

PCR multiplex en la detección de *Tinea unguium* en pacientes de Caracas – Venezuela.

Laurymar Camacaro¹, Michelle De Arbeloa¹, Alexis Fernández², Elsy Cavallera¹ y Primavera Alvarado³

¹ Sección clínica de Dermatología y Sifilografía.

² Laboratorio de Inmunología II.

³ Laboratorio de Micología. Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit.

Palabras clave: PCR multiplex; cultivo micológico; dermatofitos; *Tinea unguium*; *Trichophyton rubrum*; *Trichophyton mentagrophytes*.

Resumen. La *Tinea unguium* (*T. unguium*) es una micosis superficial producida por dermatofitos que infectan la lámina ungueal de manos y pies. Afecta a más del 10% de la población mundial y su prevalencia viene aumentando en los últimos años. Los métodos convencionales para su diagnóstico, basados en el examen directo y el cultivo micológico, presentan baja especificidad y sensibilidad respectivamente. El reciente avance de técnicas de secuenciación del ADN, ha permitido desarrollar varios métodos moleculares para la identificación directa y más precisa de dermatofitos a partir de muestras clínicas, con resultados rápidos en 24-48 horas. El objetivo de este trabajo fue comparar la efectividad de la PCR multiplex con los métodos tradicionales para el diagnóstico de dermatofitos. Se evaluaron un total de 49 pacientes con diagnóstico clínico de *T. unguium* y 10 muestras de individuos sanos. Se aplicaron las técnicas convencionales y la PCR multiplex para detectar secuencias comunes de los dermatofitos y secuencias específicas para *Trichophyton (T.) rubrum* y *T. mentagrophytes*. La PCR multiplex fue positiva para dermatofitos en 19 pacientes, superó el cultivo micológico por 11 muestras, detectando secuencias del *T. mentagrophytes* y otros dermatofitos, que fueron negativos al cultivo micológico. Se obtuvo una sensibilidad del 97% y especificidad del 73,2%. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la PCR multiplex puede detectar especies que no son aisladas en cultivo, logrando mejorar el diagnóstico y la toma de decisiones para el tratamiento en las infecciones fúngicas.

PCR multiplex in the detection of *Tinea unguium* in patients from Caracas – Venezuela.*Invest Clin* 2019; 60 (2): 160-170**Key words:** PCR multiplex; fungal culture; dermatophytes; *Tinea unguium*; *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*.

Abstract. *Tinea unguium* is a superficial fungal infection due to dermatophytes that affects the ungueal plate of fingers and toes. It affects more than 10% of the population throughout the world with an increasing prevalence in the last years. Conventional diagnostic methods such as direct examination and mycological and fungal culture are of low specificity and sensibility respectively. Recent advances in DNA sequencing have allowed direct identification of dermatophytes with quick results in 24-48 hours. The aim of this study was to compare the effectiveness of PCR multiplex vs traditional methods in the diagnosis of dermatophyte infection of the ungueal plate, and to determine future parameters for its standardization. Forty-nine patients with diagnosis of tinea unguium and 10 samples of healthy control individuals were evaluated. Conventional techniques and PCR multiplex were applied to all samples to identify common DNA sequences of dermatophytes and specific sequences of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*. PCRm was positive for dermatophytes in 19 patients, overcoming the mycological culture by 11 samples, detecting the sequence of *T. mentagrophytes* and other dermatophytes, which were negative to the mycological culture. A high sensitivity of 97% and a specificity of 73.2% were obtained. The results obtained in this work show that multiplex PCR can detect species that are not isolated in culture, achieving better diagnosis and decision making for treatment in fungal infections.

Recibido 03-09-2018 Aceptado 05-04-2019

INTRODUCCIÓN

La *Tinea unguium* (*T. unguium*) o tiña de las uñas es una micosis superficial producida por dermatofitos que infectan la lámina ungueal de manos y pies. Los microorganismos responsables más habituales son *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), *Trichophyton interdigitale* (*T. interdigitale*), *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*) y *Epidermophyton floccosum* (*E. floccosum*) (1).

Estas micosis superficiales son cosmopolitas y por su alta frecuencia, son un serio problema de salud pública. Su incidencia es estimada en forma parcial, ya que la mayo-

ría de los datos publicados generalmente proceden de las consultas dermatológicas, representando del 20 al 25% de la población mundial (2). La prevalencia en algunos países como Singapur, se han calculado en 2500 casos anuales, en la República de Yemen y en Cuba representan el 16% y el 28,5% respectivamente (3) En México afecta el 5% de la población y constituye del 70 al 80% de las infecciones causadas por hongos (4). Su incidencia es similar en países como España (20,8%), Brasil (26,3%) e Irán (24%) (2). En Venezuela las enfermedades fúngicas superficiales tienen una incidencia del 92,9% y una prevalencia entre el 0,1 al 11%, según el

área geográfica (5). Las dermatofitosis ocupan el primer lugar de frecuencia en Venezuela con un aproximado de 60,5% a 45% de prevalencia según los reportes de diferentes grupos de trabajo en micología en Venezuela en los años 1984 – 2010 y 2002 – 2012, respectivamente (5,6).

El diagnóstico convencional se basa en la observación al microscopio óptico de las muestras clínicas y el cultivo micológico para la identificación morfológica del hongo (7,8,9). El examen microscópico directo de muestras de uñas infectadas no permite la identificación de género y especie. Cuando se usa el hidróxido de potasio al 20% (KOH), la preparación presenta una sensibilidad del 40–68%, la cual puede ser incrementada al usar tinción fluorescente como BlankophorR (Blankophor, Alemania) o Calcofluor WhiteR (Merck, Alemania) (10,11,12). La identificación de especies de hongos se realiza mediante el cultivo y examen morfológico de colonias. Sin embargo, hasta un 30% de los cultivos resultan negativos del total de casos positivos por microscopía (11), observándose con frecuencia la contaminación bacteriana y por otros hongos. La principal desventaja del cultivo micológico es el tiempo de crecimiento y de esporulación de los hongos, requiriéndose de dos a cuatro semanas para obtener un resultado. Por otro lado, se ha implementado el método histológico con la técnica de Tinción de ácido-Schiff (PAS), que permite el análisis de material de las uñas, facilitando la correcta observación de la estructura fúngica, aunque no se pueda identificar la especie involucrada en la afección (9, 10, 13).

El desarrollo de técnicas de biología molecular, ha permitido una mejor identificación y diagnóstico de los agentes causales de *T. unguium*. La PCR múltiple (PCRm) permite la amplificación simultánea de varias secuencias de ADN de varios patógenos micóticos presentes en una muestra, utilizando cebadores específicos para cada una de ellas. Además, permite la detección a nivel de especies utilizando secuencias específicas (13-16). En el presente se evaluó y estandarizó la

técnica de la PCRm, con el fin de utilizarla de manera masiva y rutinaria en el diagnóstico de dermatofitos en uñas. Es de hacer notar que hasta la fecha no existen registros de trabajos similares en Venezuela y pocos en Latinoamérica. Siendo evidente la importancia de la realización de estudios que permitan comparar la aplicación de la PCR múltiple con el estudio micológico para la detección de dermatofitos en general.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Con el aval del Comité de Bioética del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, se evaluaron 49 pacientes que acudieron de manera aleatoria a la consulta especializada de Micología de dicho instituto, con la impresión diagnóstica de *Tinea unguium*, entre los meses de julio y agosto del año 2015.

Procesamiento de las muestras

Una vez seleccionado el paciente, se realizó la limpieza de la uña afectada con alcohol isopropílico al 70% para remover contaminantes. El raspado del lecho ungueal fue realizado con hoja de bisturí N° 15, recolectando el material (polvo o escama) sobre una lámina portaobjeto limpia, ubicada debajo de la superficie raspada para el cultivo micológico. El corte distal de lámina ungueal afectada se realizó con cortauñas doméstico para el análisis molecular. Se recolectaron 10 muestras de individuos sanos como controles negativos.

Examen directo micológico

La muestra obtenida por raspado se impregnó con una gota de negro de clorazol y se realizó la observación directa al microscopio de luz convencional para la detección de estructuras fúngicas.

Cultivo micológico

Las muestras obtenidas (polvo o escamas) fueron cultivadas en los medios agar Sabouraud o de lactimel, suplementados

con cloranfenicol al 5%. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente durante 4 semanas. Se determinó el agente etiológico, según las características morfológicas, utilizando cepas de referencia estándar de *T. rubrum* (Z97993) y *T. mentagrophytes* (Z98000) del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel de Caracas, Venezuela.

Extracción de ADN de dermatofitos

Se cultivaron cepas de referencia estándar del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, para *T. rubrum* (Z97993), *T. mentagrophytes* (Z98000), *Cándida albicans* (*C. albicans*, B-385 CDC) y *Trichophyton tonsurans* (*T. tonsurans*, 39297). Se obtuvieron paquetes celulares de las cepas de referencia, fueron resuspendidos en solución salina y centrifugados a 14000 g durante 3 min. La extracción del ADN total se realizó utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Los paquetes celulares fueron resuspendidos en 300 μ L de 50mM de EDTA (pH 8,0). Se agregó 5 μ L de liticasa (20mg/mL). Se incubó por 60 min a 37°C y se dejó enfriar a 25°C. Se centrifugó nuevamente a 14000 g por 3 min. Se removió el sobrenadante y se adicionaron 300 μ L de solución de lisis nuclear. Se agregaron 100 μ L de la solución de precipitación de proteína y se mezcló en vortex por 20 s, dejándolo en hielo por 5 min. Se centrifugó a 14000 g por 3 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo con 300 μ L de isopropanol al 100% a 25°C. Se mezcló cada tubo por inversión suavemente y se centrifugó a 14000 g por 3 min. El ADN fue lavado con etanol al 70% a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 g por 3 min y se dejó secar por 15 min. Se añadió solución para hidratar el ADN y se almacenó a 4°C (17).

Extracción ADN de lámina ungueal

Se cortó la región distal de la lámina ungueal afectada con cortauñas doméstico, obteniendo 6-36 mg de muestra. La extracción del ADN total de las muestras de uñas, se realizó con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Las muestras fueron incubadas con 15 μ L proteinasa K (PK 20mg/

mL), en 200 μ L de buffer de lisis EDTA (0,5M) y 400 μ L/muestra de solución de lisis nuclear durante 60 min a 37°C. Se disgregaron los restos de material sólido y se agregaron 5 μ L PK (20mg/mL). Se agregaron 3 μ L/muestra de solución ARNasa y se mezcló por inversión e incubando durante 30 min a 37°C. Luego se dejó a 25°C por 5 min y se agregaron 200 μ L/muestra de solución de precipitación de proteína agitando con vortex y se centrifugó a máxima velocidad durante 4 min. Se tomó el sobrenadante de manera cuidadosa en un tubo nuevo y se colocaron 600 μ L/muestra de isopropanol al 100%.

Se mezcló por inversión y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante. El ADN fue lavado con etanol al 70% a temperatura ambiente. Se agregaron 50 μ L/muestra de solución para hidratar ADN y se almacenaron a 4°C (16).

Secuencias iniciadoras

La amplificación de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se realizó a partir de secuencias específicas divergentes de la región espaciadora interna transcrita (ITS) del ARNr de cada especie. Se seleccionaron cebadores específicos para *T. rubrum* (TR): [TRF: 5'CCC CCC ACG ATA GGG ACCG'3 y TRR: 5' GAC TGA CAG CTC TTC AGA GAA TT 3'] que permiten la amplificación de un producto de 214 pb a una temperatura de alineación de 62°C. Para *T. mentagrophytes* (TM): [TMF 5' GCC CCC CAC GAT AGG GCC AA 3' y TMR 5' CTC GCC GAA CGG CTC TCC TG 3'] un producto de 132 pb a 64°C. Además, se utilizaron secuencias específicas del gen de la quitina sintetasa I (QSI) presente en todas las especies de dermatofitos (DER): [DERF 5' GAA GCC TGG AAG AAG ATT GTC G 3' y DERR 5' CCT TGA TTT CAC CGC AGG CAC 3'], la cuales permiten la amplificación de un fragmento de 432 pb a 60°C. Después de la verificación de la especificidad de las secuencias de amplificación, se realizó la PCRm utilizando los tres cebadores en la misma reacción (13).

Amplificación del ADN

La amplificación del ADN se realizó en un volumen final de 50 μ L. La mezcla de la reacción estuvo compuesta de 100 a 500 ng de ADN obtenido de las muestras de los pacientes, 10 μ L de buffer de reacción 5X, 0,5 μ L desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP de 25 mmol/L), 1 μ L de cada iniciador, 1,25 U de polimerasa GoTaq ADN. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador Icyler (BioRad), el proceso se inició con un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 min. El programa de amplificación para la PCRm constó de 30 ciclos de 94°C por 30 s, seguido de 62°C por 30 s y por último 72°C durante 30 s. Finalizando con una extensión de 72°C durante 10 min. De igual manera se realizaron pruebas de especificidad con los ADN totales de las cepas de referencia, utilizando las diferentes secuencias iniciadoras por separado a su temperatura de alineación.

Corrida electroforética

Se mezclaron 10 μ L de cada producto de amplificación con 5 μ L de buffer de carga. Las mezclas fueron resueltas en geles de agarosa al 2% a 60 V y teñidos con bromuro de etidio (0,25 μ L/mL). Se visualizó el resultado en un transiluminador de rayos UV (UVP 3UVTM) y se tomaron registros fotográficos de los resultados obtenidos. Se utilizó el 1Kb DNA Ladder (Gibco BRL) como marcador de pesos moleculares.

Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba de la razón de verosimilitud y se calcularon la sensibilidad, y especificidad utilizando el programa XLSTAT-Pro[®] 2010 (Addinsoft).

RESULTADOS

De los pacientes estudiados, un total de 49 pacientes con impresión diagnóstica de *T. unguium* y 10 individuos sanos, fueron evaluados en la consulta de micología del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr.

Jacinto Convit, Hospital Vargas, durante los meses de julio a agosto del año 2015. Se obtuvieron datos demográficos, características clínicas y se realizó la detección de dermatofitos por métodos convencionales y PCRm. De los pacientes estudiados el 36,7% pertenecieron al género masculino y el 63,3% al femenino. El grupo etario más representativo estuvo entre 31 y 40 años (30,6%). La ocupación más frecuente de los pacientes que presentaron las dermatofitosis fue ama de casa (14,3%).

La mayoría de los pacientes presentaron onicomicosis subungueal distal (OSD) como variante clínica (75,5%), seguido de distrofia total (DT; 28,6%) y de la onicomicosis subungueal lateral (OSL; 4,1%), no se observaron otras presentaciones clínicas. La ubicación más frecuente de afectación ungueal fue en los pies con un 95,9% y sólo 4,1% presentó alteraciones en las uñas de las manos. El 35,6% de los pacientes estudiados presentó enfermedad de base, tales como hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y cardiopatías. Se pudo constatar que el 51 % de los pacientes dejó de utilizar antimicóticos (tópicos o sistémicos) un mes antes de la evaluación clínica, un 42,9 % indicó no utilizarlo durante la enfermedad y un 6,1 % no precisaba el tipo de tratamiento utilizado.

Directo micológico

El análisis de las muestras por microscopía óptica convencional, demostró que el 83,7% presentó estructuras fúngicas. De las cuales 28,6% correspondieron a levaduras y 55,1% a hifas.

Cultivo micológico

De las muestras procesadas, se aislaron 8 cultivos de *T. rubrum* (16,3%), 2 Mohos (4,0%) (1 *Fusarium dimerum*, 1 *Neosectalidium dimidiatum*) y 9 levaduras (18,4%) (7 *Candida no albicans*, 1 *Candida parapsilopsis* y 1 *Trichosporon sp*). El resto de los cultivos fueron negativos (61,2%). No se detectaron otras especies de dermatofitos.

Detección de dermatofitos en las muestras clínicas por PCRm

Una vez establecidas las condiciones de la PCRm para la detección de TR, TM y DER, se procedió a realizar la PCRm a las muestras clínicas. Observándose productos de amplificación de 132 pb correspondientes a *T. mentagrophytes* (Líneas 5-8), 214 pb para *T. rubrum* (Líneas 1-4) y de 432 pb para otros dermatofitos (Líneas 9, 10). Se pudo constatar la no amplificación en los controles negativos (Línea 15, 18) (Fig. 1).

Comparación de métodos diagnósticos convencionales y la PCRm en la detección de dermatofitos

Se consideró examen directo positivo, la observación al microscopio de estructuras fúngicas tales como hifas y/o levaduras. Se observaron 41 pacientes (83,7%) con directos micológicos positivos y 8 pacientes (16,3%) negativos.

En cuanto al cultivo micológico se detectaron 8 muestras positivas para dermatofitos correspondientes a *T. rubrum* (16,32%). La prueba Chi-cuadrado, determinó que hubo diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes especies de dermatofitos aisladas, $X^2 = 8,977$ ($p = 0,011$).

La PCRm fue positiva para dermatofitos en 19 pacientes (38,8%), superando el cultivo micológico por 11 muestras. De los cuales 13 correspondieron a *T. rubrum* (26,5%), 4 a *T. mentagrophytes* (8,2%) y 2 otros dermatofitos (4,1%). Se compararon dichos resultados con la prueba de Chi-cuadrado ($X^2 = 13,816$, $p = 0,001$) siendo estadísticamente significativo.

Sensibilidad y especificidad

La evaluación de la PCRm como herramienta diagnóstica, se realizó utilizando el cultivo micológico como el estándar de oro, por su capacidad de identificar género y especie. Obteniendo una alta sensibilidad del 97% y una especificidad del 73,2%.

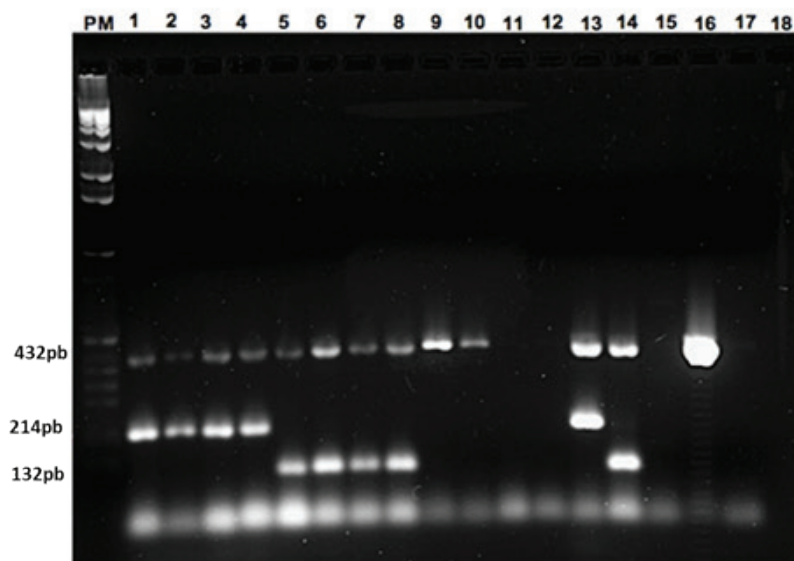


Fig. 1. PCR múltiple para detección de *T. rubrum* (TR), *T. mentagrophytes* (TM) y otros dermatofitos (DER). Productos de amplificación resueltos en gel de agarosa al 2% a 65 Volt. (PM): Pesos moleculares. (1-4): Pacientes positivos para TR. (5-8): Pacientes positivos para TM. (9,10): Pacientes positivos para otros dermatofitos (DER). (11,12): Controles Sanos. (13): Control positivo *T. rubrum*. (14): Control positivo *T. mentagrophytes*. (15): Control negativo *Cándida albicans*. (16): Control positivo *T. tonsurans*. (17): Control negativo sin ADN.

DISCUSIÓN

Las onicomicosis representan uno de los motivos más frecuente de asistencia en la consulta dermatológica, correspondiendo al 50% de todos los casos de la patología ungueal (18). En la práctica clínica cotidiana, su manejo puede resultar problemático, con elevados índices de resistencia al tratamiento, o recurrencia clínica de la infección (19). Generalmente, los tratamientos para onicomicosis indicados bajo evidencia empírica, se han asociado a menor efectividad terapéutica y pueden exponer a los pacientes a posibles efectos adversos prevenibles. Además, retrasa el diagnóstico de otras enfermedades que pueden asemejarse clínicamente a la onicomicosis, tales como psoriasis, liquen plano e incluso neoplasias (20). A pesar de la importancia del diagnóstico certero de las onicomicosis, las herramientas diagnósticas disponibles para esta patología son aún limitadas; el examen micológico directo es inespecífico y el cultivo es poco sensible (19). Los resultados inconsistentes en cuanto a la sensibilidad y especificidad del examen directo y el cultivo, están relacionados principalmente con el procedimiento de la toma de muestra de las uñas, es decir; la cantidad de material obtenido de la uña y la ubicación de donde se toma la muestra (21,22).

Ante esta problemática, se han desarrollado técnicas moleculares tales como la PCRm, que permite la amplificación simultánea de varias secuencias de ADN diferentes (23).

En este trabajo, se realizó la evaluación de 49 pacientes con impresión diagnóstica de *T. unguium*. El género más representativo correspondió al femenino y el grupo etario más frecuente se ubicó entre 31 y 40 años. Se encontró que las amas de casa presentaron mayor infección por onicomicosis. Estos resultados indican que la permanencia en el hogar en conjunto con la exposición a la humedad puede aumentar la predisposición de este tipo de micosis (2, 24,25).

Con relación a las variantes clínicas se observó que los pacientes presentaron en su mayoría OSD (75,5%), lo cual concuerda con la literatura como la presentación clínica más frecuente (1,10). Por otro lado, la ubicación más frecuente de afectación ungueal fueron los pies y sólo dos pacientes presentaron alteraciones en las uñas de las manos, acorde con las estadísticas internacionales, las cuales especifican aproximadamente un 93% en pies y 7% en manos (1,10). En cuanto al tiempo de evolución, el 51% de los pacientes presentó la infección en un intervalo comprendido entre 1 a 5 años. Esto nos indica, que las onicomicosis son tratadas por los pacientes en casa, sin realizar la consulta al facultativo, generando que la patología prevalezca en el tiempo (1,26). Con respecto a las enfermedades de base, las patologías más frecuentes fueron la HTA y la DM2. Estudios han demostrado que las patologías de base causantes de inmunosupresión, pueden condicionar a la aparición de infecciones oportunistas, un antecedente de gran importancia en pacientes con onicomicosis es la DM2 (27,28).

Con relación al examen directo micológico, se pudo determinar que un 55,1% de los casos fueron positivo a la presencia de estructuras fúngicas. Resultados similares han sido reportados por otros autores utilizando diferentes tinciones, tales como KOH y clorazol (29). Por otro lado, el cultivo micológico fue positivo en 16,3% de los casos, todos correspondientes a *T. rubrum*. A pesar de que el cultivo ha sido considerado como el estándar de oro para el diagnóstico de las onicomicosis, por diferenciar a las especies involucradas; en contraste con la microscopía óptica, este método tiende a ser inconsistente, por su sensibilidad, que oscila entre 25 y 80% (9,17,29). Esto puede deberse principalmente, al muestreo; en la actualidad se han reportado dos metodologías, la del raspado del lecho ungueal y la técnica de perforación vertical. En diversos estudios comparativos de ambas técnicas se ha encontrado que la perforación vertical

es estadísticamente mejor que el raspado del lecho ungueal, lográndose aumentar la sensibilidad del examen directo y del cultivo (21). En el presente estudio, la baja sensibilidad del cultivo pudo deberse a la técnica del raspado, en tal sentido, podría realizarse el estudio utilizando la técnica de perforación vertical y comparar los resultados. Sin embargo, Bonifaz y col. 2013 reportaron que se obtienen mejores resultados al aplicar la técnica de raspado en comparación a la de perforación vertical (30). Otros problemas asociados a la baja sensibilidad del cultivo podrían ser el tratamiento médico previo que tienen los pacientes generando falsos negativos o la contaminación que se presenta en los mismos (31). En este trabajo, los resultados obtenidos son comparables a los obtenidos por Nazar y col. (32) y Pérez y col. (33), los cuales reportaron que *T. rubrum* fue el más frecuente en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis. Lo cual podría ser consecuencia del grado de penetración de las hifas de esta especie, en los queratinocitos ungueales, causando daño severo en el estrato córneo (34).

La detección molecular se realizó por PCRm, se utilizaron cebadores para la amplificación de la ITS específicas de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, siendo estas especies las más frecuentes en nuestra región (5,6). Estas secuencias específicas divergentes permiten la detección de estas especies muy similares genéticamente (16). Para la detección de otras especies de dermatofitos, se amplificó el gen de la QSI, el cual es altamente conservado en todas las especies de dermatofitos (16). Al realizar la PCRm, se pudo determinar que *T. rubrum* fue el dermatofito más frecuente (26,53%) seguido de *T. mentagrophytes* (8,2%) y un 4,1% de otros dermatofitos. Resultados similares fueron reportados por Spiliopoulou y col. (35). quienes realizaron raspado de uñas en pacientes con sospecha clínica

de onicomicosis, encontrando una detección por PCRm positiva para dermatofitos en 30,1% de los casos, además de detectar como agente predominante a *T. rubrum* (37). Por otra parte, Petinataud y col. (38) reportaron 34,4% de los casos positivos para dermatofitos por PCRm y solo 16,7% obtenido por el cultivo.

En el presente estudio, la PCRm presentó una alta sensibilidad (97%) y especificidad (73%), estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura, encontrándose que la sensibilidad de la PCRm oscila entre un 85 y 97%, (12,13,39,40) al utilizar como referencia estándar, las muestras positivas en el cultivo, en el directo micológico o de ambos métodos. Además, estos resultados son similares a los reportados por Verrier y col. (41) quienes evidenciaron al agente infeccioso por PCR, en el 74% de los casos de muestras sospechosas de onicomicosis. Demostrando que la PCRm es una herramienta diagnóstica más sensible en la identificación de las especies involucradas en esta patología. Esta técnica puede realizarse de manera efectiva en poco tiempo, en comparación con el cultivo, el cual requiere de varias semanas para obtener un resultado (12,13,41). Adicionalmente, la PCRm presenta un mayor costo en comparación con el cultivo micológico, pero es mucho más efectiva y rápida al momento de la prevención de las consecuencias derivadas del diagnóstico errado de las onicomicosis (13,42). La prueba de la razón de verosimilitud realizada, indicó que el modelo estimado es significativo ($X^2 = 13,816$; $p = 0,001$).

En conclusión, la PCRm presentó una alta sensibilidad y especificidad, además de detectar especies que no fueron aisladas por cultivo micológico. Siendo esta investigación uno de los primeros trabajos realizados en territorio venezolano y, por lo tanto, sienta las bases para futuros estudios.

REFERENCIAS

1. **López-Estebanz JL, Sopena-Barona J.** Dermatofitosis cutáneas. Etiología, epidemiología y manifestaciones clínicas. *Med Clin* 2006; 126(1):14-19.
2. **Manzano-Gayosso P.** Las micosis superficiales: su relevancia médica y socioeconómica. *Gac Med Méx* 2008; 144(2):123-124.
3. **Hiok-Hee T.** Superficial fungal infections seen at the National Skin Centre, Singapore 2005; 46:77-80.
4. **Arenas R.** Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19 (2):63-67.
5. **Martínez Méndez D, Hernández Valles R, Alvarado P y Mendoza M.** Las micosis en Venezuela: casuística de los Grupos de Trabajo en Micología (1984-2010). *Rev Iberoam Micol* 2013; 30(1):39-46; doi: 10.1016/j.riam.2012.10.001.
6. **Lemus-Espinoza D, Maniscalchi MT, Villarreal O, Bónoli SB, Wahab F, García O.** Superficial mycoses in patients from Anzoátegui State, Venezuela, periodo 2002-2012. *Invest Clin* 2014; 55(4):311-320.
7. **Elewski B, Hazen P.** The superficial mycoses and the dermatophytes. *Continuing Medical Education, J Am Acad Dermatol* 1989; 21(4 Pt 1):655-673.
8. **Petrini B, Von Rosen L.** Optimal dermatophyte diagnosis requires both microscopy and culture. *Lakartidningen* 2002; 99(41):4084.
9. **Elewski B.** Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(3):415-429.
10. **Nenoff P, Krüger C, Schaller J, Ginter-Hanselmayer G, Schulte-Beerbühl R, Tietz HJ.** Mycology - an update part 2: dermatomycoses: clinical picture and diagnostics. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014;12(9):749-77. doi: 10.1111/ddg.12420.
11. **Ovrén E, Berglund L, Nordlind K, Rollman O.** Dermatophytosis: fluorostaining enhances speed and sensitivity in direct microscopy of skin, nail and hair specimens from dermatology outpatients. *Mycoses* 2016; 59(7):436-441. doi: 10.1111/myc.12491.
12. **Hayette MP, Seidel L, Adjetey C, Darfouf R, Wéry M, Boreux RI, Sacheli R, Melin P, Arrese J.** Clinical evaluation of the DermaGenius® Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and *Candida albicans* in nails. *Med Mycol* 2019; 1;57(3):277-283. doi: 10.1093/mmy/myy020.
13. **Sherman S, Goshen M, Treigerman O, Ben-Zion K, Carp MJ, Maisler N, Ehrenreich IB, Kimchi A, Lifshitz S, Smollan G, Davidovici B, David M, Hodak E, Segal R.** Evaluation of multiplex real-time PCR for identifying dermatophytes in clinical samples-A multicentre study. *Mycoses* 2018;61(2):119-126. doi: 10.1111/myc.12713.
14. **Pankewitz F, Nenoff P, Uhrlaß S, Bezold G, Winter I, Gräser Y.** Development of a novel polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trichophyton rubrum* onychomycosis. *Br J Dermatol* 2013; 168(6):1236-42. doi: 10.1111/bjd.12221.
15. **Ding J, Li J, Liu Z, Tan Z.** Clinical identification of common species of dermatophytes by PCR and PCR-RFLP. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2004; 24(6):642-4.
16. **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; 57(1):19-26.
17. **Brito Gamboa A, Mendoza M, Fernández A, Díaz E.** Detection of *Candida dubliniensis* in patients with candidiasis in Caracas, Venezuela. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23(2):81-84.
18. **Hay R.** The future of onychomycosis therapy may involve a combination of approaches. *Br J Dermatol* 2001;145 Suppl 60:3-8.
19. **Westerberg DP, Voyack MJ.** Onychomycosis: Current trends in diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2013; 88(11):762-70.
20. **Lipner SR, Scher RK.** Onychomycosis – a small step for quality of care. *Curr Med Res Opin* 2016; 32(5):865-7. doi: 10.1185/03007995.2016.1147026.
21. **Shemer A, Trau H, Davidovici B, Grunwald MH, Amichai B.** Collection of fungi samples from nails: comparative study of curettage and drilling techniques. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22(2):182-5. doi: 10.1111/j.1468-3083.2007.02361.x.
22. **Shemer A, Trau H, Davidovici B, Grunwald MH, Amichai B.** Nail sampling in onychomycosis: comparative study of curettage from

- three sites of the infected nail. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007;5(12):1108-11.
23. Han HW, Hsu MM, Choi JS, Hsu CK, Hsieh HY, Li HC, Chang HC, Chang TC. Rapid detection of dermatophytes and *Candida albicans* in onychomycosis specimens by an oligonucleotide array. *BMC Infect Dis* 2014 Nov 7;14:581. doi: 10.1186/s12879-014-0581-5.
 24. Bhatia VK, Sharma PC. Epidemiological studies on Dermatophytosis in human patients in Himachal Pradesh, India. *Springer-Plus* 2014; 3:134. doi: 10.1186/2193-1801-3-134.
 25. Baranová Z, Kampe T, Dorko E, Rimárová K. Epidemiological and clinical aspects of dermatophytoses in Eastern Slovakia: a retrospective three-year study. *Cent Eur J Public Health*. 2018; 26 Suppl:S72-S75. doi: 10.21101/cejph.a5279.
 26. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. Tercera edición. México: Mc Graw Hill; 2010.
 27. Eba M, Njunda AL, Mouliom RN, Kwenti ET, Fuh AN, Nchanji GT, Atashili J. Onychomycosis in diabetic patients in Fako Division of Cameroon: prevalence, causative agents, associated factors and antifungal sensitivity patterns. *BMC Res Notes* 2016; 22;9(1):494.
 28. Gulcan A, Gulcan E, Oksuz S, Sahin I, Kaya D. Prevalence of toenail onychomycosis in patients with type 2 diabetes mellitus and evaluation of risk factors. *J Am Podiatr Med Assoc* 2011;101(1):49-54.
 29. Angulo A, Bravo N, Falco A, Pulido A, Rivera Z, Cavallera E. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 Años en el Departamento de Micología del Instituto de Biomedicina. *Dermatol Venez* 2008; 46 (4): 12-17.
 30. Rios-Yuil JM, Bonifaz A, Arenas R, Araiza J, Fernández R, Mercadillo-Pérez P, Ponce-Olivera R. Mycological studies of nail samples obtained by curettage vs. vertical perforation of the nail plate. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27(9):1189-1190. doi: 10.1111/jdv.12035.
 31. Prieto R, Janeiro J, Fiaño L, Ibáñez L, Alfonso A, González C. Diagnóstico de infecciones por dermatofitos en uñas con detección rápida específica de *Trichophyton rubrum*. *Rev Inter de Ciencias Podol* 2011; 5 (2):9-16.
 32. Nazar JR, Gerosa PE, Díaz OA. Onicomycosis: epidemiología, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio. *Rev Argent Microbiol* 2012; 44(1): 21-25.
 33. Pérez JE, Cárdenas C, Hoyos AM. Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de la onicomycosis en un laboratorio de referencia, Manizales (Caldas), 2009. *Infect* 2011; 15(3):168-176.
 34. Yue X, Li Q, Wang H, Sun Y, Wang A, Zhang Q, Zhang C. An ultrastructural study of *Trichophyton rubrum* induced onychomycosis. *BMC Infect Dis* 2015; 17;15:532. doi: 10.1186/s12879-015-1240-1.
 35. Spiliopoulou A, Bartzavali C, Jelastopulu E, Anastassiou ED, Christofidou M. Evaluation of a commercial PCR test for the diagnosis of dermatophyte nail infections. *J Med Microbiol* 2015; 64(Pt 1):25-31. doi: 10.1099/jmm.0.079962-0.
 36. Ignjatović VA, Stevanović MT, Djurdjević VS, Petrović MM, Stanucević MP, Džamić AM, Čalovski I. Onychomycosis - Sampling, as Efficient Part of Hospital Pharmacology. *Hospital Pharmacology* 2014; 1(3):130-137.
 37. Petinataud D, Berger S, Ferdynus C, Debourgoigne A, Contet-Audonneau N. Optimising the diagnostic strategy for onychomycosis from sample collection to fungal identification evaluation of a diagnostic kit for real-time PCR. *Mycoses* 2016; 59(5):304-311.
 38. Kondori N, Abrahamsson AL, Ataollahy N, Wenneras C. Comparison of a new commercial test, Dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. *Med Mycol* 2010; 48(7):1005-1008. doi: 10.3109/13693781003743130.
 39. Mehlig LI, Garve C, Ritschel A, Zeiler A, Brabetz W, Weber C, Bauer A. Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses* 2014;57(1):27-34. doi: 10.1111/myc.12097.

-
40. Verrier J, Pronina M, Peter C, Bontems O, Fratti M, Salamin K, Schürch S, Gindro K, Wolfender JL, Harshman K, Monod M. Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2012;50(3):553-61. doi: 10.1128/JCM.05164-11.
41. Wisselink GJ, van Zanten E, Kooistra-Smid AM. Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. *J Microbiol Methods* 2011;85(1):62-66. doi: 10.1016/j.mimet.2011.01.023.