno con las diluciones del antifúngico. Luego se colocó la suspensión del inóculo, previamente ajustado, en reservorios estériles y con ayuda de pipeta manual multicanal se depositaron, por duplicado, 100  $\mu$ L en los pocillos con las diluciones del antifúngico y en el pocillo del control de crecimiento. Las placas inoculadas se incubaron a 35 °C sin agitación y pasadas las 96 horas se efectuaron las lecturas, con ayuda de espejo invertido, para el 80% de inhibición de crecimiento fúngico.

La CMI se definió como la concentración mas baja del agente antifúngico que sustancialmente inhibió el crecimiento del hongo.

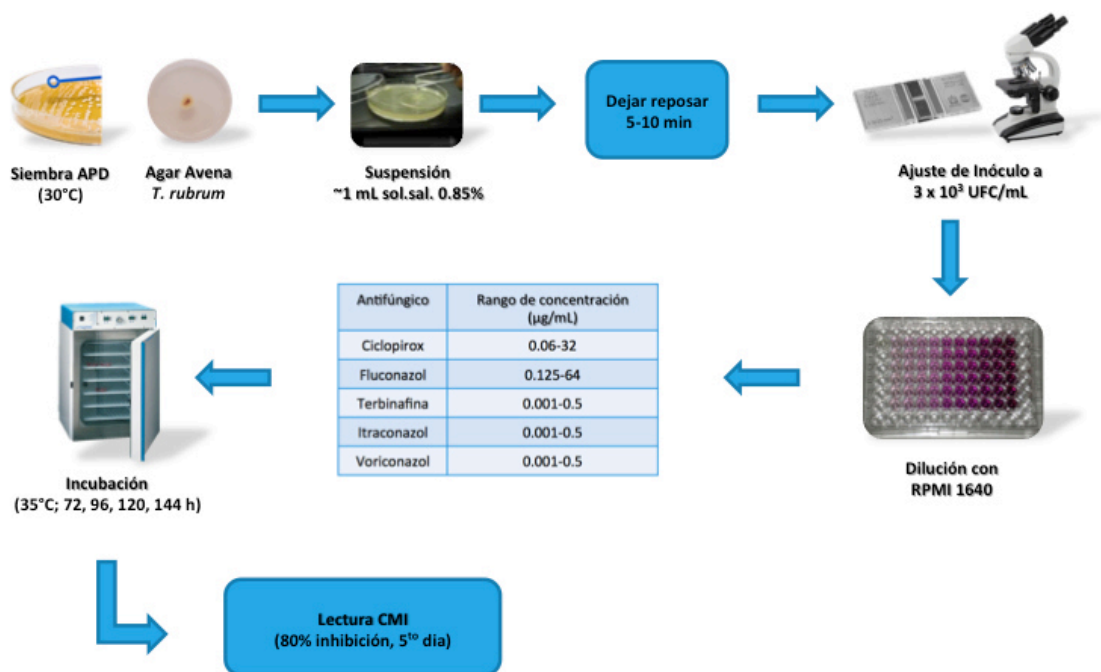
Para el control de calidad se emplearon las cepas: *Trichophyton rubrum* ATCC® MYA4438™ y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® MYA4439™. Los rangos de las CMI's recomendadas para las cepas control en las pruebas de susceptibilidad para los antifúngicos se muestran en la **Tabla 4**.

**TABLA 4**

**RANGOS DE CMI ESTABLECIDOS POR EL CLSI® PARA LAS CEPAS CONTROL**

<b>Organismo</b>	<b>Agente Antifúngico</b>	<b>Rango CMI (µg/mL)</b>
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC® MYA4438™	Ciclopirox	0.5-2
	Fluconazol	0.5-4
	Voriconazol	0.008-0.06
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC® MYA4439™	Ciclopirox	0.5-2
	Itraconazol	0.03-0.25
	Terbinafina	0.002-0.008
	Voriconazol	0.03-0.25

Se calculó el rango, media geométrica (MG), CMI<sub>50%</sub> y CMI<sub>90%</sub> de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad.



**Figura 2.** Metodología para el Ensayo de Susceptibilidad Antifúngica *in vitro*.

## 4.7 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis descriptivo y se cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo utilizando al cultivo como estándar de oro. La asociación del KOH-DMSO y PCR *multiplex* con el estándar de oro se determinó con la prueba exacta de Fisher de dos colas. Un valor de *alpha* <0.05 se consideró como estadísticamente significativo.

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la distribución de los datos de la susceptibilidad antifúngica resultaron ser no paramétricos, por lo cual los valores de CMI se compararon con la prueba U de Mann-Whitney y finalmente se analizaron los datos con la prueba de Kruskal-Wallis, todo esto realizado en el programa SPSS®.

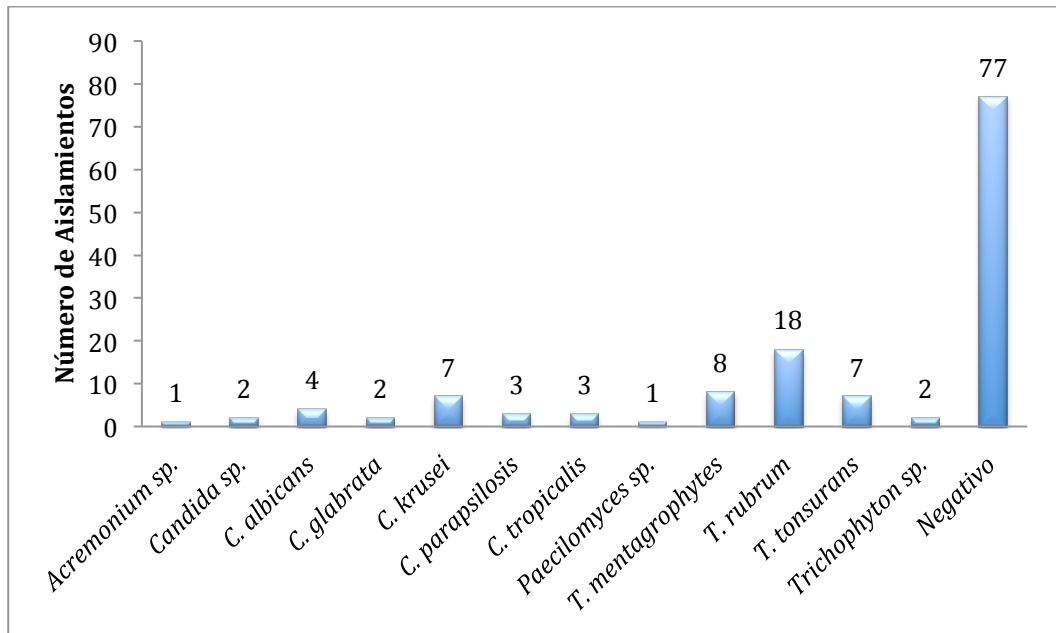
## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS

#### 5.1 Identificación Convencional

De las 135 muestras clínicas estudiadas, 63% eran de mujeres y 37% de hombres. En cuanto a la distribución por región afectada, 91% eran muestras de uñas del pie, mientras que 9% fueron uñas de la mano.

Se observaron filamentos fúngicos en las preparaciones de KOH-DMSO en 122 de 135 especímenes (90%). En la **Figura 3** se muestra la distribución de hongos aislados por cultivo de pacientes con sospecha de onicomicosis. El agente fúngico que se aisló con mayor frecuencia fue *Trichophyton rubrum* (n=18), seguido de *Trichophyton mentagrophytes* (n=8) y *Trichophyton tonsurans* (n=7) por último, del grupo de dermatofitos. En el grupo de las levaduras, *Candida krusei* (n=7) fue la más frecuente, seguido de *Candida albicans* (n=4). De los hongos filamentosos se aisló uno de *Acremonium* sp. y uno de *Paecilomyces* sp.. Setenta y siete (57%) cultivos fueron negativos.

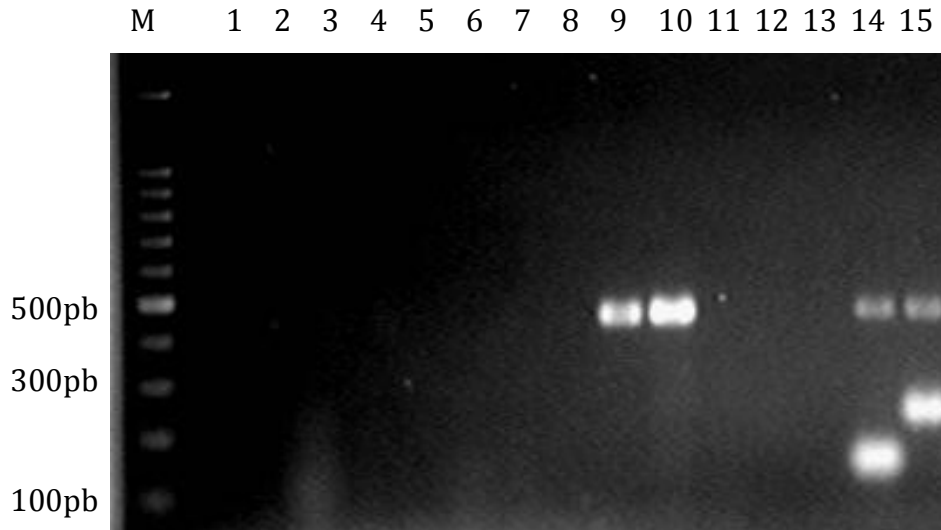


**Figura 3. Hongos aislados por cultivo de pacientes con Sospecha de Onicomicosis.** Total de hongos aislados: 58; cultivos negativos: 77 (n=135).

## 5.2 Identificación Molecular

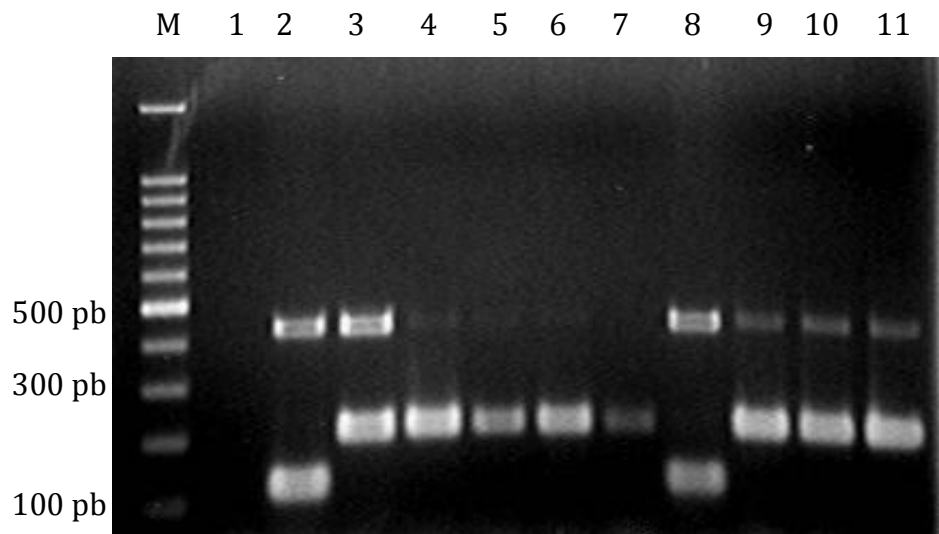
En la **Figura 4** se presenta un gel de agarosa 2%, donde se observa la amplificación del ADN extraído de cultivos de 5 hongos filamentosos, 5 levaduras, y 4 dermatofitos utilizados para evaluar la especificidad de los iniciadores utilizando una PCR *multiplex*. No se obtuvo amplificación para los hongos filamentosos ni las levaduras con los tres pares de iniciadores (Derm, TR y TM). Las especies *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum* presentaron amplificación únicamente con los iniciadores Derm (432 pb). La cepa *Trichophyton rubrum* ATCC® MYA4438™ presentó amplificación con los iniciadores Derm y TR, con tamaño de banda de 432 y 214 pb respectivamente. La cepa *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® MYA4439™ presentó amplificación con los iniciadores Derm y TM, con tamaño de banda de 432 y 132 pb respectivamente.





**Figura 4. Resultados de PCR *multiplex* para especies de dermatofitos, levaduras y hongos filamentosos (cepas de referencias y aislados clínicos).** M: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 1: control negativo; carril 2: *Acremonium* sp.; carril 3: *C. albicans*; carril 4: *C. glabrata*; carril 5: *C. krusei*; carril 6: *C. parapsilosis*; carril 7: *C. tropicalis*; carril 8: *Fusarium* sp.; carril 9: *M. canis*; carril 10: *M. gypseum*; carril 11: *Paecilomyces* sp; carril 12: *Pseudallescheria boydii*; carril 13: *Scopulariopsis brevicaulis*; carril 14: *T. mentagrophytes* ATCC®; carril 15: *T. rubrum* ATCC®.

En la **Figura 5** se muestra un gel de agarosa 2% donde se muestra los amplicones obtenidos de 8 muestras de uñas con onicomicosis, dos cepas control y control negativo. No en todas las cepas se observó la banda de 432 pb, o ésta fue muy tenue, a pesar de presentar la banda de 214 o 132 pb, confirmando que es un dermatofito. Las muestras que presentaron las bandas de 214 o 132 pb fueron sometidas a PCR convencional con los iniciadores Derm, obteniéndose un resultado positivo.



**Figura 5. Resultado de PCR *multiplex* de muestras clínicas, control negativo y positivo.** M: marcador de peso molecular de 100 pb; carril 1: control negativo; carril 2: *T. mentagrophytes* ATCC®; carril 3: *T. rubrum* ATCC®; carril 4: *T. rubrum*; carril 5: *T. rubrum*; carril 6: *T. rubrum*; carril 7: *T. rubrum*; carril 8: *T. mentagrophytes*; carril 9: *T. rubrum*; carril 10: *T. rubrum*; carril 11: *T. rubrum*.

### 5.3 Identificación Convencional *versus* Molecular

Los resultados del estudio micológico de las 135 muestras de uñas se muestran en la **Tabla 5**. Por microscopía directa (KOH-DMSO) 119 (88%) de ellas fueron positivas, mientras que 59 (44%) fueron positivas para el cultivo. De las 119 muestras positivas con KOH-DMSO, 65 fueron negativas en el cultivo, mientras que 19 se identificaron como *T. rubrum*, 8 como *T. mentagrophytes*, 7 como *T. tonsurans* y 2 *Trichophyton* sp.. En 17 de ellas se aislaron colonias de levaduras, y se identificaron 2 como *Candida* sp., 4 como *C. albicans*, 2 como *C. glabrata*, 7 como *C. krusei*, 3 como *C. parapsilosis* y 3 como *C. tropicalis*. En dos de ellas se aislaron hongos filamentosos: *Paecilomyces* sp. y *Acremonium* sp.. Todas las muestras tomadas de uñas sanas (n=5) fueron negativas en el KOH-DMSO y en el cultivo. No se identificaron infecciones mixtas por cultivo.

En cuanto al análisis de las muestras ungueales por PCR *multiplex*, ésta fue positiva en 83 (61%) muestras ungueales de las 135 estudiadas. Del total de muestras positivas en la PCR *multiplex*, 82 (99%) correspondieron a *T. rubrum* y 1 (1%) a *T. mentagrophytes*. En ninguna de las muestras se obtuvo amplificación únicamente con los iniciadores Derm. De los 76 cultivos negativos, 35 dieron resultado positivo en la PCR *multiplex* con los iniciadores TR y 1 con los iniciadores TM. Sesenta y cinco de esas muestras fueron positivas para KOH-DMSO. Las siguientes muestras que fueron identificadas por manera convencional como *Candida sp.*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Paecilomyces sp.*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* y *Trichophyton sp.*, mostraron amplificación en la PCR *multiplex* con los iniciadores TR, con una frecuencia de 2, 1, 1, 6, 2, 2, 1, 7, 6 y 2 respectivamente.

**TABLA 5**

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN DE HONGOS POR KOH-DMSO, CULTIVO Y PCR *MULTIPLEX* DE UÑAS CON SOSPECHA DE ONICOMICOSIS

Organismos en Cultivo	KOH-DMSO*		Cultivo		PCR Multiplex			
	+	-	+	-	-	Derm <sup>1</sup>	TR <sup>2</sup>	TM <sup>3</sup>
<i>Acremonium sp.</i>	1	0	1	NA**	1	0	0	0
<i>Candida sp.</i>	2	0	2	NA	0	0	2	0
<i>C. albicans</i>	2	2	4	NA	3	0	1	0
<i>C. glabrata</i>	1	1	2	NA	1	0	1	0
<i>C. krusei</i>	6	1	7	NA	1	0	6	0
<i>C. parapsilosis</i>	3	0	3	NA	1	0	2	0
<i>C. tropicalis</i>	3	0	3	NA	1	0	2	0
<i>Paecilomyces sp.</i>	1	0	1	NA	0	0	1	0
<i>T. mentagrophytes</i>	8	0	8	NA	1	0	7	0
<i>T. rubrum</i>	18	1	19	NA	2	0	17	0
<i>T. tonsurans</i>	7	0	7	NA	1	0	6	0
<i>Trichophyton sp.</i>	2	0	2	NA	0	0	2	0
Negativo	65	11	NA	76	40	0	35	1
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>16</b>	<b>59</b>	<b>76</b>	<b>52</b>	<b>0</b>	<b>82</b>	<b>1</b>

\*KOH-DMSO positivo para hifas

\*\*No Aplica

<sup>1</sup>Derm: Amplifica el gen quitina sintetasa 1 y produce una banda de 432 pb

<sup>2</sup>TR: Amplifica el gen ITS 1 y 2, y produce una banda de 214 pb

<sup>3</sup>TM: Amplifica el gen ITS 1 y 2, y produce una banda de 132 pb

En la **Tabla 6** se muestra el análisis de la validez y seguridad de las pruebas KOH-DMSO, Cultivo y PCR *multiplex*. El KOH-DMSO mostró, al compararlo con el cultivo, una sensibilidad de 92%, una especificidad del 14% y valor predictivo positivo y negativo de 45% y 69% respectivamente ( $P=0.4216$ ). Mientras que la PCR *multiplex* mostró, al compararla con el cultivo, una sensibilidad de 80%, especificidad de 53%, y valores predictivos positivo y negativo de 57% y 77% respectivamente ( $P=0.0002$ ).

**TABLA 6**

ANÁLISIS COMPARATIVO DE KOH, CULTIVO Y PCR *MULTIPLEX* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DERMATOFITOS EN UÑAS (N=135)

	<b>Cultivo Positivo (59)</b>	<b>Cultivo Negativo (76)</b>	<b>S<sup>1</sup> (IC*)</b>	<b>E<sup>2</sup> (IC)</b>	<b>VPP<sup>3</sup> (IC)</b>	<b>VPN<sup>4</sup> (IC)</b>
<b>KOH positivo (119)</b>	54	65	92% (0.81-0.97)	14% (0.07-0.24)	45% (0.36- 0.54)	69% (0.41- 0.89)
<b>KOH negativo (16)</b>	5	11				
<b>PCR MX<sup>5</sup> Positiva (83)</b>	47	36	80% (0.67-0.89)	53% (0.41-0.64)	57% (0.45- 0.67)	77% (0.63- 0.87)
<b>PCR MX<sup>5</sup> Negativa (52)</b>	12	40				

<sup>1</sup>S: Sensibilidad  
<sup>2</sup>E: Especificidad  
<sup>3</sup>VPP: Valor Predictivo Positivo  
<sup>4</sup>VPN: Valor Predictivo Negativo  
<sup>5</sup>PCR MX: PCR *Multiplex*  
\* IC: Intervalo de confianza

#### 5.4 Susceptibilidad Antifúngica *in vitro*

La actividad *in vitro* reportada en rangos de CMI, MG, CMI 50% (CMI<sub>50</sub>) y CMI 90% (CMI<sub>90</sub>) de ciclopirox, fluconazol, itraconazol, terbinafina y voriconazol para las 14 cepas de *Trichophyton rubrum* y 14 de *Trichophyton mentagrophytes*, se muestran en la **Tabla 7**.

Tanto para las especies de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, terbinafina fue el que presentó una mejor actividad antifúngica de todos los fármacos probados ( $P < 0.0001$ ). En ambas especies, el que presentó menor actividad antifúngica de todos los fármacos probados fue fluconazol ( $P < 0.0001$ ). No hubo diferencia en cuanto a la susceptibilidad de los antifúngicos ensayados para las cepas de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* ( $P > 0.05$ ), es decir que todos los fármacos presentaron el mismo patrón de susceptibilidad en ambas cepas estudiadas.

**TABLA 7**

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *T. rubrum* Y *T. mentagrophytes* A CICLOPIROX, FLUCONAZOL, ITRACONAZOL, TERBINAFINA Y VORICONAZOL.

Especie (n)	Antifúngico	CMI $\mu\text{g/ml}$			
		Rango	MG <sup>a</sup>	50% <sup>b</sup>	90% <sup>c</sup>
<b><i>Trichophyton rubrum</i> (14)</b>	Ciclopirox	0.25-0.5	0.476	0.5	0.5
	Fluconazol	0.5-16	2.208	2	8
	Itraconazol	0.06-0.25	0.195	0.25	0.25
	Terbinafina	0.004-0.008	0.007	0.008	0.008
	Voriconazol	0.008-0.125	0.033	0.03	0.125
<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i> (14)</b>	Ciclopirox	0.25-0.5	0.431	0.5	1
	Fluconazol	0.5-16	1.767	1	4
	Itraconazol	0.008-0.25	0.128	0.125	0.25
	Terbinafina	0.002-0.02	0.006	0.004	0.008
	Voriconazol	0.002-0.125	0.022	0.02	0.06

a. Media Geométrica  
b. CMI en el cual 50% de los aislamientos fueron inhibidos  
c. CMI en el cual 90% de los aislamientos fueron inhibidos

## CAPÍTULO 6

### DISCUSIÓN

El diagnóstico correcto de las onicomicosis y la identificación del agente causal es de suma importancia ya que permite que se instale un tratamiento antifúngico apropiado. Actualmente, el diagnóstico se realiza mediante detección de elementos fúngicos por microscopía directa de especímenes clínicos seguida de cultivo *in vitro*. En las características macroscópicas y microscópicas de éste último se basa la identificación precisa del dermatofito. Sin embargo, se han reportado falsos negativos para éstos dos métodos de diagnóstico: 5-15% en la microscopía directa y 15-50% en cultivos (49). Además de esto, se requiere de tiempo prolongado (4 semanas) para que un cultivo presente características suficientes para la identificación (30). En algunas ocasiones, la presencia de hongos filamentosos no dermatofitos, que son de crecimiento rápido, impiden el desarrollo de los dermatofitos en el medio de cultivo, dificultando aún más la probabilidad de aislamiento (29). En los últimos años se han hecho esfuerzos para desarrollar técnicas moleculares rápidas, sensibles y específicas para la identificación de los agentes causales de onicomicosis como posibles alternativas de diagnóstico en los laboratorios clínicos (29, 50).

Por estas razones en el presente estudio se decidió utilizar la técnica de PCR *multiplex* para la identificación (directamente de la muestra clínica) de los

dos agentes causales más comunes de la onicomicosis: *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (8, 9, 19).

En un estudio llevado a cabo en Bulgaria y Grecia, el principal agente fúngico aislado de sus muestras fue *Trichophyton rubrum* (95%) (51). En Suiza (38), España (14) y Argentina (4) también se ha identificado a *Trichophyton rubrum* como el principal agente fúngico de onicomicosis. En nuestro estudio *Trichophyton rubrum* fue el principal agente causal identificado tanto por cultivo (14%) y PCR *multiplex* (61%), seguido de *Trichophyton mentagrophytes*. En un estudio previo llevado a cabo en Monterrey, México (lugar donde se llevó a cabo nuestro estudio) Welsh y cols. detectaron que el 60% de las onicomicosis fueron por *Trichophyton rubrum*, seguido de *Trichophyton mentagrophytes* con 30.9% (17). Éstos reportes demuestran que *Trichophyton rubrum* es el principal agente causal de la onicomicosis en varias regiones, y nuestros resultados concuerdan con ello.

De las 135 muestras con sospecha clínica de onicomicosis estudiadas, 63% eran de mujeres y 37% de hombres, coincidiendo con lo reportado anteriormente por Haghani y cols., quienes obtuvieron un mayor número de muestras procedentes de mujeres (78%) que de hombres (22%) (50). En cuanto a la distribución por región afectada, 91% eran muestras de uñas del pie, mientras que 9% fueron uñas de la mano, coincidiendo con reportes previos (15, 19).

En el análisis de los resultados de PCR *multiplex* del presente estudio, se demuestra la especificidad de la técnica ya que ninguna de las especies de levaduras, hongos filamentosos no-dermatofitos ni controles utilizados, dieron positivo para los iniciadores TR y TM. En cuanto a la sensibilidad, la PCR



*multiplex* mostró ser menos sensible que la microscopía directa (80% vs. 92%), lo cual coincide con el trabajo de Li y cols. quienes obtuvieron una sensibilidad de 93.3% para la PCR *multiplex* y 100% para la microscopía directa (32). Sin embargo, existen varios estudios en los cuales la sensibilidad de la PCR (en sus diferentes modalidades) se ha reportado mayor que en la microscopía directa (28, 36, 48). Cabe mencionar que el cálculo de los parámetros de validez (sensibilidad y especificidad) y seguridad (valor predictivo positivo y valor predictivo negativo) para la PCR *multiplex* es difícil y puede dar lugar a resultados confusos. Si, por ejemplo, en la onicomycosis los resultados del cultivo (como en el presente trabajo) se usan como base para el cálculo de “verdaderos positivos” y “falsos positivos” (p.ej., resultados de cultivo negativo y PCR positivo), esto resulta en valores bajos para la especificidad y valor predictivo positivo. La razón de ello es que los dermatofitos procedentes de muestras ungueales no se pueden cultivar hasta en un 50%, a pesar de que se detecte presencia fúngica en la microscopía directa y en la PCR (25).

Un porcentaje elevado de muestras (47%) que fueron positivas en la PCR *multiplex*, fueron negativas en el cultivo. Se ha reportado que la razón de esto podría deberse a que el paciente haya estado bajo algún tratamiento antifúngico previo (35, 48), a una toma de muestra inadecuada o a una cantidad insuficiente de inóculo en la muestra (35, 40, 51) que impida su desarrollo en un medio de cultivo. En cambio, la PCR *multiplex* fue falsamente negativa en 4 muestras que fueron identificadas por cultivo como *Trichophyton rubrum* (2), *Trichophyton mentagrophytes* (1) y *Trichophyton tonsurans* (1). Una razón de esto podría ser la presencia de inhibidores en la reacción de PCR. Otras razones incluyen una pared celular fúngica robusta que impide la liberación de ADN o error en la

distribución de las porciones de las uñas para microscopía directa, cultivo y el material que se dejó para la PCR *multiplex* no contenía la cantidad suficiente de elementos fúngicos para ser detectado (27, 28).

Treinta especies que fueron identificadas por cultivo como *Candida sp.* (2), *C. albicans* (1), *C. glabrata* (1), *C. krusei* (6), *C. parapsilosis* (2), *C. tropicalis* (2), *Paecilomyces sp.* (1), *T. mentagrophytes* (7), *T. tonsurans* (6) y *Trichophyton sp.* (2), mostraron amplificación en la PCR *multiplex* con los iniciadores TR. En cuanto a las levaduras y *Paecilomyces sp.*, se realizó PCR *multiplex* de cultivos de cada uno de ellos y ninguno presentó amplificación los 3 pares de iniciadores empleados en la PCR *multiplex* (**Figura 4**), por lo que no puede tratarse de una inespecificidad de los iniciadores. La interpretación de la presencia de hongos no-dermatofitos en muestras de uñas está sujeto a controversia. La presencia de ellos puede deberse a colonización temporal o contaminación en el laboratorio (27, 30). Se requeriría entonces aislamientos múltiples del mismo hongo en diferentes ocasiones para poder considerarlo el agente causal (30, 52, 53). El hecho de que en éste estudio 15 muestras fueron positivas por cultivo para hongos no-dermatofitos, pero positivos para *Trichophyton rubrum* en la PCR *multiplex*, podría indicar un rápido crecimiento del hongo colonizante que inhibe el crecimiento del dermatofito o una verdadera doble infección (47, 54). La razón por la que las muestras identificadas por cultivo como *Trichophyton mentagrophytes* (7) y *Trichophyton tonsurans* (6), pero que en la PCR *multiplex* dieron positivo para *Trichophyton rubrum* podría deberse a un error en la clasificación debido a la similaridad morfológica, variabilidad y pleomorfismo que presentan los dermatofitos (55). Hasta el momento, únicamente con la secuenciación se pueden diferenciar todas las especies de forma precisa (56).

Al compararlo con el cultivo fúngico, éste ensayo de PCR *multiplex* ha demostrado tener mayor positividad en los resultados. Es un procedimiento relativamente sencillo de realizar y con un tiempo de respuesta mucho más corto que el cultivo. Ésta técnica de PCR *multiplex* puede ser empleada como una herramienta diagnóstica complementaria a la microscopía directa y cultivo fúngico en pacientes con sospecha de onicomicosis, al identificar los dos agentes etiológicos fúngicos más comunes. Esto brindaría al clínico más confianza en el diagnóstico y por ende en el tratamiento de los pacientes.

Los fármacos de elección para combatir las infecciones ungueales por dermatofitos son ciclopirox, itraconazol, terbinafina y fluconazol (57). El voriconazol es un triazol de amplio espectro que, a pesar de no ser tratamiento de primera línea para las dermatomicosis, es una alternativa para las enfermedades invasivas en pacientes inmunosuprimidos (44). En el presente trabajo se evaluó la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de ciclopirox, terbinafina y los azoles: fluconazol, itraconazol y voriconazol contra *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, siguiendo el protocolo establecido por el CLSI en el 2008 (46) para los dermatofitos. A partir de ese año se han hecho estudios de susceptibilidad antifúngica en dermatofitos de una forma estandarizada, permitiendo comparar resultados entre los estudios.

Los resultados de la susceptibilidad antifúngica obtenidos en el presente trabajo mostraron que terbinafina fue la droga más efectiva ( $P < 0.0001$ ) para inhibir el crecimiento de *Trichophyton rubrum* (CMI<sub>90</sub> 0.008 µg/ml) y *Trichophyton mentagrophytes* (CMI<sub>90</sub> 0.008 µg/ml), coincidiendo con lo reportado anteriormente por Tamura y cols. (58) y Carrillo-Muñoz y cols. (59). En cambio, Shehata y cols. reportaron CMI<sub>90</sub> mayores de terbinafina para

*Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, de 2 y 0.06 µg/ml respectivamente; pero terbinafina también fué el antifúngico con menores CMI en el panel de drogas que ellos estudiaron (60). Fluconazol fue el antifúngico con menor actividad en ambas especies. En México, Robledo-Leal y cols. reportaron una CMI<sub>90</sub> de 4 µg/ml de fluconazol para *Trichophyton rubrum*, menor a la obtenida en el presente estudio (8 µg/ml), pero mayor para *Trichophyton mentagrophytes* (16 µg/ml) en comparación con las obtenidas en éste trabajo (4 µg/ml) (61). En otro estudio, Manzano-Gayosso y cols., utilizaron el método E-test® para determinar la susceptibilidad antifúngica de 36 aislamientos de dermatofitos, reportando 3 aislamientos de *Trichophyton mentagrophytes* y 2 de *Trichophyton rubrum* resistentes a fluconazol y un aislamiento de *Trichophyton rubrum* resistente a ketoconazol, itraconazol y fluconazol(62). Para el antifúngico ciclopirox, se obtuvieron rangos, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> similares a estudios reportados anteriormente (60, 63). Los rangos de CMI de itraconazol para *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* fueron de 0.06-0.25 y 0.008-0.25 µg/ml, respectivamente. Éstos valores son menores a los que reportaron Silva y cols. (44), pero similares a los reportados por Yenişehirli y cols. (64) para ambas cepas.

Como se puede apreciar, al comparar con otros estudios, los resultados de susceptibilidad a los antifúngicos para *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* no son constantes. Ésta variabilidad interlaboratorio que aún hay, a pesar de que ya existe el protocolo de susceptibilidad antifúngica para dermatofitos (46), podría deberse a que los autores siguen modificando temperaturas de incubación (44, 59), el tipo de placa (44), la concentración y

forma de ajustar el inóculo (44, 58, 59), las cepas control (59, 64); haciendo que los resultados sean difíciles de comparar.

Los rangos de CMI para los antifúngicos ciclopirox y terbinafina contra *Trichophyton* spp. fueron relativamente menores comparados con los rango de los azoles (fluconazol, itraconazol y voriconazol). Aunque aún no se ha comprobado, una posible explicación a esto podría ser los múltiples mecanismos de acción que el ciclopirox tiene (19) y al efecto fungicida y fungistático de la terbinafina (2).

El presente trabajo es de los pocos que hay hasta la fecha, tanto a nivel nacional como internacional, en el cual si se toman en cuenta todos los lineamientos establecidos por el CLSI® (46) para la determinación de susceptibilidad antifúngica de los dermatofitos. Aún no existen puntos de corte establecidos para los antifúngicos por la falta de estudios de correlación clínica y susceptibilidad *in vitro*; por lo que la relevancia clínica de los estudios *in vitro* de dermatofitos hasta ahora reportados permanecen debatibles. Se espera que en un futuro cercano y a medida que haya más interés en las dermatofitosis (especialmente onicomycosis) por parte de los investigadores y micólogos se puedan esclarecer éstos puntos.

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSIONES

*Trichophyton rubrum* fue la especie más frecuente aislada tanto por el método convencional como por PCR *multiplex*. El tiempo de identificación de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* por PCR *multiplex* se acortó al extraer el ADN directamente de las muestras clínicas. La PCR *multiplex* empleada en el presente estudio fue de mayor sensibilidad que el cultivo en identificar dermatofitos, y puede ser considerada como un complemento al diagnóstico de onicomycosis causada por *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Las cepas de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* sometidas a susceptibilidad antifúngica *in vitro* presentaron patrones similares de inhibición entre si con los antifúngicos ciclopirox, itraconazol, terbinafina y voriconazol. La terbinafina fue el antifúngico más efectivo para inhibir el crecimiento *in vitro* de ambas especies con una CMI<sub>90</sub> de 0.008µg/ml (p<0.0001). El fluconazol fue el antifúngico menos efectivo para inhibir el crecimiento *in vitro* de ambas especies con una CMI<sub>90</sub> de 8µg/ml para *Trichophyton rubrum* y de 4µg/ml para *Trichophyton mentagrophytes* (p<0.0001).

## CAPÍTULO 8

### PERSPECTIVAS

Como perspectivas del presente trabajo están el:

- Secuenciar cepas para mejorar la validez (Sensibilidad y Especificidad) y la seguridad (Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo) de la PCR Multiplex como prueba diagnóstica.
- Realizar estudios de correlación entre la susceptibilidad antifúngica *in vitro* de los dermatofitos y la respuesta clínica a esos antifúngicos en los pacientes con onicomicosis, ya que ayudaría a establecer puntos de corte.
- Comparar la actividad combinada *in vitro* de antifúngicos para buscar efectos aditivos o sinergia farmacológica en el tratamiento de la onicomicosis.

## **CAPÍTULO 9**

### **REFERENCIAS**

1. Thomas J, Jacobson GA, Narkowicz CK, Peterson GM, Burnet H, Sharpe C. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2010;35(5):497-519.
2. Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E. Onychomycosis. *Clinics in dermatology*. 2010 Mar 4;28(2):151-9. PubMed PMID: 20347657.
3. Chanussot C, Arenas R. Infección micótica plantar e interdigital en pacientes con onicomiosis. *Revista iberoamericana de micología*. 2007;24(2):118-21.
4. Nazar JR, Gerosa PE, Díaz OA. Onicomiosis: epidemiología, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio; Onychomycoses: epidemiology, causative agents and assessment of diagnostic laboratory methods. *Rev argent microbiol*. 2012;44(1):0-.
5. Shemer A, Gupta AK, Farhi R, Daigle D, Amichai B. When is Onychomycosis, Onychomycosis? *British Journal of Dermatology*. 2014;n/a-n/a.
6. Gelotar P, Vachhani S, Patel B, Makwana N. The prevalence of fungi in fingernail onychomycosis. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2013 Feb;7(2):250-2. PubMed PMID: 23543802. Pubmed Central PMCID: PMC3592285. Epub 2013/04/02. eng.



7. Bonifaz A. *Micologia medica basica*. 4 ed: McGraw-Hill; 2012.
8. Nenoff P, Kruger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ. Mycology - an update. Part 1: Dermatophytes: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2014 Mar;12(3):188-209; quiz 10, 188-211; quiz 2. PubMed PMID: 24533779. Epub 2014/02/19. eng.
9. Ghannoum M, Isham N. Fungal nail infections (onychomycosis): a never-ending story? *PLoS pathogens*. 2014 Jun;10(6):e1004105. PubMed PMID: 24901242. Pubmed Central PMCID: 4047123.
10. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clinical microbiology reviews*. 1995 Apr;8(2):240-59. PubMed PMID: 7621400. Pubmed Central PMCID: PMC172857. Epub 1995/04/01. eng.
11. White TC, Oliver BG, Graser Y, Henn MR. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryotic cell*. 2008 Aug;7(8):1238-45. PubMed PMID: 18539886. Pubmed Central PMCID: 2519771.
12. Peres NT, Maranhao FC, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2010 Sep-Oct;85(5):657-67. PubMed PMID: 21152790.
13. Chan HH, Wong ET, Yeung CK. Psychosocial perception of adults with onychomycosis: a blinded, controlled comparison of 1,017 adult Hong Kong residents with or without onychomycosis. *BioPsychoSocial medicine*. 2014;8:15. PubMed PMID: 25057286. Pubmed Central PMCID: 4107486.
14. Perea S, Ramos MJ, Garau M, Gonzalez A, Noriega AR, del Palacio A. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general

population in Spain. *Journal of clinical microbiology*. 2000 Sep;38(9):3226-30. PubMed PMID: 10970362. Pubmed Central PMCID: 87362.

15. Arenas R, Bonifaz A, Padilla MC, Arce M, Atoche C, Barba J, et al. Onychomycosis. A Mexican survey. *European journal of dermatology : EJD*. 2010 Sep-Oct;20(5):611-4. PubMed PMID: 20605771.

16. Arenas R. Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19:63-7.

17. Welsh O, Welsh E, Ocampo-Candiani J, Gomez M, Vera-Cabrera L. Dermatophytoses in monterrey, mexico. *Mycoses*. 2006 Mar;49(2):119-23. PubMed PMID: 16466445.

18. Morales-Mendoza Y, Arenas-Guzmán R. Onicomycosis en pacientes pediátricos: un giro epidemiológico y un reto terapéutico. *Dermatol Rev Mex*. 2012;56(2):115-8.

19. Mendoza N, Palacios C, Cardona N, Gómez LM. Onicomycosis: afección común de difícil tratamiento. *Rev Asoc Colom Dermatol*. 2012;20:149-58.

20. Dasgupta T, Sahu J. Origins of the KOH technique. *Clinics in dermatology*. 2012 Mar-Apr;30(2):238-41; discussion 41-2. PubMed PMID: 22330670.

21. Gupta AK, Simpson FC. Diagnosing onychomycosis. *Clinics in dermatology*. 2013 Sep-Oct;31(5):540-3. PubMed PMID: 24079582.

22. Adamski Z, Kowalczyk MJ, Adamska K, Kubisiak-Rzepczyk H, Bowszyc-Dmochowska M, Banaszak A, et al. The first non-African case of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* or a urease-positive *Trichophyton rubrum* in Central Europe? *Mycopathologia*. 2014 Aug;178(1-2):91-6. PubMed PMID: 24792359. Pubmed Central PMCID: 4097339.

23. Ajello L, Georg L. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 1957 1957/03/01;8(1):3-17. English.
24. Hay RJ, Jones RM. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clinics in dermatology*. 2010 Mar 4;28(2):190-6. PubMed PMID: 20347662.
25. Graser Y, Czaika V, Ohst T. Diagnostic PCR of dermatophytes--an overview. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2012 Oct;10(10):721-6. PubMed PMID: 23013298. Epub 2012/09/28. eng.
26. Litz CE, Cavagnolo RZ. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: a large, single-institute study. *The British journal of dermatology*. 2010 Sep;163(3):511-4. PubMed PMID: 20491764.
27. Chandran NS, Pan JY, Pramono ZA, Tan HH, Seow CS. Complementary role of a polymerase chain reaction test in the diagnosis of onychomycosis. *The Australasian journal of dermatology*. 2013 May;54(2):105-8. PubMed PMID: 23425129.
28. Luk NM, Hui M, Cheng TS, Tang LS, Ho KM. Evaluation of PCR for the diagnosis of dermatophytes in nail specimens from patients with suspected onychomycosis. *Clinical and experimental dermatology*. 2012 Apr;37(3):230-4. PubMed PMID: 22300052.
29. Dhib I, Fathallah A, Charfeddine IB, Meksi SG, Said MB, Slama F, et al. Evaluation of Chitine synthase (CHS1) polymerase chain reaction assay in diagnosis of dermatophyte onychomycosis. *Journal de mycologie medicale*. 2012 Sep;22(3):249-55. PubMed PMID: 23518083.

30. Riaño RP, Arocas JM, Avilés LF, Martínez LI, Menéndez AA, Martín MCG. Diagnóstico de infecciones por dermatofitos en uñas con detección rápida específica de " *Trichophyton rubrum*". Revista Internacional de Ciencias Podológicas. 2011;5(2):9-16.
31. Kim JY, Choe YB, Ahn KJ, Lee YW. Identification of dermatophytes using multiplex polymerase chain reaction. *Annals of dermatology*. 2011 Aug;23(3):304-12. PubMed PMID: 21909200. Pubmed Central PMCID: PMC3162259. Epub 2011/09/13. eng.
32. Li XF, Tian W, Wang H, Chen H, Shen YN, Lv GX, et al. Direct detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis by multiplex polymerase chain reaction-based assay. *European journal of dermatology : EJD*. 2011 Jan-Feb;21(1):37-42. PubMed PMID: 21245019.
33. Garg J, Tilak R, Singh S, Gulati AK, Garg A, Prakash P, et al. Evaluation of pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis. *Journal of clinical microbiology*. 2007 Oct;45(10):3443-5. PubMed PMID: 17699656. Pubmed Central PMCID: 2045349.
34. Monod M, Bontems O, Zaugg C, Lechenne B, Fratti M, Panizzon R. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *Journal of medical microbiology*. 2006 Sep;55(Pt 9):1211-6. PubMed PMID: 16914650.
35. Bagyalakshmi R, Senthivelan B, Therese KL, Murugusundram S, Madhavan HN. Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens. *Indian journal of dermatology*.

2008 Jan;53(1):15-20. PubMed PMID: 19967012. Pubmed Central PMCID: 2784578.

36. Elavarashi E, Kindo AJ, Kalyani J. Optimization of PCR-RFLP Directly from the Skin and Nails in Cases of Dermatophytosis, Targeting the ITS and the 18S Ribosomal DNA Regions. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2013 Apr;7(4):646-51. PubMed PMID: 23730638. Pubmed Central PMCID: 3644436.

37. De Baere T, Summerbell R, Theelen B, Boekhout T, Vaneechoutte M. Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *Journal of medical microbiology*. 2010 Jan;59(Pt 1):48-54. PubMed PMID: 19779030.

38. Bontems O, Hauser PM, Monod M. Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *The British journal of dermatology*. 2009 Oct;161(4):791-6. PubMed PMID: 19558597.

39. Verrier J, Pronina M, Peter C, Bontems O, Fratti M, Salamin K, et al. Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of clinical microbiology*. 2012 Mar;50(3):553-61. PubMed PMID: 22170903. Pubmed Central PMCID: 3295142.

40. Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *Journal of clinical microbiology*. 2007 Apr;45(4):1200-4. PubMed PMID: 17267633. Pubmed Central PMCID: 1865842.

41. Miyajima Y, Satoh K, Uchida T, Yamada T, Abe M, Watanabe S, et al. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton*

mentagrophytes in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *Journal of dermatological science*. 2013 Mar;69(3):229-35. PubMed PMID: 23287391.

42. Gupta AK, Paquet M. Improved efficacy in onychomycosis therapy. *Clinics in dermatology*. 2013 Sep-Oct;31(5):555-63. PubMed PMID: 24079584.

43. Gupta AK, Paquet M, Simpson FC. Therapies for the treatment of onychomycosis. *Clinics in dermatology*. 2013 Sep-Oct;31(5):544-54. PubMed PMID: 24079583.

44. Silva LB, de Oliveira DB, da Silva BV, de Souza RA, da Silva PR, Ferreira-Paim K, et al. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2014 May;28(5):633-40. PubMed PMID: 23556501.

45. Martinez-Rossi NM, Peres NT, Rossi A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*. 2008 Nov-Dec;166(5-6):369-83. PubMed PMID: 18478356.

46. Rex JH, Alexander BD, Andes D, Arthington-Skaggs B, Brown SD, Chaturveli V, et al. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute document M38-A2*. 2 ed. Wayne, Pennsylvania 2008.

47. Robert R, Pihet M. Conventional Methods for the Diagnosis of Dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008 2008/11/01;166(5-6):295-306. English.

48. Dhib I, Fathallah A, Yaacoub A, Hadj Slama F, Said MB, Zemni R. Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophyte nail infections. *Mycoses*. 2014 Jan;57(1):19-26. PubMed PMID: 23734576.
49. Arrese JE, Valverde JC, Pierard GE. Un nuevo enfoque sobre la epidemiología de las onicomycosis. *Revista iberoamericana de micología*. 2005;22(3):163-6.
50. Haghani I, Shokohi T, Hajheidari Z, Khalilian A, Aghili S. Comparison of Diagnostic Methods in the Evaluation of Onychomycosis. *Mycopathologia*. 2013 2013/04/01;175(3-4):315-21. English.
51. Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, Devliotou-Panagiotidou D, Sotiriou E, Graser Y. Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Apr;44(4):1419-27. PubMed PMID: 16597871. Pubmed Central PMCID: 1448676.
52. Tchernev G, Penev PK, Nenoff P, Zisova LG, Cardoso JC, Taneva T, et al. Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches. *Wien Med Wochenschr*. 2013 2013/01/01;163(1-2):1-12. English.
53. Borman A, Johnson E. Interpretation of Fungal Culture Results. *Curr Fungal Infect Rep*. 2014 2014/12/01;8(4):312-21. English.
54. Brasch J. Diagnosis of Dermatophytosis. *Curr Fungal Infect Rep*. 2014 2014/09/01;8(3):198-202. English.
55. Kanbe T. Molecular Approaches in the Diagnosis of Dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008 2008/11/01;166(5-6):307-17. English.

56. Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The New Species Concept in Dermatophytes—a Polyphasic Approach. *Mycopathologia*. 2008 2008/11/01;166(5-6):239-56. English.
57. Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Cardenes D, Hernandez-Molina JM, Eraso E, Quindos G, et al. Terbinafine susceptibility patterns for onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *International journal of antimicrobial agents*. 2008 Jun;31(6):540-3. PubMed PMID: 18367383.
58. Tamura T, Asahara M, Yamamoto M, Yamaura M, Matsumura M, Goto K, et al. In vitro susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. *Microbiology and immunology*. 2014 Jan;58(1):1-8. PubMed PMID: 24215461.
59. Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Cárdenes D, Rojas F, Giusiano G. Influencia del grupo ecológico sobre la sensibilidad in vitro de los hongos dermatofitos a los antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013;30(2):130-3.
60. Shehata AS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison between the standardized clinical and laboratory standards institute M38-A2 method and a 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-[(Sulphenylamino)Carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide- based method for testing antifungal susceptibility of dermatophytes. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Nov;46(11):3668-71. PubMed PMID: 18832129. Pubmed Central PMCID: PMC2576611. Epub 2008/10/04. eng.
61. Robledo-Leal E, Elizondo-Zertuche M, Gonzalez GM. Susceptibility of Dermatophytes to Thiabendazole Using CLSI Broth Macrodilution. *ISRN dermatology*. 2012;2012:351842. PubMed PMID: 23008781. Pubmed Central PMCID: 3449124.



62. Mendez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Velasquez-Hernandez V, Millan-Chiu B, Hernandez-Hernandez F, Mondragon-Gonzalez R, et al. [Resistance to azolic compounds in clinical *Trichophyton* spp. strains]. *Rev Iberoam Micol.* 2007 Dec 31;24(4):320-2. PubMed PMID: 18095769. Epub 2007/12/22. Resistencia a compuestos azolicos de aislamientos clinicos de *Trichophyton* spp. spa.
63. Azambuja CV, Pimmel LA, Klafke GB, Xavier MO. Onychomycosis: clinical, mycological and in vitro susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. *Anais brasileiros de dermatologia.* 2014 Jul-Aug;89(4):581-6. PubMed PMID: 25054744. Pubmed Central PMCID: PMC4148271. Epub 2014/07/24. eng.
64. Yenisehirli G, Tuncoglu E, Yenisehirli A, Bulut Y. In vitro activities of antifungal drugs against dermatophytes isolated in Tokat, Turkey. *International journal of dermatology.* 2013 Dec;52(12):1557-60. PubMed PMID: 24134487.

# **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Byron Anthony Bodden Mendoza

Candidato para el Grado de  
Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica

Tesis: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE  
DERMATOFITOS CAUSANTES DE ONICOMICOSIS

Campo de Estudio: Microbiología Médica

## **Biografía:**

Datos Personales: Nacido en La Ceiba, Honduras el 7 de Agosto de 1985,  
hijo de Leslie Anthony Bodden Elwin y Mirna G. Mendoza.

## **Educación:**

Egresado de la Universidad de Montemorelos, grado obtenido Médico  
Cirujano en el 2009, primer lugar en la generación.

## **Experiencia Profesional:**

Jefe de Enseñanza e Investigación del Centro de Salud Comunitario (CSC)  
Luz y Vida del Hospital La Carlota, Montemorelos, Nuevo León en el 2010;  
Coordinador Médico del mismo CSC en el 2011 y 2012.