75 años
ESCUELA DE MEDICINA

# DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO CONVENCIONAL VERSUS PCR-SECUENCIACIÓN EN ONICOMICOSIS

## Estudio prospectivo en Cali, Colombia

Janeth del Pilar Villanueva Reyes / María del Pilar Crespo Ortiz / María Inés Álvarez Valle

SAMAVA EDICIONES

# DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO CONVENCIONAL VERSUS PCR-SECUENCIACIÓN EN ONICOMICOSIS

## Estudio prospectivo en Cali, Colombia


Janeth del Pilar Villanueva Reyes
*MD, MSc*

María del Pilar Crespo Ortiz
*MSc, PhD*

María Inés Álvarez Valle
*MSc*

Universidad del Valle
Facultad de Salud
Escuela de Medicina- Sección de Dermatología
Escuela de Ciencias Básicas – Departamento de Microbiología
Cali, Colombia


2026

SAMAVA
EDICIONES

Villanueva Reyes, Janeth del Pilar, autora, autor
Diagnóstico micológico convencional versus PCR-secuenciación en onicomicosis : estudio prospectivo en Cali, Colombia / Janeth del Pilar Villanueva Reyes, María del Pilar Crespo Ortiz, María Inés Álvarez Valle. -- Popayán : Samava Ediciones, 2026.
122 páginas

1 recurso en línea : archivo de texto: PDF.

Incluye glosario -- Incluye referencias bibliográficas

ISBN 978-628-7957-01-5 (digital)

1. Micología médica - Investigaciones - Cali 2. Onicomicosis - Diagnóstico 3. Onicomicosis - Microbiología 4. Reacción en cadena de la polimerasa 5. Cali – Investigaciones I. Crespo Ortiz, María del Pilar, autora II. Álvarez Valle, María Inés, autora

CDD: 616.969071 ed. 23 CO-BoBN– a1184549

© De las autoras
Samava Ediciones, agosto 2026

ISBN Digital: 978-628-7957-01-5

Info copia: Una copia de este libro reposa en la Biblioteca Nacional de Colombia.

Diseño de carátula:
SAMAVA EDICIONES

Corrección de estilo:
SAMAVA EDICIONES

Diagramación:
SAMAVA EDICIONES

Impresión:

SAMAVA
EDICIONES
E-mail: contacto@samava.com.co
www.samava.com.co
Celular: (57) 313 6619756
Dirección: Calle 1 # 2-99
Popayán, Colombia.
www. samava.com.co

Esta obra se distribuye bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Se autoriza su descarga, copia y distribución gratuita, siempre que se cite debidamente a los autores originales. No se permite su uso con fines comerciales ni la modificación total o parcial de su contenido sin autorización la editorial y de los autores.

El presente texto es de única responsabilidad de los autores.

# Dedicatoria

*A Dios, por mi existir y por todas las manifestaciones de su amor en mi vida.*

*A mis padres, hermanos y a Eduardo, por su amor, paciencia y constante apoyo.*

*A María José, por ser mi motor de vida y mi mayor motivación.*

ÍNDICE


ÍNDICE

# Agradecimientos

A la Dra. María Inés Álvarez Valle, por ser mi ejemplo y mi guía, por su gran apoyo y su inmenso corazón, por compartir conmigo su vasto conocimiento micológico.

A la Dra. María del Pilar Crespo Ortiz, por sumergirme en el maravilloso mundo de la biología molecular y enseñarme el rigor científico.

A la Dra. Beatriz Parra, Mauricio González, Dra. Diana López y al grupo de investigación VIREM (Red NEAS- Neuroinfecciones Emergentes en las Américas), por sus valiosos aportes en el desarrollo de la fase de secuenciación del proyecto.

A mis colegas y residentes de Dermatología por su apoyo constante.


ÍNDICE

# TABLA DE CONTENIDO

**LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS**.....17

**GLOSARIO**.....19

**PRESENTACIÓN**.....21

**JUSTIFICACIÓN**.....23

**CAPÍTULO I**
**MARCO CONCEPTUAL**.....27
1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ONICOMICOSIS.....27
1.2 ETIOLOGÍA.....29
1.3 ETIOPATOGENIA DE LAS DERMATOFITOSIS.....32
1.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA.....34
1.5 DIAGNÓSTICO.....38
1.5.1 Métodos convencionales.....39
1.5.1.1 Microscopía directa.....39
1.5.1.2 Cultivo para hongos.....40
1.5.1.3 Estudio histopatológico.....42
1.5.2 Métodos moleculares.....42
1.6 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD Y TRATAMIENTO.....45

**CAPÍTULO II**
**ESTADO DEL ARTE**.....49

**CAPÍTULO III**
**MÉTODO**.....57
3.1 TIPO DE ESTUDIO.....57
3.1.1 Población.....57
3.1.2 Tamaño de muestra.....58
3.1.3 Tipo de muestreo.....58
3.1.4 Criterios de inclusión.....58
3.1.4.1 Criterio de inclusión en el grupo de enfermos.....58
3.1.4.2 Criterio de inclusión en el grupo de no enfermos.....58
3.1.5 Criterios de exclusión.....59
3.1.6 Estrategia de reclutamiento.....59
3.2 PROCEDIMIENTOS.....59
3.2.1 Firma de consentimiento informado, diligenciamiento de encuestas y consideraciones éticas.....59
3.2.2 Toma, recolección y procesamiento inicial.....60
3.2.3 Estudio micológico.....60
3.2.3.1 Microscopía: examen directo para hongos (KOH).....60
3.2.3.2 Cultivos para hongos.....61
3.2.4 Estudio molecular.....61
3.2.4.1 Estandarización de las pruebas moleculares.....61
3.2.4.2 Extracción de ADN.....62
3.2.4.3 Cuantificación del gen de la ribonucleoproteína (*RNP*) .....63
3.2.4.4 PCR convencional.....65
3.2.4.5 Electroforesis.....66
3.2.4.6 Secuenciación.....66
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....68

**CAPÍTULO IV**
**RESULTADOS**.....71
4.1 DESCRIPCIÓN DE LOS PARTICIPANTES Y CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS.....71
4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON ONICOMICOSIS.....72

4.3 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO....73
4.4 ASOCIACIONES CLÍNICAS Y MICOLÓGICAS....76
4.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR....82
4.5.1 Extracción del ADN....82
4.5.2 Cuantificación de la expresión del gen de la ribonucleoproteína (*RNP*) por qPCR....83
4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional....83
4.5.4 Secuenciación....86
4.5.5 Comparación diagnóstico molecular (PCR-ITS vs. Secuenciación)....88
4.6 COMPARACIÓN DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO CONVENCIONAL VS MOLECULAR....90

**CAPÍTULO V**
**DISCUSIÓN**....95

**CAPÍTULO VI**
**FORTALEZAS Y DEBILIDADES** ....109

**CAPÍTULO VII**
**CONCLUSIONES**....111

**REFERENCIAS**....113


ÍNDICE

# LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución porcentual de los grupos de agentes etiológicos de onicomicosis encontrados a nivel mundial.....30

Tabla 2. Distribución de los agentes etiológicos de onicomicosis encontrados en Colombia.....31

Tabla 3. Estudios moleculares en el diagnóstico de onicomicosis.....54

Tabla 4. Descripción de los cebadores y sonda utilizados en la qPCR.....64

Tabla 5. Mezcla de la qPCR para la cuantificación del *RNP*.....64

Tabla 6. Descripción de los cebadores utilizados en la detección molecular.....65

Tabla 7. Mezcla para PCR-ITS panfúngica.....65

Tabla 8. Condiciones para cada PCR-ITS panfúngica.....66

Tabla 9. Características sociodemográficas de los participantes del estudio.....72

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes con onicomicosis.....73

Tabla 11. Relación entre resultados del KOH y cultivo en onicomicosis.....73

Tabla 12. Sensibilidad y concordancia entre KOH y cultivo en onicomicosis.....74

Tabla 13. Relación entre los resultados del cultivo y el examen directo.....74

Tabla 14. Frecuencia de agentes etiológicos de acuerdo con el sitio anatómico.....78

Tabla 15. Frecuencia de agentes etiológicos de acuerdo con el género.....79

Tabla 16. Frecuencia de agentes etiológicos de acuerdo con el tipo clínico de onicomicosis.....81

Tabla 17. Resultados de KOH, cultivo, *RNP*, PCR-ITS y secuenciación de los participantes con onicomicosis.....91

Tabla 18. Resultados de KOH, cultivo, *RNP*, PCR y secuenciación de los participantes sanos a quienes se les identificó una secuencia genómica para hongos y PCR positiva.....92

Tabla 19. Correlación entre los resultados del cultivo y la secuenciación.....93

Tabla 20. Resultados de las pruebas de los sujetos con onicomicosis.....93

Tabla 21. Comparación del rendimiento de las pruebas moleculares con las convencionales.....94

Tabla 22. Comparación entre estudios que han utilizado la secuenciación en el diagnóstico de onicomicosis .....103

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo *in vitro* de infección por dermatofitos.....33

Figura 2. Patogénesis de la onicomicosis.....34

Figura 3. Onicomicosis subungueal distal lateral.....35

Figura 4. Onicomicosis distrófica total en uñas de los hallux.....36

Figura 5. Dermatofitoma en uña de hallux.....37

Figura 6. Uñas de manos de participante con onicolisis.....38

Figura 7. Examen directo para hongos (KOH): hifas hialinas septadas.....40

Figura 8. Aislados en ChromAgar Candida®.....42

Figura 9. Esquema del genoma de los hongos.....45

Figura 10. Estuche de extracción Prepman Ultra Sample®.....62

Figura 11. Espectrofotómetro NanoDrop One/OneC ® (Thermo Scientific).....63

Figura 12. Diagrama de flujo bioinformático del estudio.....67

Figura 13. Distribución de los diferentes grupos de hongos causales de onicomicosis.....75

Figura 14. Distribución por género y especies de los agentes etiológicos.....76

Figura 15. Colonias de hongos en agar Sabouraud-Dextrosa.....77

Figura 16. Localización anatómica de acuerdo con la forma clínica de onicomicosis.....80

Figura 17. Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN de los controles de *C. albicans* (A) y *T. rubrum* (B).....82

Figura 18. Gráfico de amplificación del gen *RNP* del control de *C. albicans* (A) y del consolidado de todas las muestras analizadas (B).....84

Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa #1 del producto de la PCR-ITS.....85

Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa #2 del producto de la reamplificación de la PCR- ITS para hongos.....85

Figura 21. Resultados del BLAST descriptivo del alineamiento local realizado en el NCBI de una de las secuencias obtenidas que mostró homología con *Candida albicans*.....86

Figura 22. Resultados del BLAST descriptivo del alineamiento local realizado en el NCBI de una de las secuencias que mostró homología con *Candida parapsilosis*.....87

Figura 23. Resultados del BLAST descriptivo del alineamiento local realizado en el NCBI de una de las secuencias obtenidas que mostró homología con *Trichophyton rubrum*.....87

Figura 24. Flujograma de los resultados de PCR-ITS y secuenciación en los participantes con onicomicosis.....88

Figura 25. Flujograma de los resultados de PCR-ITS y secuenciación en los participantes sanos.....89

# LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

**Cols** Colaboradores

**OSD** Onicomicosis subungueal distal

**OSL** Onicomicosis subungueal lateral

**OSDL** Onicomicosis subungueal distal lateral

**PCR** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**qPCR** Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

**HLA** Sistema leucocitario humano

**RFLP** Fragmentos de restricción de longitud polimórfica

**ITS** Espaciador transcrito interno

**ADN** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN** Ácido Ribonucleico

**RNP** Ribonucleoproteína

**SNG o NGS** Secuenciación de nueva generación

**ONT** Oxford Nanopore Technologies

**KOH** Hidróxido de potasio

**LDAB** Laboratorio de Diagnóstico de Agentes Biológicos

**MND** Mohos no dermatofitos

**spp** Especies

**sp** Especie

**s.s** Sensu stricto

**mm** Milímetro

**°C** Grados centígrados

**EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético

**SDS** Dodecilsulfato sódico

**pb** Pares de bases

**µL** Microlitro

**BSA** Albúmina de suero bovino

**UV** Ultravioleta

**BLAST** Siglas en inglés para Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta informática básica para la búsqueda de alineamiento de secuencias)

**CLSI** Instituto para Estándares de Laboratorio Clínico

**NCBI** Siglas en inglés de National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)

**IQR** Rango intercuartílico

# GLOSARIO

**API 20C® (Biomerieux):** sistema manual estandarizado para identificación de levaduras.

**ARTROCONIDIAS:** tipo de conidia formada por la fragmentación de una hifa.

**BLASTOCONIDIAS:** conidias formadas por gemación, características de las levaduras.

**HIFAS:** estructura filamentosa características de los mohos.

**HIPERQUERATOSIS SUBUNGUEAL:** engrosamiento de la uña.

**HONGOS DEMATIÁCEOS:** hongos pigmentados, conocidos también como mohos negros.

**LEVADURAS:** grupo de hongos microscópicos unicelulares, caracterizados por dividirse asexualmente por gemación.

**LEVADURIFORME:** hongo que al microscopio presenta simultáneamente tanto hifas como blastoconidias.

**MALDI-TOF**: del inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization-Time Of Flight. Técnica de ionización suave utilizada para obtener mediante espectrometría de masas, el espectro de un microorganismo para compararlo con una base de datos.

**MELANONIQUIA:** coloración oscura de la uña.

**MOHOS:** grupo de hongos microscópicos conformados por un micelio o conjunto de hifas.

**ONICOLISIS:** separación de la uña del lecho ungueal.

**PREVALENCIA:** número de casos que se han producido de un evento en una población en un determinado momento.

**PSEUDOHIFAS:** cadenas de levaduras alargadas que se forman por gemación.

**XANTONIQUIA:** coloración amarillenta de la uña.

# PRESENTACIÓN

Las enfermedades infecciosas continúan siendo uno de los desafíos de la práctica médica actual. Aunque la atención suele centrarse en enfermedades de alta mortalidad o en epidemias emergentes, existen infecciones crónicas que afectan significativamente la calidad de vida de las personas y que, sin embargo, permanecen subestimadas, entre ellas, la onicomicosis; infección fúngica de las uñas, que como dermatomicóloga algunas veces encuentro dificultades en su diagnóstico preciso.

Además de la variedad clínica, la onicomicosis presenta una gran diversidad etiológica, lo que plantea un desafío diagnóstico importante, ya que los métodos tradicionales, basados en la microscopía directa con hidróxido de potasio (KOH) y el cultivo para hongos, presentan limitaciones en términos de sensibilidad, especificidad y tiempo de obtención de resultados. En consecuencia, el diagnóstico puede ser incompleto, tardío o incluso incorrecto, lo que repercute negativamente en la elección del tratamiento antifúngico adecuado.

En las últimas décadas, el desarrollo de las herramientas de biología molecular ha transformado el campo del diagnóstico microbiológico. Técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, más

recientemente, la secuenciación de nueva generación por nanoporos, han abierto nuevas posibilidades para la identificación rápida y precisa de microorganismos. Estas permiten no solo reconocer agentes infecciosos con mayor sensibilidad, sino también caracterizar agentes que antes eran difíciles de detectar por los métodos convencionales.

La investigación que me inspira a escribir esta obra se enmarca en ese contexto de transición tecnológica, a través de un enfoque comparativo entre métodos diagnósticos tradicionales y las estrategias moleculares avanzadas. En ella se ofrece una evaluación del rendimiento de estas herramientas en el diagnóstico de la onicomicosis, y sus resultados ponen de manifiesto tanto las fortalezas de las técnicas convencionales, como el potencial emergente de los métodos moleculares para complementar el diagnóstico.

Adicional a su aporte metodológico, este trabajo ofrece una valiosa perspectiva epidemiológica, especialmente en Latinoamérica, donde los estudios sobre onicomicosis siguen siendo relativamente escasos. Al integrar análisis clínicos, micológicos y moleculares, busco proporcionar una visión más completa de la enfermedad y sentar las bases para futuras estrategias diagnósticas más precisas y eficientes.

Este libro se sitúa, por tanto, en la intersección entre la dermatología, la micología tradicional y las ciencias básicas. Su contribución radica no solo en la presentación de datos, sino también en la invitación a replantear los métodos diagnósticos vigentes, en un momento en que la medicina avanza hacia enfoques cada vez más integrados y tecnológicamente sofisticados.

Espero que las páginas que siguen sirvan tanto a clínicos como a micólogos, microbiólogos, investigadores y estudiantes, ofreciendo no solo información científica rigurosa, sino también un marco conceptual para reflexionar sobre el futuro del diagnóstico de las infecciones fúngicas, ya que mejorar su diagnóstico no es únicamente un avance técnico, sino un paso esencial hacia una medicina más precisa y, sobre todo, más eficaz en pro de la salud de los pacientes.

# JUSTIFICACIÓN

La onicomicosis es la infección crónica más común de las uñas, es la primera causa de patología ungueal, representa el 50% de las enfermedades de las uñas, compromete principalmente a los adultos entre los 20 y 49 años y afecta hasta 40% de las personas mayores de 60 años. Puede ser causada por dermatofitos, levaduras y mohos no dermatofitos (MND) y se manifiesta clínicamente por engrosamiento ungueal, cambios de coloración y onicolisis. La presencia de factores medioambientales como clima cálido y humedad favorecen su aparición (1).

La onicomicosis es cada vez más frecuente y provoca alto impacto psicológico en quienes la presentan; puede generar dolor local y eventualmente, agentes causales como *Fusarium* spp., llegan a invadir tejidos adyacentes convirtiéndose la uña en la puerta de entrada para una infección fúngica invasiva (IFI) en pacientes inmunocomprometidos (2-5) o generar infecciones sistémicas poniendo en riesgo la vida de los pacientes inmunosuprimidos o con enfermedades hematológicas.

La prevalencia de onicomicosis a nivel mundial varía entre 8 y 14% (6,7), en la revisión de la literatura colombiana no se hallaron estudios de prevalencia, no obstante, se encontraron seis artículos (8-13); cuatro

de ellos realizados en población inmunocompetente en las ciudades de Medellín, Manizales y Cali (8-11); de estos, sólo los trabajos de Pérez y cols. (9) y Villanueva y cols. (11), presentan información sobre las diversas formas clínicas de onicomicosis. Las otras dos publicaciones se relacionan con pacientes inmunocomprometidos (12,13).

El diagnóstico clínico de onicomicosis ha de confirmarse con el diagnóstico de laboratorio. Este, convencionalmente, se realiza mediante el examen directo microscópico con hidróxido de potasio (KOH) y el cultivo para hongos (7,14). El KOH permite la observación de artroconidias, hifas septadas hialinas o pigmentadas que sugieren un moho, o blastoconidias y pseudohifas que sugieren una infección por levaduras tipo *Candida* spp. Aunque es una herramienta rápida, útil y económica con una significativa sensibilidad de 85%, tiene como desventajas que no permite determinar la viabilidad de los elementos micóticos, requiere conocimiento, experiencia y habilidad para distinguir los elementos fúngicos de artefactos que pueden imitar estructuras micóticas y, además, presenta 5-15% de falsos positivos. Por lo tanto, solo con el examen microscópico no es posible la identificación del patógeno específico, por lo que se requieren los cultivos para el aislamiento e identificación del agente etiológico (15).

A partir del crecimiento del hongo en los cultivos como agar Sabouraud y agar Mycosel® se puede llegar a determinar el género y la especie por diferentes metodologías. El cultivo tiene una sensibilidad baja (menos de 40%), con una alta especificidad (100%) y un alto porcentaje de falsos negativos (30- 50%) (11). Este procedimiento requiere que la muestra contenga una cantidad suficiente de células fúngicas viables. La presencia de microorganismos saprofitos en la uña o la contaminación del medio de cultivo con hongos del ambiente y no procedentes de la muestra, retardan el diagnóstico por este medio, debido a la dificultad para determinar si el hongo aislado es en realidad el agente etiológico (7,14). Es muy importante definir los agentes causales para seleccionar el tratamiento adecuado, ya que los hongos dermatofitos, las levaduras y los MND tienen un comportamiento variable frente a los diferentes antifúngicos; por consiguiente, la identificación correcta disminuye la

falla terapéutica y también alerta sobre una eventual invasión a tejidos adyacentes de agentes como *Fusarium* spp. La tasa de diagnóstico basada en el cultivo es baja, con la limitación que los hongos filamentosos requieren mayor tiempo para su crecimiento (entre 2 a 4 semanas) y el personal debe estar entrenado y con el conocimiento necesario para la identificación precisa, ya que esta depende de la observación macroscópica y microscópica del cultivo (7,15).

Con el propósito de complementar los métodos convencionales en el diagnóstico micológico, surgen como alternativa las pruebas moleculares empleadas con mucho éxito para identificar virus y bacterias. En los últimos 15 años se han desarrollado para el diagnóstico de las onicomicosis, técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que buscan superar las desventajas que presentan los cultivos, encontrando en algunos estudios, resultados superiores a los métodos convencionales con una identificación precisa de los agentes causales.

Actualmente para el diagnóstico de onicomicosis se está utilizando la PCR convencional, la PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) y la secuenciación del ADN (15), pero desafortunadamente no se encuentran de uso rutinario en los laboratorios clínicos; solo se usan en investigación para la detección de los principales agentes causales (14-18). Los métodos de PCR convencional suelen ser simples y económicos, tienen un tiempo de respuesta más largo y pueden asociarse con un mayor riesgo de contaminación de material genético proveniente de otra muestra, del personal de laboratorio o del ambiente por productos de amplificación generados en reacciones previas, mientras que los métodos de qPCR y secuenciación expanden la posibilidad de reconocimiento simultáneo de múltiples especies (17,18).

Las investigaciones efectuadas en el campo de la biología molecular para el diagnóstico micológico se han realizado principalmente en Japón; Miyajima y cols. (2013) (18) desarrollaron y estandarizaron una nueva qPCR con una sonda y un conjunto de cebadores panfúngicos y sondas específicas para *Trichophyton rubrum* y *T. interdigitale*, constituyéndose en

uno de los métodos disponibles más rápidos y sensibles para diagnosticar dermatofitosis en muestras de pacientes con *tinea ungüium o tinea pedis* (16). Después se modificó para mejorar su operatividad y a la fecha se encuentran algunos estuches comerciales de qPCR para el diagnóstico de onicomicosis (18).

Al realizar la revisión bibliográfica no se encontraron trabajos realizados con datos colombianos acerca del diagnóstico molecular de onicomicosis; mientras que, en Latinoamérica, se encontró sólo una publicación realizada en Argentina (19). Debido a la ausencia de estudios con pruebas moleculares en Colombia y a la importancia que en este momento estas tienen para el diagnóstico de agentes infecciosos, se consideró necesario llevar a cabo la presente investigación sobre el diagnóstico de onicomicosis que compare los métodos convencionales con los moleculares. Los datos obtenidos de este trabajo buscan detectar e identificar los agentes causales más prevalentes de esta entidad. Para este fin, los resultados de las pruebas convencionales se cotejan con los resultados obtenidos con la técnica de PCR convencional y la secuenciación de nueva generación (NGS) por nanoporos, realizados en una población con onicomicosis que consulta a la sección de Dermatología de un hospital de tercer nivel en Cali.

Con este proyecto también se busca implementar y estandarizar la técnica de PCR convencional en el diagnóstico de onicomicosis en el laboratorio de agentes biológicos – área de micología del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle, para abrir camino en el diagnóstico molecular de otro tipo de enfermedades micóticas, como las infecciones fúngicas invasivas (IFIs), altamente mortales.

Los resultados de esta investigación establecen un panorama epidemiológico más claro y actualizado de los pacientes con onicomicosis, para así lograr un diagnóstico adecuado y oportuno, con el conocimiento de los agentes etiológicos más frecuentes y dirigir el tratamiento de una forma más específica y eficaz.

# CAPÍTULO I

# MARCO CONCEPTUAL

## 1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ONICOMICOSIS

La onicomicosis es una infección crónica recurrente de las uñas y la primera causa de enfermedad ungueal a nivel mundial, causando el 50-60 % de todas las onicopatías; se caracteriza por onicolisis, hiperqueratosis subungueal y cambios en la coloración ungueal (7,20). Entre los principales factores de riesgo intrínsecos se encuentran la tiña del pie, la edad avanzada (mayor de 60 años), el género masculino, las anormalidades en la morfología de la uña, la diabetes, el VIH, las inmunodeficiencias, las malignidades, la historia familiar de onicomicosis, los factores genéticos (HLA-DR8), la enfermedad vascular periférica, el síndrome de Down, el hipotiroidismo, la psoriasis, la enfermedad renal y la presencia de hallux valgus (7,21,22). Entre los factores extrínsecos se destacan el trauma repetitivo, las actividades deportivas, el tabaquismo y el uso de calzado oclusivo (21-24).

La prevalencia mundial de esta micosis oscila entre 8-14 % y varía según la región geográfica; por ejemplo, entre el 1 % al 8 % en Europa y Estados Unidos (7). Los países con mayor prevalencia en Latinoamérica

son México y Brasil, con cifras que oscilan entre el 6 y 45 % (20,22). En Colombia, no se conocen datos (8-11).

Los diversos estudios muestran que la prevalencia de esta entidad aumenta con la edad, en adultos mayores de 60 años se ha informado valores hasta de 20,7 % (20,25,26), mientras que en la población pediátrica es rara, hallándose cifras de 0,2-2,6 % (27); las diferencias entre estas dos poblaciones etarias puede deberse a características diversas presentes en la población infantil como la placa ungueal, menor exposición a traumas, mayor rapidez en el crecimiento ungueal (que lleva a una eliminación más rápida del hongo), menor exposición a hongos en sitios públicos y menor frecuencia de tiña pedis (27,28).

En Colombia no hay estudios de prevalencia global, solo se encuentran datos aislados correspondientes a diferentes ciudades. En un estudio efectuado en Medellín, entre 1994-2003, con los registros de 7.024 pacientes atendidos en el laboratorio de micología, se encontró que el cultivo permitió el aislamiento del agente etiológico en 67,5 % de las muestras de las uñas de las manos y en 59,4 % de las de los pies (8).

El estudio de Álvarez y cols. (10) evaluó las características epidemiológicas y micológicas de 299 pacientes con lesiones ungueales remitidos a tres laboratorios de la ciudad de Cali. En él se encontró una tasa de detección de onicomicosis de 61,2 % (183 casos), de los cuales 141 (77 %) se localizaban en las uñas de los pies, 38 (20,8 %) en uñas de las manos, y 4 (2,2 %) tanto en las manos como en los pies (10).

En una investigación prospectiva realizada en la ciudad de Cali en un hospital nivel III del suroccidente colombiano se ejecutó una búsqueda intencionada de onicomicosis y se halló que, de los 50 participantes con sospecha clínica, en 48 (96 %) el examen directo (KOH) fue positivo y en 29 (58 %), el cultivo fue positivo (11).

## 1.2 ETIOLOGÍA

La onicomicosis es producida por hongos dermatofitos, levaduras y mohos no dermatofitos (7). El primer grupo es responsable de la mayoría de las infecciones; los dos últimos son generalmente invasores secundarios a alteraciones o traumatismos previos de la uña, mientras que los dermatofitos ocasionan infecciones primarias. La distribución de estos agentes causales varía de acuerdo con la ubicación geográfica (Tabla 1), la raza y los factores de riesgo asociados (29).

En los países occidentales el 80-90 % de esta afección micótica es causada por dermatofitos, el 5-17 % por levaduras y del 2-3 % por MND. Las especies de dermatofitos que presentan la mayor prevalencia son: *Trichophyton rubrum* y *T. interdigitale* con un 69-92,7 % y un 5,4 % respectivamente, seguidos por *Microsporum canis* con un 2,9 %. Con relación a las levaduras, la especie más aislada es *Candida albicans*, otras especies incluyen el complejo *C. parapsilosis, C. tropicalis, Nakaseomyces glabratus* (antes *C. glabrata*), entre otras (30). Respecto a los MND los más informados son: *Neoscytalidium dimidiatum, Fusarium* spp. *Aspergillus* spp., *Geotrichum candidum y Scopulariopsis* sp. (20,31-33).

En Argentina, Relloso y cols. (31), hallaron en uñas de los pies 82,8 % de dermatofitos, 12,3 % de levaduras y 4,8 % MND; en uñas de las manos: 17 % dermatofitos, 75 % levaduras del género *Candida*, 2,05 % MND y 1,5 % otros hongos levaduriformes. El dermatofito encontrado con más frecuencia fue *T. rubrum* (86,5 %), seguido por *T. interdigitale* (10 %) y *T. tonsurans* (3 %).

Un estudio realizado en México determinó la frecuencia de onicomicosis en niños, los agentes etiológicos más comunes fueron especies del género *Candida* (66,7 %). En este trabajo incluyeron 126 pacientes pediátricos entre 2 meses y 17 años y reportaron 6 casos de onicomicosis (4,8 %) con un promedio de edad de 14,2 años, hallando una correlación positiva entre la edad y la probabilidad de presentar esta afección, es decir que, a mayor edad del paciente, mayor riesgo de presentar onicomicosis (27).

**Tabla 1.**
*Distribución porcentual de los grupos de agentes etiológicos de onicomicosis encontrados a nivel mundial.*

| | Canadá[20]* % | | Argentina[31]* % | | USA[32]* % | México[33]* % | Europa[6]* % | Japón[17]* % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Localización** | M | P | M | P | MyP | MyP | MyP | MyP |
| **Dermatofitos** | 70,8 | 90,5 | 17 | 82,8 | 60-70 | 85-90 | 65 | 92 |
| **Levaduras** | 29,2 | 1,7 | 75 | 12,3 | 10-20 | 8-10 | 21,7 | 1,6 |
| **Mohos no dermatofitos** | 0 | 7,8 | 2 | 4,8 | 17 | 1-5 | 13,3 | 0 |
| **Mixta** | 0 | | 0 | | 3 | 0 | 0 | 6,4 |

*Referencia; M:uñas de manos; P: uñas de pies; MyP: uñas de manos y pies, en estos estudios no especifican la localización.

En Colombia, en los estudios realizados en Medellín y Cali (8,10) se encontró predominio de levaduras en uñas de las manos, mientras que en las de los pies se encontró prevalencia de dermatofitos. En estos dos trabajos los MND más frecuentes fueron *Fusarium sp.* y *Neoscytalidium dimidiatum,* también se hallaron en menor proporción infecciones mixtas. En Medellín (8) el porcentaje más alto de levaduras fue en uñas de las manos, mientras que, en Cali (10) fue en uñas de los pies.

Zuluaga y cols. (8) en una investigación retrospectiva realizada en Medellín, entre 1994-2003, en 7.024 pacientes, indican que los hongos causantes de las lesiones en las uñas de los pies fueron, en orden de frecuencia, *T. rubrum* 17,5 %, *C. parapsilosis* 16,7 %, *Fusarium* spp. 13,8 %, *T. mentagrophytes* 11,5 % y *Neoscytalidium dimidiatum* 10.1%; y en las uñas de manos los principales fueron especies de *Candida*, sobresaliendo *C. albicans* 23,4 %, seguida de *C. parapsilosis* 20,8 %, *C. tropicalis* 7,5 %, *C. guilliermondii* (actualmente *Meyerozyma guilliermondii*) 4,8 % y *Candida* spp. 12,4 % (8).

En cuanto a las otras dos publicaciones, una de Manizales (9) y la otra de Cali (11), se señala que en la primera prevalecieron los dermatofitos, mientras que en la segunda de forma similar a lo reportado por Zuluaga

y cols.(8) y Álvarez y cols. (10), fueron las levaduras. En Manizales, Pérez y cols. (9) realizaron un estudio descriptivo y prospectivo de 232 pacientes mayores de 16 años con diagnóstico clínico de onicomicosis. Ellos identificaron 146 aislamientos en los que la presentación clínica más frecuente fue la distal, la cual se asoció principalmente al uso de calzado oclusivo y predominó en el género femenino; el número de casos de lesiones ungueales indicativas de onicomicosis fue menor en mayores de 70 años y los agentes más frecuentemente aislados fueron *T. rubrum* (26,7 %), *Fusarium* spp. (14,4 %), *T. mentagrophytes* (11 %), *C. tropicalis* (11 %), *C. krusei* (actualmente *Pichia kudriavzevii*) (6 %) y *Geotrichum candidum* (6 %) (9).

En un estudio realizado en Cali por Villanueva y cols. (11), en un hospital nivel III del suroccidente, en los pacientes con onicomicosis encontraron que el género *Candida* fue el agente aislado con mayor frecuencia en 68.9%, seguido por los dermatofitos *T. rubrum*, 24,1 %, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans* en 3,4 % cada uno, y *Trichosporon* spp. (hongo levaduriforme) en 3,4 % (11).

En la Tabla 2 se presentan tres trabajos que muestran la frecuencia de los diferentes grupos etiológicos de onicomicosis en diferentes ciudades de Colombia. En dos de ellos hay predominio de los dermatofitos.

**Tabla 2.**
*Distribución de los agentes etiológicos de onicomicosis encontrados en Colombia.*

| | **Cali [10]* %** | | **Manizales [9]* %** | **Medellín [8]* %** |
|---|---|---|---|---|
| **Localización** | M | P | MyP | MyP |
| **Dermatofitos** | 2,7 | 35,3 | 45,2 | 22 |
| **Levaduras** | 18,7 | 22 | 32,9 | 42 |
| **Mohos no dermatofitos** | 1,3 | 12,7 | 21,9 | 20 |
| **Mixta** | 2,6 | 4,7 | 0 | 16 |

*Referencia; M:uñas de manos; P: uñas de pies; MyP: uñas de manos y pies, en estos estudios no especifican la localización.

## 1.3 ETIOPATOGENIA DE LAS DERMATOFITOSIS

Los principales agentes etiológicos de onicomicosis son los dermatofitos; entre sus factores de virulencia están las queratinasas encargadas de digerir la queratina y liberar antígenos como el manano, y enzimas elastasas y lipasas, las primeras presentes en la enfermedad aguda y las segundas en la crónica. Los antígenos fúngicos activan las células T supresoras y colaboradoras del hospedero, siendo la inmunidad celular la encargada de modular la respuesta inflamatoria frente a la infección por estos patógenos (34,35).

Los diferentes factores de virulencia de los dermatofitos participan en las tres etapas del proceso de infección: adhesión, invasión y crecimiento. La adherencia está mediada por glicoproteínas presentes en la pared celular y que actúan como adhesinas, reconociendo en el hospedero receptores con manosa y galactosa; dos a tres horas post-adhesión ocurre la germinación de las conidias formando unas proyecciones unidas firmemente a la superficie del estrato córneo (invasión) lo que evita que estas sean eliminadas con la descamación del epitelio. Entre otros factores de virulencia de los dermatofitos se mencionan la producción de un complejo de enzimas proteolíticas, como permeasas, nucleasas, lipasas, proteasas no específicas y queratinasas, las cuales participan en la obtención de nutrientes para su crecimiento e invasión (34).

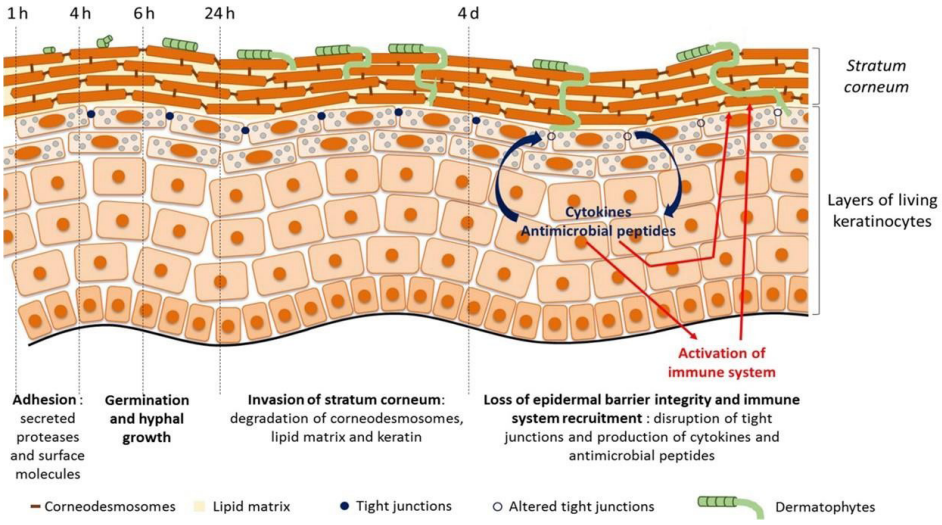
Lo anterior está influenciado por la naturaleza del hongo: geofílicos y zoofílicos (más inflamatorios) y antropofílicos (menos inflamatorios), estos últimos con evolución paralela a la pérdida de conidias y de la reproducción sexual, causando infección crónica, con una respuesta inflamatoria intensa o débil, con una respuesta linfohistiocitaria superficial, presencia de células inflamatorias como neutrófilos, células gigantes perifoliculares o comensalismo hongo - hospedero. También se ha descrito una predisposición genética (HLA-DR8) y personas con resistencia natural a la infección (34,35).

Los dermatofitos se caracterizan por su capacidad invasiva, una hora después de la infección por el contacto con las artroconidias, éstas se

adhieren a la superficie por un mecanismo que involucra proteasas y moléculas de superficie secretadas por los hongos. Después de 4 h, comienza la germinación de las artroconidias, los tubos germinales crecen para formar hifas septadas detectadas a partir de la sexta hora de infección. Veinticuatro horas después de la entrada de las artroconidias y durante los 3 días siguientes a la infección, las hifas invaden la capa córnea progresando a través de espacios intercelulares y entre los onicocitos, muy probablemente como resultado de la degradación de corneodesmosomas, de la matriz lipídica extracelular y la queratina. En el cuarto día de infección, las hifas alcanzan la capa granular. En esta etapa, se pierde la integridad de la barrera epidérmica en respuesta a la alteración de uniones estrechas. Simultáneamente, los onicocitos presentan una mayor expresión y liberación de citocinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos, que luego serán responsables del control y eventual resolución de la infección o de infectar tejidos queratinizados contiguos (35). (Figura 1).

**Figura 1.**

*Modelo in vitro de infección por dermatofitos. Tomado de: Faway É, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. In vitro models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. Exp Dermatol. 2018; 27(8):915-922(35).*

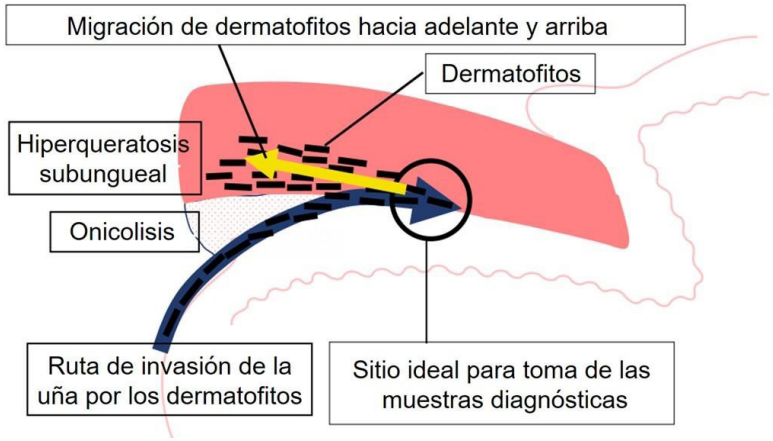



La onicomicosis es el resultado de la invasión de los hongos a través del extremo distal o lateral de la uña, dependiendo de la variedad clínica. Generalmente se asocia con la presencia de *tinea pedis,* a partir de ese

foco infeccioso el hongo invade la capa de células córneas del lecho ungueal. Las uñas son ricas en queratina, pero tienen bajo contenido de agua, sin embargo, el lecho ungueal cerca de la dermis tiene un mayor contenido de agua que la placa de la uña y es por lo tanto más vulnerable a la invasión de hongos y a su crecimiento local. A medida que crece la uña, los hongos que han invadido el lecho ungueal se mueven hacia adelante y/o hacia arriba. La invasión hace que el tejido subungueal sea más débil y polvoriento, lo que causa la hiperqueratosis subungueal. La eliminación de esta hiperqueratosis genera el desprendimiento de la placa ungueal con el posterior secado del tejido local por exposición al aire, lo que podría conducir a una degeneración del hongo y/o a la inhibición de su crecimiento (14). (Figura 2).

**Figura 2.**

*Patogénesis de la onicomicosis. Modificado de: Watanabe S, Ishida K. Molecular diagnostic techniques for onychomycosis: validity and potential application. Am J Clin Dermatol. 2017; 18:281-286 (14).*




## 1.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA

La onicomicosis se caracteriza por engrosamiento de la lámina ungueal, desprendimiento parcial de la uña y coloración amarillo-café. Se clasifican clínicamente en onicomicosis subungueal distal y lateral, subungueal proximal blanca superficial, endonyx y distrófica total, de éstas, la distal y lateral son las formas clínicas más comunes. Con relación a la localización anatómica, la onicomicosis es más común en las uñas de los pies y predomina la afectación de la uña del primer dedo (7,32,36,37).

## Onicomicosis subungueal distal (OSD):

Comienza en el hiponiquio y la zona distal o lateral del lecho ungueal, produciendo hiperqueratosis de éste, engrosamiento de la placa ungueal, cambio de coloración y onicolisis (Figura 3). Se observa más en las uñas de los pies. Es causada principalmente por dermatofitos y MND (32,36,37).

**Figura 3.**
*Onicomicosis subungueal distal lateral. Se observa onicolisis y xantoniquia en la región lateral de la uña (borde flecha). Fotografía de paciente del estudio tomada con su consentimiento informado.*



## Onicomicosis subungueal proximal (OSP):

Es infrecuente en los sujetos sanos, se asocia con inmunosupresión (aproximadamente en 87 % de los pacientes con VIH). El agente más común es *T. rubrum*. Se observa con la misma frecuencia tanto en uñas de manos como de pies, invade pliegue ungueal proximal y posteriormente penetra en la placa ungueal recién formada (32,36,37).

## Onicomicosis blanca superficial (OBS):

En este patrón clínico se invade la placa, lecho ungueal e hiponiquio; inicialmente aparece blanca y quebradiza con aspecto moteado en la región superficial, puede llegar a afectar toda la uña. El patógeno más frecuente es *T. mentagrophytes* (29).

## Onicomicosis distrófica total (ODT):

Es producto de la progresión de cualquiera de los tipos clínicos anteriores a una forma más severa, en la cual hay una completa destrucción de la uña, aumento de su espesor y pérdida de toda su arquitectura (38) (Figura 4).

**Figura 4.**
*Onicomicosis distrófica total en uñas de los hallux. Se observa hiperqueratosis, cambio de coloración y distrofia ungueal en las uñas afectadas. Fotografía de paciente del estudio tomada con su consentimiento informado.*



## Endonyx:

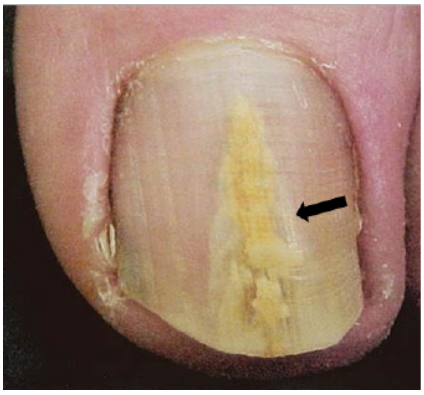
Corresponde a la invasión fúngica masiva de las capas superficiales y profundas de la placa ungueal con hiperqueratosis mínima o ausente, por lo general el extremo de la placa es friable y se divide, en ocasiones se puede observar opacificación densa de la placa con decoloración blanquecina; es causada usualmente por *T. soudanense* y en algunos casos *T. violaceum* (30).

Además de las formas clínicas anteriormente descritas, otros hallazgos clínicos son:

**Dermatofitoma:**

Se observa como un área lineal blanco-amarillenta y densa o redonda blanca, la lámina sobre estas superficies es onicolítica y cuando se corta hacia atrás revela una masa hiperqueratósica gruesa resistente a la terapia antifúngica tópica y sistémica (38) (Figura 5).

**Figura 5.**
*Dermatofitoma en uña de hallux. Se observa una masa blanca amarillenta circunscrita del hongo dentro de la placa ungueal. Fotografía tomada de Burkhart et al. (38).*



La onicomicosis por *Candida*, además de la onicomicosis subungueal distal y lateral, también se manifiesta clínicamente en forma de paroniquia, onicolisis, melanoniquia o candidiasis mucocutánea crónica.

**Paroniquia:**

Esta variedad clínica es la más frecuente, produce tumefacción y eritema de pliegues ungueales. Es común en personas que permanecen con humedad en las manos.

**Onicolisis:**

Se presenta con despegamiento del área distal de la uña. Se considera que *Candida* sea la causa o colonice secundariamente la uña onicolítica (Figura 6).

**Figura 6.**
*Uñas de manos de participante con onicolisis en todas las uñas de la mano. Fotografía de paciente del estudio tomada con su consentimiento informado.*



**Melanoniquia:**

Cursa con una banda longitudinal de pigmentación blanca, marrón o grisácea en la lámina ungueal. Normalmente, afecta a una sola uña, aunque puede presentarse de forma múltiple.

**Candidiasis mucocutánea crónica:**

Es una inmunodeficiencia hereditaria, que consiste en una infección persistente o recidivante por *Candida* debida a una disfunción de los linfocitos T. Este hongo invade directamente la placa ungueal y posteriormente se engrosan los pliegues ungueales proximales y laterales hasta que la uña adquiere aspecto distrófico. También hay compromiso de piel y otros órganos.

## 1.5 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la onicomicosis se basa en los hallazgos clínicos (onicolisis, hiperqueratosis subungueal, cambios de coloración), y en la confirmación micológica que comprende el examen directo con KOH,

el cultivo y la identificación del agente etiológico (7). La confirmación diagnóstica de las onicomicosis depende de varios factores que se deben tener en cuenta con el fin de obtener unos resultados certeros y confiables, como son la adecuada recolección de las muestras (detrito subungueal o fragmento de la uña afectada), el sitio de la toma de la muestra dependiendo de la forma clínica y de personal entrenado y con experiencia para hacer las observaciones microscópicas.

Existen principalmente dos tipos de métodos diagnósticos: métodos convencionales y métodos moleculares (7,39).

### 1.5.1 Métodos convencionales:

Los métodos diagnósticos convencionales se basan en la detección de elementos fúngicos mediante microscopía directa con solución de hidróxido de potasio (KOH) y de un cultivo e identificación morfológica del agente etiológico.

#### *1.5.1.1 Microscopía directa*

El examen directo se realiza entre portaobjetos y cubreobjetos con KOH al 10 % o 20 % con tinta Parker azul-negra. Consiste en la visualización microscópica de estructuras fúngicas características que permite sugerir si se trata de un moho o de una levadura. Es un método diagnóstico económico y rápido pero su principal inconveniente es que es dependiente del operador ya que requiere experiencia para observar e identificar las estructuras fúngicas y habilidad para interpretar los hallazgos microscópicos, se reporta sensibilidades entre 44 % y 100 %. Además del KOH, también se pueden utilizar negro de clorazol o una coloración fluorescente como el blanco de calcoflúor para mejorar la visualización de las estructuras micóticas; sin embargo, independiente de la sustancia utilizada, el examen directo no permite determinar la viabilidad de los elementos micóticos, ni la identificación específica del patógeno, por lo cual se requiere realizar cultivos (7,15).

El examen microscópico sigue siendo la herramienta más utilizada para el diagnóstico de la onicomicosis (Figura 7). Es la técnica diagnóstica disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos.

**Figura 7.**
*Examen directo para hongos (KOH): hifas hialinas septadas. 40x.*
*Fotografía cortesía Dra. María Inés Álvarez.*



*1.5.1.2 Cultivo para hongos*

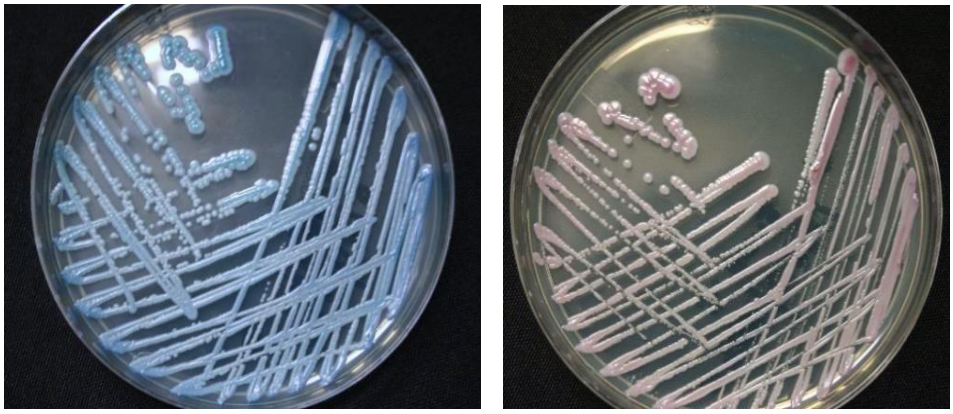
El cultivo es un método que permite realizar la identificación del agente etiológico, se utilizan de rutina los medios agar Sabouraud-dextrosa adicionado con antibacterianos y agar Mycosel®, los cuales se incuban a temperatura de 25 °C - 28 °C. El crecimiento de hongos levaduriformes se obtiene entre 48-72 horas incubado a una temperatura de 25 ºC - 30 ºC, los MND de tres a cinco días y los dermatofitos de 2 a 3 semanas.

El cultivo para hongos se considera el estándar de oro, pues permite el reconocimiento del agente causal lo cual ayuda a seleccionar el tratamiento apropiado. Para que este sea exitoso se requiere que la

muestra contenga una cantidad suficiente de células fúngicas viables, pero aún en condiciones idóneas, éste presenta una sensibilidad cercana al 50 % y su crecimiento puede tardar hasta 4 semanas, lo que retarda el diagnóstico. La presencia de los MND genera dudas de su patogenicidad, debido a que pueden ser contaminantes, por lo tanto, es importante interpretarlos con los siguientes criterios revisados por Gupta (40): visualización de estructuras micóticas en el examen directo, aislamiento abundante en un cultivo puro, desarrollo del mismo hongo en cultivos repetidos con ausencia de dermatofitos. Para cumplir con estos criterios, se requiere más tiempo, además del conocimiento morfológico de los hongos necesario para la identificación de los diferentes agentes causales (40). El cultivo presenta en las diferentes series publicadas una especificidad cercana al 100%, con una sensibilidad menor que varía de acuerdo con la publicación, en promedio 56 %, con un rango amplio, entre 29 % y 82 %. Este procedimiento puede presentar falsos negativos entre el 30 % y 50 % (7,15).

Otros medios de cultivo empleados son los medios cromogénicos, los cuales son selectivos para el aislamiento e identificación presuntiva de microorganismos, entre ellos está el CHROMagar Candida® (CHROMagar Company, Paris, France), el cual contiene un sustrato cromógeno que reacciona con enzimas específicas secretadas por las levaduras del género *Candida*, y de acuerdo con la especie, produce colonias de diferentes colores: las de *C. albicans* verdes, las de *C. tropicalis* azul oscuro o azul metálico, las de *Pichia kudriavzevii* (antes *C. krusei*) aparecen rosadas oscuro y las de *Nakaseomyces glabratus* (antes *C. glabrata*), rosadas claro (Figura 8). La sensibilidad y especificidad de este medio diferencial es similar al del agar Sabouraud (56 %-100 % respectivamente), adicionalmente permite reconocer simultáneamente la presencia de más de una especie de *Candida*, lo cual no es posible establecer en agar Sabouraud dada la similitud morfológica que presentan en este medio las diferentes especies de *Candida*.

**Figura 8.**
*Aislados en ChromAgar Candida®: A. Candida tropicalis. B. Nakaseomyces glabratus. Fotografías cortesía Dra. María Inés Álvarez.*



*1.5.1.3 Estudio histopatológico:*

Además del estudio micológico, se ha descrito la histopatología con coloración de ácido peryódico de Schiff (PAS) de la lámina ungueal obtenida por recorte de las uñas o por biopsia por sacabocado, el cual, no hace parte de los métodos diagnósticos convencionales. Este procedimiento no es usado de rutina en el diagnóstico de onicomicosis por ser invasivo, doloroso y tener la posibilidad de causar onicodistrofia. Tiene una sensibilidad (82-91 %) mayor que la del examen directo (KOH) (48 %) y que la del cultivo (56 %) (40), pero tiene la desventaja de no permitir identificar el agente etiológico ni diferenciar entre hifas vivas o muertas, por tanto, este estudio no aporta información adicional al examen microscópico directo para hongos (KOH), mientras que el cultivo permite identificar el microorganismo causal (2,11,41).

## 1.5.2 Métodos moleculares:

Las pruebas diagnósticas moleculares detectan y cuantifican marcadores biológicos en el ADN, el ARN o en las proteínas con el fin de identificar causas genéticas, oncológicas o infecciosas. Se clasifican de acuerdo a su metodología dependiendo si detectan una única mutación hasta si realizan la secuenciación completa del genoma en: técnicas de amplificación (PCR, qPCR y RT-PCR), técnicas de hibridación y técnicas

de secuenciación (De primera generación: secuenciación de Sanger, de segunda generación: secuenciación de nueva generación y de tercera generación: secuenciación de nueva generación por nanoporos) (38).

En los últimos años, la biología molecular ha complementado el diagnóstico convencional de las onicomicosis, sin embargo, la mayor limitación para el uso de estas técnicas son los elevados costos. Habitualmente este tipo de herramientas se usan acompañadas de las pruebas micológicas (7,42-44).

La PCR convencional, se basa en la amplificación del material genético de los microorganismos. Esta prueba permite la identificación más objetiva, con menor tasa de falsos negativos comparada con los métodos de identificación basados en el cultivo (14,15,18). Tiene como desventaja el alto costo y la identificación de otros microorganismos no invasivos (falsos positivos), con un valor predictivo positivo de 93 % y un valor predictivo negativo de 87 % (42,43). Algunos estudios han reportado una sensibilidad hasta del 78% y una especificidad del 90 %, sin embargo, se debe tener en cuenta que con esta técnica se puede detectar ADN contenido en elementos fúngicos muertos (43). De los métodos diagnósticos moleculares, suele ser el más simple y económico, pero tiene un tiempo de respuesta más largo (15).

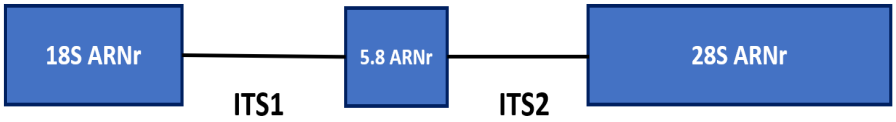
En cuanto a la técnica de PCR, se requiere una extracción de ADN de la muestra de las uñas, posteriormente se realiza la amplificación del ADN y luego se analizan los productos por electroforesis en gel (convencional) o por emisión de fluorescencia (tiempo real o qPCR). Se debe tener en cuenta que existen variaciones en cada laboratorio en cuanto a los métodos de extracción del ADN, el uso de cebadores (específicos para cada especie de dermatofitos, o pandermatofíticos o panfúngicos) y el método de análisis de los productos (16,39).

También se ha usado la secuenciación, que consiste en realizar una PCR para amplificar la región de interés a través de un solo producto de PCR, e identificar su secuencia. Entre los diversos tipos de secuenciación, una de las más avanzadas es la secuenciación de nueva generación (SNG)

por nanoporos, la cual implica la lectura del código de cadenas únicas de ADN a medida que se las enlaza a través de poros extremadamente pequeños (nanoporos) insertados en una membrana. A medida que el ADN se desplaza a través del poro, crea señales que se pueden convertir para leer cada base. La longitud de las secuencias generadas y la cantidad de datos que se producen por celda de flujo mediante el uso de la Tecnología de Oxford Nanopore (ONT) para la secuenciación de la región de interés, producen datos que, con la aplicación de flujos bioinformáticos permiten compararlas con secuencias conocidas y almacenadas en una base de datos para realizar una clasificación taxonómica de un agente causal (7,39,43).

La identificación molecular de los hongos se ha realizado por medio del análisis de diferentes regiones del genoma como la 18S del ARN ribosomal (ARNr), región 28S del ARNr, la región del espaciador transcrito interno (ITS) y la región 1 de quitina sintasa (CHS1) (1,5,14,15). La identificación morfológica de las especies de dermatofitos en los cultivos es a veces difícil o incierta porque hay variaciones de un aislado a otro y caracteres superpuestos entre las especies, mientras que las secuencias de ADN son muy útiles para una determinación precisa (5,14,15). El polimorfismo de los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 que flanquean el ADNr 5.8S es muy sensible y confiable para distinguir diferentes especies. Las secuencias de ADNr 28S también resultan adecuadas para la identificación de especies de dermatofitos, pero es menos discriminatorio. Por lo anterior, existe consenso en la selección de la región del espaciador transcrito interno (ITS) como el blanco más adecuado para identificar la mayor parte de las especies de hongos, ya que los hongos, utilizan como código de barras las secuencias de ITS1 e ITS2. La ITS1 se encuentra entre los genes de ARNr 18S y 5.8S, mientras que ITS2 está entre los genes de ARNr 5.8S y 28S. Lo más relevante de la secuencia ITS es que no hay genes insertados en la región, por lo que se desarrolla sin ningún tipo de restricciones. Debido a esta propiedad, el ITS se utiliza para diferenciar entre miles de especies de hongos (1,5,14,15). En la Figura 9 se muestran las diferentes regiones de interés en la identificación molecular de los hongos.

**Figura 9.**
*Esquema del genoma de los hongos. Se observan las principales regiones blanco a transcribir en la identificación de los hongos. Figura de elaboración propia.*




Los genes que codifican la topoisomerasa II y la quitina sintasa 1 también se han utilizado como blancos para identificar dermatofitos a nivel de especie (15,39,42). Una gran desventaja actual en la identificación de especies de dermatofitos mediante la comparación de secuencias es que a menudo es problemática al utilizar la base de datos NCBI disponible públicamente, pues se encuentran secuencias idénticas bajo diferentes nombres (especialmente secuencias ITS y 28S) como por ejemplo la nomenclatura de especies como las del complejo *T. mentagrophytes* que es aún motivo de debate o porque los depositantes de secuencias también identificaron erróneamente las cepas. Una forma de evitar este problema es utilizar directamente la base de datos de secuencias de ITS disponible públicamente en el sitio web de dermatofitos Centraalbureau voor Schimmelcultures (http: //www.cbs. knaw.nl/dermatophytes/) (45,46).

## 1.6 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD Y TRATAMIENTO

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por su sigla en inglés) ha aprobado solo la terbinafina e itraconazol oral como tratamientos sistémicos. Entre los medicamentos tópicos aprobados se encuentran amorolfina, ciclopirox, efinaconazol y tavaborol, así como manejos complementarios con láser; también hay otras alternativas, como la terapia fotodinámica, sin embargo, no se cuenta con estudios grandes aleatorizados que demuestren su eficacia (32,37,38,40)

Se ha logrado la estandarización de pruebas de laboratorio que permiten determinar la sensibilidad y resistencia de las levaduras del género *Candida*. El Instituto para Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI), describió el método estándar de macrodilución y microdilución en caldo para determinar cuantitativamente la sensibilidad *in vitro* de levaduras por concentración inhibitoria mínima (CIM o MIC en inglés); así evalúan la resistencia a los medicamentos antimicóticos, de acuerdo con la metodología del documento M27M44S 3.ª edición de agosto 2022 del CLSI. Además, se cuenta con el método de difusión en disco el cual está estandarizado por CLSI y otros métodos comerciales como Sensititre (Thermo Scientific) y automatizados como VITEK 2 (bioMérieux) y se han desarrollado pruebas basadas en los gradientes de difusión como Etest (AB Biodisk, Solna, Suecia) que ha demostrado buena concordancia con el método de referencia (47-49).

La resistencia a los medicamentos antimicóticos es un problema creciente y ha tomado relevancia clínica y epidemiológica en la última década. Es usualmente medida a través de la cuantificación de la CIM, sin embargo, existen actualmente otros protocolos y métodos moleculares, muchos de los cuales hasta el momento no han sido estandarizados. Además, la demostración de resistencia *in vitro*, por lo general no tiene relación con la resistencia *in vivo* (48,50). Los factores bioquímicos y moleculares que se han asociado a la resistencia incluyen: la reducción del ingreso del medicamento a la célula, modificación del metabolismo del hongo, cambios en la interacción de la droga al sitio de acción o a las enzimas involucradas en su metabolismo; mutaciones puntuales e incremento del eflujo del medicamento, cambios o alteraciones en el ergosterol y la formación de biopelículas, entre otros (51).

En la clínica se observa que los dermatofitos se asocian frecuentemente con recaídas posteriores a la suspensión del medicamento, esta resistencia está asociada con el incremento de los casos en los últimos años y con factores tales como el uso inadecuado o irregular de medicamentos, estados de inmunosupresión, al sitio afectado, la severidad de la infección y la farmacocinética del medicamento (52,53).

Existen muchos reportes de resistencia al fluconazol por especies de *Candida* causantes de onicomicosis (52,53), así como también algunos reportes recientes de resistencia a la terbinafina en las infecciones superficiales de la piel y las uñas (54). También se ha encontrado aumentada la resistencia a fluconazol en especies de *Candida* no *albicans* aisladas de cavidad oral de pacientes con diagnóstico de VIH, probablemente vinculado al uso empírico e indiscriminado de este fármaco, lo cual también podría explicar el incremento de resistencia en su uso en onicomicosis (55).

En un trabajo publicado por Gupta y cols. en 2003, en donde se analiza la susceptibilidad *in vitro* a itraconazol, ketoconazol, terbinafina y ciclopirox, no se encontró una correlación directa entre la resistencia *in vitro* y la resistencia al tratamiento; de modo que ésta podría estar asociada con otros factores más allá de la resistencia intrínseca de los hongos. Sin embargo, no se pueden hacer muchas inferencias dado que el tamaño de muestra del estudio fue pequeño (56).

En Colombia, Pérez-Cárdenas y cols. (57) en un artículo publicado en 2012, informan sobre pruebas de sensibilidad antifúngica para fluconazol, terbinafina e itraconazol para 55 dermatofitos, 43 levaduras y 23 MND aislados de pacientes con onicomicosis. En dicho trabajo se encontró que los dermatofitos (*T. rubrum, T. interdigitale y T. tonsurans*) mostraron mayor sensibilidad a terbinafina e itraconazol, mientras que las levaduras y MND tuvieron elevadas CIM para los tres fármacos. La mayor tasa de resistencia *in vitro* (fluconazol 100 %, terbinafina 25 %, itraconazol 67 %) se observó en el grupo de los MND (*Fusarium* spp*, Penicillium* spp*, Helminthosporium* spp.*, Aspergillus* spp.*, Acremonium* spp. *y Scopulariopsis* spp.) (57).

En cuanto a las levaduras, en la revisión realizada en la literatura colombiana, no se encontraron estudios de resistencia en onicomicosis. Se halló una investigación efectuada en la ciudad de Cali en 230 pacientes con diagnóstico de VIH y candidiasis orofaríngea, en el que se encontró que 40 % de *Candidas no albicans,* fueron sensibles dosis-dependiente al fluconazol y 20 % resistentes (58).

Por todo lo anterior, es relevante la identificación del agente causal de la onicomicosis para la selección del tratamiento adecuado, ya que dermatofitos, levaduras y MND tienen una susceptibilidad antifúngica diferente.

# CAPÍTULO II

# ESTADO DEL ARTE

Debido a que las onicomicosis se pueden confundir con otras alteraciones ungueales de origen no infeccioso como la psoriasis, el liquen plano y la onicodistrofia no inflamatoria, es importante establecer un diagnóstico específico, identificar los hongos causantes y brindar un manejo adecuado que evite tratamientos innecesarios debido a su toxicidad y alto costo.

Históricamente, el diagnóstico micológico se ha realizado por el examen microscópico directo (KOH) y cultivo para hongos para la identificación del microorganismo. Estas herramientas, aunque en la mayoría de los casos son específicas, tienen como limitación su baja sensibilidad y el requerimiento de experiencia por parte del personal encargado (7,40).

En comparación con los métodos de diagnóstico convencionales, las técnicas moleculares aparentemente ofrecen un mayor rendimiento diagnóstico, como ha sido documentado en el diagnóstico de otras entidades micóticas y no micóticas, por ser más rápidas y presentar mayor precisión en la identificación de los agentes causales. Sin embargo, en la

práctica clínica actual, la micología molecular aún no está disponible de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios clínicos, posiblemente debido al elevado costo de los reactivos y equipos y a la necesidad de entrenamiento del personal (7,39,53).

Uno de los retos actuales en el tratamiento de las onicomicosis es diseñar estrategias apropiadas para el uso adecuado de los antimicóticos debido a infecciones por hongos emergentes, incremento en la resistencia a azoles y a terbinafina y la poca disponibilidad de las pruebas de sensibilidad.

Con el fin de superar las limitaciones de los métodos convencionales para el diagnóstico micológico, el interés de la comunidad científica se ha orientado hacia las técnicas moleculares basadas en PCR. Estas permiten identificar el agente causal en menor tiempo, incluso cuando los resultados del cultivo para hongos son negativos.

Existen varias investigaciones realizadas en el campo de la biología molecular para el diagnóstico de onicomicosis, entre ellas, un estudio utilizando diagnóstico molecular a través de PCR convencional fue realizado por Moursi y cols. (44), quienes realizaron el aislamiento e identificación de agentes causales de onicomicosis mediante métodos convencionales y moleculares para examinar la prevalencia relativa de dermatofitos, levaduras y MND entre los pacientes y correlacionar el patrón clínico con los agentes a partir de 450 muestras de uñas de manos y pies. A estas muestras les realizaron examen microscópico directo con KOH al 20%, cultivo e identificación con API 32C®, PCR-ITS, PCR-RFLP. Los casos positivos fueron 296 (65,8 %) y la OSDL fue la presentación clínica principal (50,6 %). En cuanto a la frecuencia de los agentes causales, *Candida albicans* fue 33,1 %, *T. rubrum* 18,2 %, complejo *T. mentagrophytes* 16,9 %, infección mixta 14,5 %, *E. floccosum* 9,5 % y *Aspergillus niger* 7,8 %. Los autores refieren que los métodos fenotípicos convencionales basados en las características morfológicas y fisiológicas informadas se han utilizado ampliamente para el género *Candida*; sin embargo, dichos métodos suelen consumir mucho tiempo y pueden

ser insuficientes para separar las especies, por lo que la identificación molecular podría utilizarse de forma complementaria. Dentro de estas herramientas moleculares, está la secuenciación, que también puede identificar las especies del complejo *T. mentagrophytes* u otros dermatofitos, lo que permite instaurar un tratamiento antifúngico adecuado. También concluyen que la onicomicosis dermatofítica fue la más común, seguidas por las causadas por levaduras y MND, y que la identificación precisa de los agentes causales ayuda a controlar la onicomicosis al brindar el tratamiento antifúngico correcto (44).

Los avances en las técnicas de biología molecular basadas principalmente en la qPCR han ayudado a identificar hongos patógenos a partir de muestras clínicas. Miyajima y cols. (16), en 2013, desarrollaron y estandarizaron una nueva reacción de qPCR con una sonda y un conjunto de cebadores panfúngicos, así como conjuntos de cebadores y sondas específicas para *T. rubrum* y *T. interdigitale*, constituyéndose este sistema de PCR en uno de los métodos disponibles más rápidos y sensibles para diagnosticar dermatofitosis en muestras de pacientes con *tinea unguium* o *tinea pedis* (16). Después se modificó este método para mejorar su operatividad y es el que en la actualidad se utiliza en la mayoría de los estudios y cuyos hallazgos fueron confirmados posteriormente en 2017 por Watanabe y cols. (14), quienes evidenciaron que la qPCR permitió una identificación más rápida de los hongos causantes (2 días vs. 28 días), concluyendo entonces que la qPCR logra una mayor tasa de identificación de dermatofitos.

En Argentina, Rinflerch y cols. (19) evaluaron la eficiencia y sensibilidad de la técnica de qPCR para identificar *Trichophyton rubrum* y *T. interdigitale*, y también para conocer la incidencia de los dermatofitos como causantes de esta afección. Evaluaron 60 especímenes clínicos por microscopía y qPCR (a partir del ADN extraído de muestras clínicas). Detectaron la presencia de ADN fúngico en 58 muestras (95 %) mediante qPCR, mientras que solo 41 (68 %) resultaron positivos al examen directo por microscopía. De las 58 positivas por qPCR, 53 (91 %) fueron identificadas como *T. rubrum* y 5 (9 %) como *T. interdigitale*. Estos autores describen

que esta técnica es más sensible que el examen micológico directo y más rápida que el cultivo convencional. Sin embargo, observaron que pueden obtenerse falsos positivos ya que esta técnica no evalúa la viabilidad de los dermatofitos; por lo anterior, consideran que podría ser útil para el diagnóstico, pero no para el seguimiento del tratamiento (19).

Shimoyama y cols. (17), en 2019, realizaron el diagnóstico inicial de onicomicosis mediante examen microscópico directo en 496 muestras, las cuales se analizaron posteriormente por qPCR, con una tasa de positivos de 96 % (477/496). Los autores concluyeron que la qPCR resultó efectiva para identificar los principales microorganismos causantes de onicomicosis.

En la actualidad, existen equipos, protocolos y estuches para el diagnóstico de onicomicosis por técnicas de biología molecular (42), pero aún su uso no se ha generalizado a nivel mundial. Hayette y cols. (18), en 2019, en Bélgica, utilizaron el DermaGenius® (DG), un estuche multiplex de uñas (PathoNostics, The NetherLands) para detectar *T. rubrum, T. interdigitale* y *C. albicans* directamente en las uñas a través de qPCR. Estos autores realizaron un estudio en 138 muestras y confirmaron 95 casos de onicomicosis (68,8%) por métodos convencionales, mientras que con el DermaGenius (DG) confirmaron 108 (78,3 %). Este estudio enfatiza la utilidad clínica de este estuche comercial en el diagnóstico de onicomicosis y en la identificación de los agentes causales de forma ligeramente superior al cultivo. Los autores concluyeron que este estuche comercial resultó confiable y acortó el tiempo del diagnóstico; pero no hay otros estudios comparativos que avalen su eficacia.

En el contexto del diagnóstico de onicomicosis mediante la secuenciación del ADN, Bao y cols. (43) publicaron un estudio enfocado en el diagnóstico de onicomicosis, en el que compararon los métodos convencionales (examen microscópico directo con tinción de blanco de calcoflúor y cultivo para hongos) con PCR/secuenciación de Sanger de la región ITS del ADNr con el analizador 3500XL ADN Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Ellos analizaron un total de

204 especímenes clínicos, detectaron 126 (62 %) y 102 (50 %) casos mediante la microscopia con fluorescencia y la secuenciación por PCR, respectivamente, con una sensibilidad de la microscopia con fluorescencia de 97 % y de 78 % de la secuenciación y una especificidad del 89 % y el 90 % respectivamente. Reportaron que el uso de la fluorescencia aumentó la sensibilidad del examen directo en un 12 % en comparación con el KOH convencional y que la secuenciación incrementó la sensibilidad en un 6 % en comparación con el cultivo. Estos autores señalan que la microscopía de fluorescencia presenta una mayor sensibilidad para la detección de hongos en muestras de uñas en comparación con el KOH y que puede utilizarse como herramienta de diagnóstico rápido. En cuanto a la secuenciación, que fue más rápida y sensible que el cultivo y, cuando se utilizó junto con la microscopía de fluorescencia, resultó en una mayor eficiencia (43).

Álvarez-Mosquera y cols. (46) compararon los métodos convencionales de diagnóstico de micosis superficiales con una técnica de PCR fúngica de amplio espectro que amplifica una región específica del ARN ribosomal 18S (ARNr) y la secuenciación de Sanger de esta misma región con el ABIPRISM3130 Genetic Analyzer (Thermofisher Scientific), a partir de muestras de escamas, uñas y cabello. Se analizaron 626 muestras clínicas mediante microscopía, cultivo para hongos y PCR. En total, 211 muestras (34 %) resultaron con diagnóstico positivo mediante al menos uno de los métodos aplicados: cultivo (21 %) y PCR (22 %). Aunque el porcentaje de identificación por secuenciación fue bajo (40 %), la amplificación de la región 18S del ARNr mostró un alto valor predictivo tanto positivo como negativo (90,9 % y 94,6 %, respectivamente). Los autores concluyeron que la PCR/secuenciación propuesta constituye un método complementario, rápido y eficaz en el diagnóstico de micosis superficiales, que reduce el tiempo de obtención de resultados de 4 semanas a 7 horas (46).

En 2022, Pospischil y cols. (39), efectuaron un estudio con 16.094 muestras de uñas con sospecha clínica de onicomicosis. Realizaron PCR/secuenciación de segunda generación con el secuenciador de genoma FLX

(454 Sequencing) (Roche) en todas las muestras de uñas con diagnóstico micológico convencional no concluyente. En muestras con microscopía directa positiva, pero cultivo negativo o contaminado, la micología molecular resultó superior y especificó un agente etiológico en el 65 % (587/898) y en el 75 % de las secuenciaciones (443/587), el patógeno identificado fue un dermatofito. Los cultivos positivos para dermatofitos, levaduras y MND coincidieron con la PCR/secuenciación de ADN en 83 % (10/12), 34 % (22/65) y 45 % (76/169), respectivamente. Entre los MND, el acuerdo fue alto para *Fusarium* spp. (32/40; 80 %), pero bajo para *Penicillium* spp. (5/25; 20 %) y *Alternaria* spp. (1/20; 5 %). Este estudio resalta un mayor rendimiento diagnóstico mediante PCR/secuenciación de ADN en caso de un cultivo negativo o contaminado, así como su importancia para el diagnóstico de onicomicosis por dermatofitos y MND (39).

En la Tabla 3 se presentan los diferentes estudios de onicomicosis que han utilizado una herramienta diagnóstica molecular, con la sensibilidad (S) de las pruebas convencionales y moleculares.

**Tabla 3.**
*Estudios moleculares en el diagnóstico de onicomicosis.*

| **Técnica de PCR** | **Secuencia blanco** | **Especie de destino** | *** S KOH - S Cultivo %**<br>**S Prueba molecular %** | **Referencia** |
|---|---|---|---|---|
| **PCR/ secuenciación de Sanger** | ITS1 ITS4 | *Panfúngico T. rubrum* + *Secuenciación* | 97 - 43<br>78 | Bao y cols. 2018 (43) |
| **PCR/ secuenciación de Sanger** | ARNr 18S | *Panfúngico* + *Secuenciación* | 62 - 49<br>40 | Álvarez-Mosquera y cols. 2018 (46) |
| **PCR/ secuenciación 2ª generación** | ADNr 28S | *Panfúngico* | 68 – 28,7<br>63.5 | Pospischil y cols. 2022 (39) |

*Continuación tabla 3.*

| Técnica de PCR | Secuencia blanco | Especie de destino | * S KOH - S Cultivo % / S Prueba molecular % | Referencia |
|---|---|---|---|---|
| **PCR convencional** | ITS1 ITS3 ITS4 | *Panfúngico T. rubrum C.albicans* | 65,8 - SD / 77 | Moursi y cols. 2018 (44) |
| **PCR convencional** | ITS1 ITS2 | *T. rubrum T. interdigitale* | 55,8 - 75 / 96 | Hayette y cols. 2015 (59) |
| **PCR múltiple** | CHS1 ITS2 | *Pandermatofítico T. rubrum* | 15 - 10 / 30 | Spiliopoulou y cols. 2015 (60) |
| **PCR dúplex** | CHS1 ITS2 | *Pandermatofítico T. rubrum* | 46 - 34 / 44 | Kondori y cols. 2007 (42) |
| **PCR anidada** | CHS1 | *T. rubrum T. interdigitale* | 70 - 26 / 83,8 | Garg y cols. 2009 (61) |
| **PCR anidada** | ITS1 | *T. rubrum T. interdigitale* | SD - 33 / 73 | Uchida y cols. 2009 (62) |
| **PCR anidada** | ARNr 28S | *T. rubrum T. interdigitale* | SD - SD / 94 | Ebihara y cols. 2009 (63) |
| **PCR - ELISA (OnychoDiag®)** | Topoisomerasa II | *T. rubrum T. interdigitale T. violaceum M. canis* | 78 - 79 / 92 | Savin y cols. 2007 (64) |
| **PCR-RFLP** | ITS1 MvaI | *T. rubrum T interdigitale T. tonsurans E. floccosum M. canis* | SD - 80 / 74 | Mohammadi y cols. 2015 (65) |
| **qPCR** | ITS1 ITS2 | *T. rubrum T. tonsurans T. interdigitale M. canis* | 43 - 33 / 51 | Arabatzis y cols. 2007 (66) |
| **qPCR** | ARNr 18S ARNr 5.8S | *Pandermatofítica* | 47 - 37 / 61,7 | Bergans y cols. 2010 (67) |

*Continuación tabla 3.*

| Técnica de PCR | Secuencia blanco | Especie de destino | * S KOH - S Cultivo % / S Prueba molecular % | Referencia |
|---|---|---|---|---|
| **qPCR** | ITS1 | *Panfúngica*<br>*T. rubrum*<br>*T. interdigitale* | 49,6 - 69,8 / 95,3 | Watanabe y cols. 2017 (14) |
| **qPCR** | ITS1 | *Panfúngica*<br>*T. rubrum*<br>*C. albicans* | 100 - SD / 96,2 | Shimoyama y cols. 2019 (17) |
| **qPCR** | ARNr 18S | *Panfúngica*<br>*T. rubrum*<br>*C. albicans* | 85* - 54 / 73 | Gustafson y cols. 2019 (68) |
| **qPCR (DermaGenius®)** | ITS2 | *Panfúngica*<br>*T. rubrum*<br>*C. albicans* | 81,1** - 67,3 / 80 | Hayette y cols. 2019 (18) |

SD: sin datos, Mval: enzima de restricción, **Histopatología.

| * Sensibilidad KOH% - Sensibilidad cultivo |
|---|
| Sensibilidad prueba molecular |



ÍNDICE

# CAPÍTULO III

# MÉTODO

## 3.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio es observacional descriptivo, de corte transversal realizado con recursos propios del Laboratorio de Diagnóstico de Agentes Biológicos (LDAB) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. No es una investigación de casos y controles, por lo tanto, los grupos no son comparables.

### 3.1.1 Población

La población seleccionada correspondió a personas que asistieron como pacientes o acompañantes a la sección de Dermatología del servicio de Consulta externa del Hospital Universitario del Valle (HUV) en Cali, Colombia. Esta es la tercera ciudad con mayor población a nivel nacional, y se encuentra ubicada en el Valle del río Cauca formado por las cordilleras occidental y central de la Región Andina. Se encuentra a una altura aproximada de 1000 m.s.n.m, con un clima tropical seco, una temperatura media de 24°C y una precipitación media anual que oscila entre 900 y 1800 mm.

### 3.1.2 Tamaño de muestra

El cálculo fue determinado con el programa Epidat versión 4.1, con la ruta módulos, muestreo, cálculo del tamaño de muestra, contraste de hipótesis y grupos emparejados. Teniendo en cuenta una sensibilidad esperada del cultivo para hongos de 56% (40), una especificidad esperada de 90%, una potencia de 90 y con un nivel de confianza del 95%, se determinó un tamaño de 100 individuos, 50 de ellos con onicomicosis y 50 sin lesiones ungueales.

### 3.1.3 Tipo de muestreo

Los participantes fueron elegidos por medio de un muestreo no probabilístico por conveniencia. En el estudio se incluyeron 104 sujetos: 51 pacientes con diagnóstico de onicomicosis confirmado por KOH y/o cultivo positivo, a los cuales se les consideró enfermos y 53 individuos sin alteraciones ungueales con estudios micológicos negativos en el grupo de no enfermos.

### 3.1.4 Criterios de inclusión

#### *3.1.4.1 Criterio de inclusión en el grupo de enfermos*

Población con sospecha clínica de onicomicosis de manos y/o pies y confirmación por estudio micológico (KOH y/o cultivo) positivo que hubiese sido atendida en la sección de Dermatología del servicio de Consulta externa del HUV.

#### *3.1.4.2 Criterio de inclusión en el grupo de no enfermos*

Población con estudio micológico convencional (KOH y cultivo) negativos que haya sido atendida en la sección de Dermatología del servicio de Consulta externa del HUV.

### 3.1.5 Criterios de exclusión

Se excluyeron del grupo los sujetos con algún impedimento físico o psicológico para contestar la encuesta, o que manifestaron su deseo de no participar en el estudio, los menores de 18 años sin el consentimiento informado de los padres o sin su asentimiento, o quienes estuvieran recibiendo tratamiento antimicótico sistémico o tópico (lacas o ungüentos queratolíticos y/o antimicóticos) o que se hubiesen tratado un mes antes de la toma de la muestra.

### 3.1.6 Estrategia de reclutamiento

Posterior a la autorización del Comité de Ética en Investigación del centro hospitalario (Código: 032/05/2021) y del Comité de Ética Médica de la Universidad del Valle (Código: 017-021), a las personas que asistieron a consulta o como acompañantes a la sección de Dermatología del servicio de Consulta externa del HUV se les explicó los objetivos de la investigación y fueron invitados a participar del estudio; quienes aceptaron, previa firma del consentimiento informado, ingresaron como participantes. A través de la historia clínica y del examen físico, se definió la presunción diagnóstica de onicomicosis o no.

## 3.2 PROCEDIMIENTOS

### 3.2.1 Firma de consentimiento informado, diligenciamiento de encuestas y consideraciones éticas

A los voluntarios admitidos al estudio se les hicieron los siguientes procedimientos: a) firma del consentimiento informado, documento con el cual el participante autoriza el uso de sus muestras y se les informaron sus derechos durante el desarrollo de la investigación; b) diligenciamiento de una encuesta estructurada, la cual contenía preguntas de carácter sociodemográfico y clínico y de antecedentes médicos, de cuyas respuestas se seleccionaron las variables para el análisis estadístico, y c) toma fotográfica de las uñas afectadas.

La investigación se categorizó de mínimo riesgo para los participantes, siguiendo los estándares de ética de la Declaración de Helsinki.

### 3.2.2 Toma, recolección y procesamiento inicial

Antes de realizar la toma de muestra, se verificó que los participantes cumplieran con las condiciones adecuadas para esta: uñas sin esmalte ni aplicación previa de talcos o cremas. Luego se efectuó antisepsia del área con etanol al 70 %; se tomó la muestra con una cureta no cortante estéril mediante raspado superficial y recorte de 2 mm de las uñas elegidas, y se descartó la primera porción de detritus obtenidos. Se recolectó muestra de las uñas afectadas en los participantes enfermos, y de las uñas de los pulgares y de los hallux en los participantes sanos. La toma se realizó en la sección de Dermatología del HUV.

La muestra de 100 mg aproximadamente se guardó en una caja de Petri plástica estéril, donde se mezcló, homogeneizó y dividió en dos partes: una parte para el análisis micológico que se dejó en la caja de Petri y la otra, destinada para el estudio molecular se guardó en un vial estéril y se transportó a temperatura ambiente hasta el Laboratorio de Diagnóstico de Agentes Biológicos (LDAB) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, para la realización de los estudios correspondientes. La muestra para el estudio molecular fue almacenada a – 20ºC.

### 3.2.3 Estudio micológico

#### *3.2.3.1 Microscopía: examen directo para hongos (KOH)*

De la muestra recolectada, se colocó una parte en un portaobjetos al cual se le adicionó hidróxido de potasio (KOH) al 20 % con tinta Parker azul-negra; la placa se colocó en cámara húmeda para evitar la desecación y dar tiempo para la disolución de los componentes proteínicos de las células y obtener una mejor observación de las estructuras micóticas. La preparación se observó bajo el microscopio con objetivos 10x y 40x (Olympus).

*3.2.3.2 Cultivos para hongos:*

Otra parte del material recolectado se sembró en los medios de Agar Sabouraud-dextrosa al 2 %, Agar Mycosel® y Agar Chromagar Candida®, los dos primeros se incubaron entre 25-28 °C durante 4 semanas y se revisaron semanalmente, mientras que el Chromagar Candida® se incubó a 35-37 °C por 48 horas. A todas las colonias de *Candida,* se les realizó la identificación por la técnica proteómica de MALDI-TOF, por sus siglas en inglés Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight, usando para ello el equipo VITEK ® MS (bioMérieux).

Para el diagnóstico micológico de onicomicosis por MND, en el presente estudio se siguieron los criterios revisados por Gupta y cols. Según esos criterios se necesitan al menos tres de las siguientes condiciones: examen directo positivo, cultivo positivo, al menos dos aislamientos repetidos de la muestra original, exclusión de un dermatofito como agente causal e histopatología (40,57).

## 3.2.4 Estudio molecular

Los métodos de diagnósticos moleculares fueron realizados en el LDAB, donde se contó con el apoyo de los grupos de investigación Microbiología y Enfermedades Infecciosas (MEI) y Virus Emergentes y Enfermedad (VIREM). A todas las muestras se les realizó el estudio molecular que consistió en una PCR-ITS convencional y la secuenciación, inclusive en los casos en los que no se obtuvo amplicón.

*3.2.4.1 Estandarización de las pruebas moleculares*

Se realizó la estandarización de las técnicas de extracción de ADN e identificación molecular de los agentes causales de onicomicosis con muestras clínicas de pacientes que no pertenecían al estudio y que tenían exámenes micológicos positivos, con cepas *Candida albicans* ATCC 24433 y con cultivos recientes de la colección del Laboratorio de Micología del LDAB. Estas muestras fueron almacenadas a -20 °C y sometidas a procesos de extracción y amplificación bajo diversas condiciones para validar los protocolos.

Para la extracción, en un inicio fueron realizados varios procesos de lisis (69); posteriormente se empleó el estuche comercial DNeasy PowerPlant Pro-Kit® (Qiagen), con el que se obtuvo ADN en cantidad adecuada; sin embargo, dado su elevado costo y la disponibilidad del estuche Prepman Ultra® (Applied Biosystems), se optó por el uso de este último.

En el proceso de estandarización de la amplificación de DNA se realizaron ensayos para determinar el número de ciclos, el tiempo y la temperatura de hibridación de los cebadores. También se llevó a cabo la selección de los controles positivos, y sobre estos controles se determinaron las condiciones finales de cada ensayo de PCR-ITS y de secuenciación.

*3.2.4.2 Extracción de ADN*

Se realizó con el estuche de extracción PrepMan Ultra Sample® (Applied Biosystems) (Figura 10), siguiendo el instructivo del fabricante con modificaciones menores (en el paso 6 se añadieron 10 minutos adicionales de calentamiento y en el paso 7 se incluyó exposición a −20 °C durante 2 min), de la siguiente manera:

**Figura 10.**
*Estuche de extracción Prepman Ultra Sample®. Fotografía tomada por el autor.*

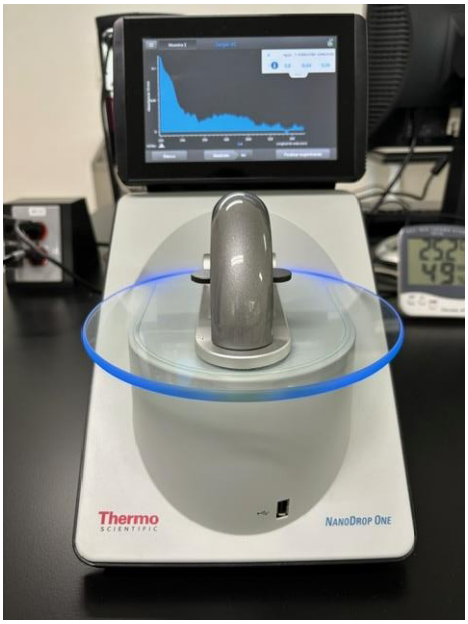



A cada muestra se le adicionó 100 µL del reactivo PrepMan Ultra, se agitó con vórtex durante 1 minuto, se incubó en un baño seco a 95 °C durante 20 min y se expuso a -20 °C durante 2 min. Posteriormente se

centrifugaron las muestras a 12.000 r.p.m durante 2 min, se transfirieron 50 µL del sobrenadante a un tubo de Eppendorf estéril y se descartó el restante. Finalmente, los viales con el ADN se almacenaron a -20 °C.

Se realizó la cuantificación y evaluación de la pureza del ADN (A260/280) al blanco (Prepman Ultra®), a los controles y a cada muestra por espectrofotometría UV (Anexo D), con el espectrofotómetro NanoDrop One/OneC ® (Thermo Scientific, Estados Unidos). (Figura 11).

**Figura 11.**
*Espectrofotómetro NanoDrop One/OneC ® (Thermo Scientific). Fotografía tomada por el autor.*




### *3.2.4.3 Cuantificación del gen de la ribonucleoproteína (RNP) por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)*

El gen de la ribonucleoproteína (*RNP*) es un gen constitutivo humano, por tanto, está presente en todas las células humanas. El gen *RNP* se utiliza como control interno para confirmar la cantidad suficiente ADN en la muestra, la eficiencia del proceso de la extracción del ADN y presencia o no de inhibidores de la PCR (70); evitando resultados falsos negativos (71). El *RNP* no categoriza, sino que indica que si hay una PCR o secuenciación

negativa corresponde efectivamente a la ausencia de ADN fúngico y no a un problema de extracción o presencia de inhibidores.

La cuantificación del gen de la ribonucleoproteína *(RNP)* se llevó a cabo en el presente estudio por medio de una qPCR en el QuantStudio® 5 Real-time PCR Systems (Applied Biosystems). A continuación, se describen las condiciones de esta prueba en cuanto a los cebadores y la sonda (Tabla 4) y a la mezcla de la reacción (Tabla 5).

**Tabla 4.**
*Descripción de los cebadores y sonda utilizados en la qPCR.*

| Nombre | Descripción | Secuencia de oligonucleótidos | Fluorocromo | Concentración |
|---|---|---|---|---|
| RP-F | Cebador RNAsa Forward | 5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3' | Ninguno | 5 µM |
| RP-R | Cebador RNAsa P Reverse | 5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3' | Ninguno | 5 µM |
| RP-P | Sonda RNAsa P | 5'-FAM – TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG – BHQ-1-3' | FAM, BHQ-1 | 2,5 µM |

**Tabla 5.**
*Mezcla de la qPCR para la cuantificación del RNP.*

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|---|---|---|
| ADN patrón | 5 µL | Depende de cada muestra |
| H O libre de 2 RNAasa | 3,3 µL | |
| 2x Ready mix | 10 µL | 1x |
| Mix de trabajo: Cebador F 5µM | | Cebador F 0.37µM |
| Cebador R 5µM sonda 2.5µM | 1,5 µL | Cebador R 0.37µM Sonda 0.18µM |
| Enzyme mix SuperScript™ | 0,2 µL | Se siguieron las |
| III Platinum® | | condiciones |
| One Step 2x | | según inserto |
| **Total** | **20 µL** | |

En cuanto a los ciclos de amplificación de cada qPCR, se realizaron durante 45 ciclos de: 95 ºC durante 15 segundos y 55 ºC durante 1 minuto, hasta la adquisición de fluorescencia, en una rampa del 100 % correspondiente a 2.5ºC/segundo.

*3.2.4.4 PCR convencional*

La amplificación del ADN extraído se realizó por medio de una PCR convencional monoplex de la región ITS utilizando cebadores panfúngicos en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los cebadores seleccionados de la literatura se encuentran en la Tabla 6 y la mezcla (máster mix) que se preparó en la Tabla 7.

**Tabla 6.**
*Descripción de los cebadores utilizados en la detección molecular.*

| Codifica | Secuencia | Región | Tamaño | Referencia |
|---|---|---|---|---|
| Panfúngico | F-TAGAGGAASTAAAAGTCGTAA | ITS | 1500 pb | Ohta A. 2023 (70) |
| | R-TCCTGAGGGAAACTTCG | | | |

**Tabla 7.**
*Mezcla para PCR-ITS panfúngica.*

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|---|---|---|
| ADN patrón | 5 µL | Depende de cada muestra |
| $H_2O$ | 14,1 µL | |
| Tampón (NH4)2SO4 10x | 2,5 µL | 50 mM |
| $MgCl_2$ 25mM | 1,8 µL | 4 mM |
| dNTPs 2.5mM | 0,5 µL | 50 µM c/dNTP |
| Cebador F 10µM | 0,5 µL | 0,2 µM |
| Cebador R 10µM | 0,5 µL | 0,2 µM |
| Ampli-Taq 1x | 0,125 µL | 5U/µL |
| **Total** | **25 µL** | |

Las cantidades ilustradas en la tabla son las correspondientes a un tubo de muestra. Teniendo en cuenta el número de tubos de muestras a procesar se realizaron los respectivos cálculos. Se homogeneizaron los reactivos antes de preparar la máster mix (a excepción de la Taq Polimerasa). En la Tabla 8 se presentan las condiciones de cada PCR-ITS panfúngica realizada.

**Tabla 8.**
*Condiciones para cada PCR-ITS panfúngica.*

| # DE CICLOS | TEMPERATURA | TIEMPO |
|---|---|---|
| 1 CICLO | **95 °C** | **10 min** |
| | **95 °C** | **1 min** |
| 35 CICLOS | **54 °C*** | **2 min** |
| | **72 °C** | **2 min** |
| 1 CICLO | **72 °C** | **5 min** |
| | **4 °C** | ∞ |

Controles utilizados: en cada ensayo de PCR-ITS realizado se incluyó un control negativo en el que se agregaron todos los componentes de las mezclas descritas anteriormente sin la adición del ADN. Para el control positivo se usaron cepas ATCC 24433 de *C. albicans* y muestras de cultivos recientes de *T. rubrum y C. albicans* del cepario del Laboratorio de Micología del LDAB.

*3.2.4.5 Electroforesis*

Para la visualización de los resultados de la PCR, los amplicones fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1 % y coloreados con 2µL de SYBR SAFE® (Invitrogen). En cada electroforesis se agregaron 8µl del amplicón y 2µl del buffer de carga, agregando 10 µl de la mezcla en cada pozo. Cada electroforesis fue realizada durante 30 min a 80-100 voltios en el Midicell® Primo EC330 Electrophoretic Gel System (Thermo EC). Los geles fueron observados y fotografiados en el transiluminador UV Fisher Scientific Modelo 88A® (Fisher biotech).

*3.2.4.6 Secuenciación*

A todos los productos de la PCR se les realizó purificación y secuenciación de nueva generación (SNG) con el secuenciador

Nanopore Oxford MinION® Mk1C (Oxford Nanopore Technologies) en el Laboratorio de Virología del LDAB. Se utilizó la plataforma de secuenciación MinION para secuenciar las regiones amplificadas de la región ITS (aproximadamente 1500 pb de longitud) para la codificación de microorganismos (7,72).

*Secuenciación y bioinformática de Oxford Nanopore*

Se utilizó la plataforma de secuenciación MinION MK1C®, administrada por el software MinKNOW® V2304.3 (Oxford Nanopore Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La librería genómica se preparó utilizando el estuche de secuenciación Ligation Secuencing Kit SQK-LSK109 y el Native Barcoding Expansion Kit 96 EXP-NBD196. La librería se secuenció en una celda de flujo R-9.4.1 durante 48 h (72,73). Para el análisis de los datos, se empleó el programa Guppy v6.5.7 para la llamada de base a archivos en formato FAST5 producidos bajo un modelo de alta precisión. Se descartaron las lecturas no adecuadas y se recortaron los códigos de barras y las secuencias de adaptadores para generar las lecturas aprobadas, que fueron guardadas en formato FASTQ. Se obtuvo una única secuencia consenso por muestra de los archivos FASTQ obtenidos con el Amplicon Sorter v.2024/02/20, luego se eliminaron los cebadores de estas secuencias obteniendo las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) y se utilizaron para la asignación taxonómica (72). En la Figura 12 se explica el proceso bioinformático realizado.

**Figura 12.**

*Diagrama de flujo bioinformático del estudio. Se observan los distintos pasos del proceso de análisis bioinformático de los datos sin procesar, hasta llegar a la obtención de secuencias y su comparación con la base de datos de NCBI. Figura de elaboración propia.*



## 3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables del instrumento de recolección de información (Anexo D) se tabularon en hojas de cálculo de Microsoft Office Excel 365 y luego se importaron para análisis en los programas estadísticos Stata 16.0 y R 4.3. Inicialmente se realizó un análisis exploratorio para evaluar la presencia de datos atípicos, inconsistencias y la distribución de las variables continuas con la prueba de Shapiro-Wilk (un valor p igual o mayor a 0,05 fue considerado indicativo de distribución normal, y la variable se representó mediante estadística paramétrica).

Se calcularon medianas y rango intercuartílico para las variables cuantitativas y frecuencia absoluta y relativa para las variables categóricas. Se analizaron edad, sexo, escolaridad, ocupación, nivel socioeconómico, número y sitio de uñas afectadas, diagnóstico, tratamiento previo, evolución, enfermedades y micosis asociadas, variantes clínicas, examen directo y cultivo para hongos. Las características de los participantes sanos se compararon con las de los pacientes con onicomicosis utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para las variables cuantitativas y la prueba exacta de Fisher para las variables cualitativas (74). Se presentan tablas cruzadas o de contingencia entre los resultados del examen directo para hongos (KOH), el cultivo para hongos y los resultados para la PCR y secuenciación. Además, se calculó la frecuencia absoluta y relativa de los microorganismos causantes de onicomicosis. También se estimó la sensibilidad y especificidad del KOH, del cultivo y de la PCR para hongos y se estimó el intervalo de confianza del 95 % con el método del Score de Wilson utilizando Stata y se compararon empleando la prueba binomial exacta para muestras pareadas (75).

Finalmente, mediante el programa Stata se calculó la concordancia entre los resultados de los métodos de diagnóstico convencional y molecular mediante el coeficiente Kappa de Cohen (medida estadística que ajusta el efecto del azar sobre la concordancia observada), con un intervalo de confianza del 95 %, utilizando el método descrito por Fleiss

y col. (76). La interpretación del coeficiente fue la siguiente: ≤0,20: baja a leve; 0,21–0,40: aceptable; 0,41–0,60: moderada; 0,61–0,80: considerable; 0,81–1,0: casi perfecta (77).

Se evaluaron asociaciones entre los agentes etiológicos aislados en los cultivos y las características clínicas de los participantes (localización anatómica, sexo y tipo de onicomicosis) mediante la prueba exacta de Fisher (78).


ÍNDICE

# CAPÍTULO IV

# RESULTADOS

## 4.1 DESCRIPCIÓN DE LOS PARTICIPANTES Y CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS

Se estudiaron n=104 participantes entre septiembre de 2021 y marzo de 2022, 51 (49 %) con onicomicosis confirmada por examen directo y/o cultivos para hongos positivos y 53 (51 %) sin alteración en la lámina ungueal y con examen directo y cultivos negativos; estos últimos constituyeron el grupo de sanos.

La Tabla 9 presenta las características sociodemográficas de los participantes; en ella se observa que la mediana de la edad del grupo de los sanos fue 2,3 veces menor que la del grupo con onicomicosis. En cuanto al sexo, en los pacientes con onicomicosis la relación entre hombres y mujeres (24/27) fue de 0,88. Respecto al grado de escolaridad, los pacientes con onicomicosis tuvieron un nivel menor: solo el 21,6 % había alcanzado el bachillerato completo o un nivel superior, frente al 98,1 % en los sanos.

**Tabla 9.**
*Características sociodemográficas de los participantes del estudio.*

| Característica | Pacientes con onicomicosis **n = 51** (%) | Sujetos sanos **n = 53** (%) | Total **n = 104** (%) |
|---|---|---|---|
| **Mediana de edad en años (IQR)** | 63 (53-76)[a] | 27 (24-31)[a] | 43.5 (26-64)[a] |
| **Sexo asignado al nacer** | | | |
| Masculino | 24 (47,1) | 30 (56,6) | 54 (51,9) |
| Femenino | 27 (52,9) | 23 (43,4) | 50 (48,1) |
| **Procedencia** | | | |
| Cali | 38 (74,5) | 53 (100) | 91 (87,5) |
| Otro municipio | 13 (25,5) | 0 (0) | 13 (12,5) |
| **Escolaridad** | | | |
| Ninguna | 6 (11,8) | 0 (0) | 6 (5,8) |
| Preescolar | 1 (2) | 0 (0) | 1 (1) |
| Primaria | 21 (41,2) | 1 (1,9) | 22 (21,1) |
| Bachillerato incompleto | 12 (23,5) | 0 (0) | 12 (11,5) |
| Bachillerato completo | 8 (15,7) | 25 (47,2) | 33 (31,7) |
| Pregrado | 1 (2) | 22 (41,5) | 23 (22,1) |
| Posgrado | 2 (3,9) | 5 (9,4) | 7 (6,7) |
| **Desempleados** | 2 (3,9) | 0 (0) | 2 (1,9) |
| **No clasificados** | 14 (27,5) | 0 (0) | 14 (13,5) |
| **Historia personal de onicomicosis** | 11 (21,6) | 4 (7,6) | 15 (14,4) |
| **Conviviente con onicomicosis** | 10 (19,6) | 9 (16,9) | 19 (18,3) |
| **Signo clínico de otra micosis superficial** | 16 (31,4) | 0 (0) | 16 (15,4) |

[a] Mediana - IQR (variables cuantitativas).
% Frecuencia absoluta (variables cualitativas).

## 4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON ONICOMICOSIS

La Tabla 10 muestra las características clínicas de los 51 pacientes con onicomicosis. Se encontró que la mitad tuvo un tiempo mínimo de evolución de 3 años, con 2 o más uñas afectadas. Las dos formas clínicas más frecuentes fueron la subungueal distal (OSD) (43,1 %) y la subungueal distal lateral (OSL) (33,3 %).

**Tabla 10.**
*Características clínicas de los pacientes con onicomicosis.*

| Características | Total n = 51(%) |
|---|---|
| **Antecedente de tratamiento para onicomicosis** | |
| Ninguno | 35 (68,6) |
| Tópico | 7(13,7) |
| Sistémico | 5 (9,8) |
| Combinado | 4 (7,8) |
| **Mediana del tiempo de evolución en años (IQR)** | 3 (1-5) [a] |
| **Mediana del número de uñas afectadas (IQR)** | 2 (2-7) [a] |
| **Tipo de onicomicosis:** | |
| Subungueal distal | 22 (43,1) |
| Subungueal distal lateral | 17 (33,3) |
| Distrófica total | 9 (17,7) |
| Blanca superficial | 1 (1,95) |
| Otras variedades | 2 (3,9) |

[a] Mediana - IQR (variables cuantitativas).
% Frecuencia absoluta (variables cualitativas).

## 4.3 DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

De los 51 pacientes con onicomicosis, 46 (90,2 %) se diagnosticaron mediante examen directo (KOH), de los cuales 30 (65,2 %) tuvieron cultivo positivo. 35 individuos tuvieron cultivo positivo y en solo 5 (9,8 %) de ellos no se observaron estructuras micóticas en el examen directo (Tabla 11). Los agentes aislados en los 5 individuos que presentaron examen directo negativo correspondieron a *T. rubrum, T. mentagrophytes, N. dimidiatum*, *Fusarium sp.* y *C. tropicalis*.

**Tabla 11.**
*Relación entre resultados del KOH y cultivo en onicomicosis*

| | | Cultivo Positivo n (%) | Cultivo Negativo n (%) | Total |
|---|---|---|---|---|
| **KOH n (%)** | Positivo | 30 (58,8) | 16 (31,4) | 46 (90,2) |
| | Negativo | 5 (9,8) | 0 (0) | 5 (9,8) |
| | **Total** | 35 (68,6) | 16 (31,4) | 51 (100) |

Mediante la prueba binomial exacta para muestras pareadas, la sensibilidad del KOH fue significativamente mayor que la del cultivo (90,2 % frente a 68,6 %; valor p = 0,0266) (Tabla 12). No se estimó la especificidad ni los valores predictivos, ya que el criterio de inclusión de los participantes sanos era tener ambas pruebas negativas, lo cual daría una especificidad del 100 %. La concordancia entre las dos pruebas (KOH y cultivo) fue del 82,5 %, con un coeficiente kappa de Cohen de 0,62, indicativo de concordancia considerable.

**Tabla 12.**
*Sensibilidad y concordancia entre KOH y cultivo en onicomicosis.*

| | KOH | Cultivo | Valor p |
|---|---|---|---|
| **Sensibilidad %** (IC95 %) | 90,2 (82-98,4) | 68,6 (55,9-81,4) | 0,0266 |
| **Concordancia %** | | 82,5 % | |
| **Coeficiente Kappa** | | 0,621 (0,477-0,765) | |

La Tabla 13 muestra la relación entre los resultados del cultivo y las estructuras micóticas observadas en el examen directo en los 30 participantes con cultivo y exámenes directos positivos. Entre los 30 KOH positivos, con cultivos positivos, las estructuras micóticas más frecuentemente observadas fueron hifas hialinas (70 %), correlacionadas con los dermatofitos.

**Tabla 13.**
*Relación entre los resultados del cultivo y el examen directo.*

| | **Resultados** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Cultivos** | | | | |
| **Examen directo** | **Dermatofitos n (%)** | **MND n (%)** | **Levaduras n (%)** | **Mixto n (%)** | **Total n (%)** |
| Hifas septadas hialinas | 17 (89,5) | 1 (50) | 3 (42,9) | 0 (0) | 21 (70) |
| Artroconidias | 2 (10,5) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (6,7) |
| Hifas septadas pigmentadas | 0 (0) | 1 (50) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (3,3) |
| Blastoconidias | 0 (0) | 0(0) | 4 (57,1) | 2 (100) | 6 (20) |
| **Total** | **19 (100)** | **2 (100)** | **7 (100)** | **2 (100)** | **30 (100)** |

MND: Mohos no dermatofitos

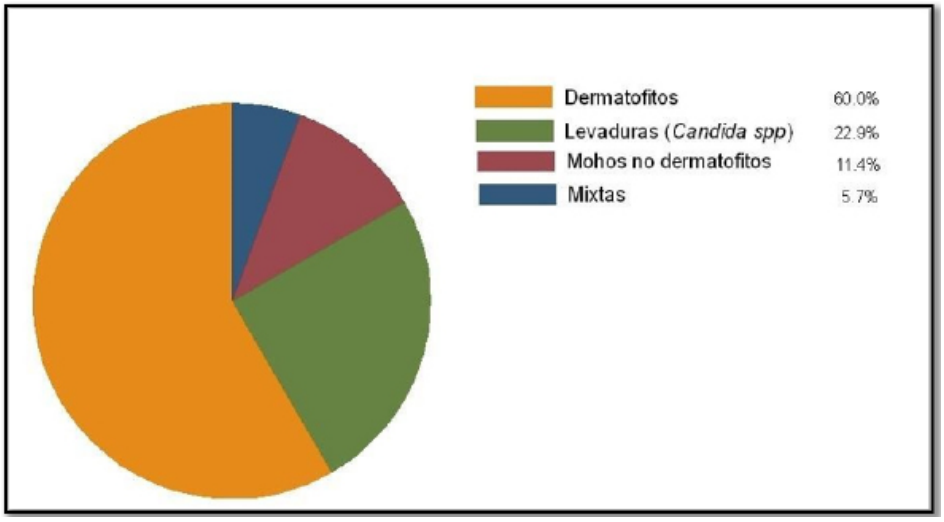


ÍNDICE

En los 16 individuos (31,4 %) que tenían un KOH positivo con un cultivo negativo, las estructuras micóticas reportadas fueron hifas hialinas septadas (n=13), blastoconidias (n=2) y artroconidias (n=1).

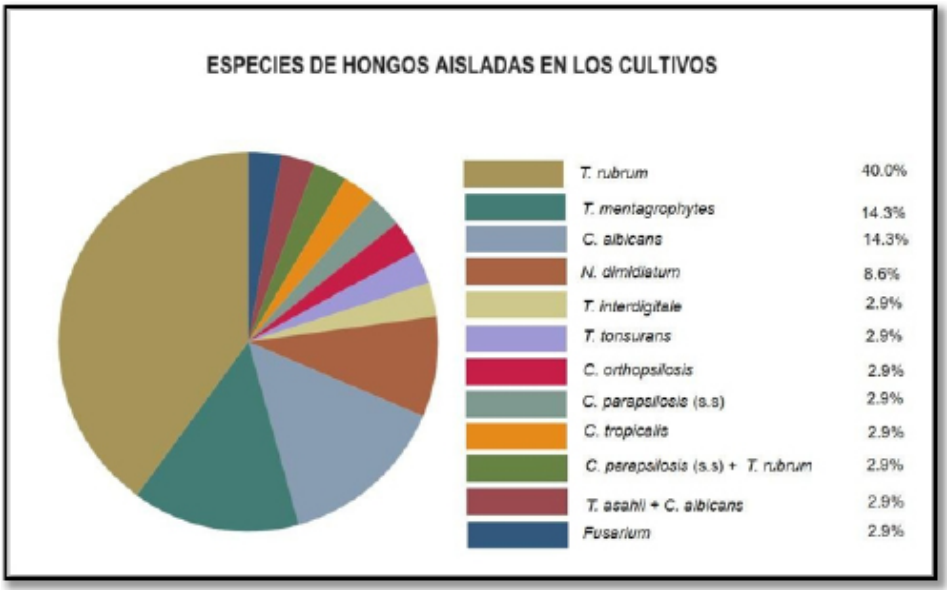
En cuanto a los agentes etiológicos, la Figura 13 muestra la distribución de los diferentes grupos de hongos encontrados, donde se observa que el género más frecuentemente aislado fueron los dermatofitos (60 %).

**Figura 13.**
*Distribución de los diferentes grupos de hongos causales de onicomicosis en participantes estudiados. Figura de elaboración propia.*




La Figura 14 presenta de forma discriminada la distribución por géneros y especies de los hongos. *T. rubrum* fue el agente más frecuente (40 %); este hongo junto con *T. mentagrophytes* (14,3 %) y *C. albicans* (14,3 %) representan el 68,6 % del total de los aislamientos.

**Figura 14.**
*Distribución por género y especies de los agentes etiológicos en participantes estudiados. Figura de elaboración propia.*




En la Figura 15 se observan características macroscópicas y microscópicas de *T. rubrum*, *T. tonsurans, Neoscytalidium dimidiatum y Fusarium.*

## 4.4 ASOCIACIONES CLÍNICAS Y MICOLÓGICAS

Al analizar la frecuencia de los diferentes grupos etiológicos con respecto a la localización en donde se presenta la onicomicosis, en la Tabla 14 se observa que la presencia de dermatofitos es mayor en las uñas de los pies (76 %), mientras que la presencia de *Candida* spp. es superior en los participantes que tenían lesiones en las uñas de las manos (60 %) como también en aquellos que tenían compromiso simultáneo en uñas de las manos y de los pies (60 %). Los MND fueron aislados de manera infrecuente (11,4 %) y de los 4 participantes enfermos que los presentaron, 3 de estos tenían afectadas las uñas de los pies. Estas diferencias entre los grupos de hongos aislados y la localización anatómica fueron estadísticamente significativas (valor p = 0.006, prueba exacta de Fisher).

**Figura 15.**

*Colonias de hongos en agar Sabouraud-Dextrosa, A-C. T. rubrum, A. Anverso, B. Reverso, C. Examen microscópico. D-F. T. tonsurans, D. Anverso, E. Reverso, F. Examen microscópico. G-H. Neoscytalidium dimidiatum, G. Anverso, H. Reverso. I. Fusarium sp. Examen microscópico con azul de lactofenol. 10X. https://pixlr.com/photo-collage/. Fotografías de muestras propias del estudio tomadas por los autores.*

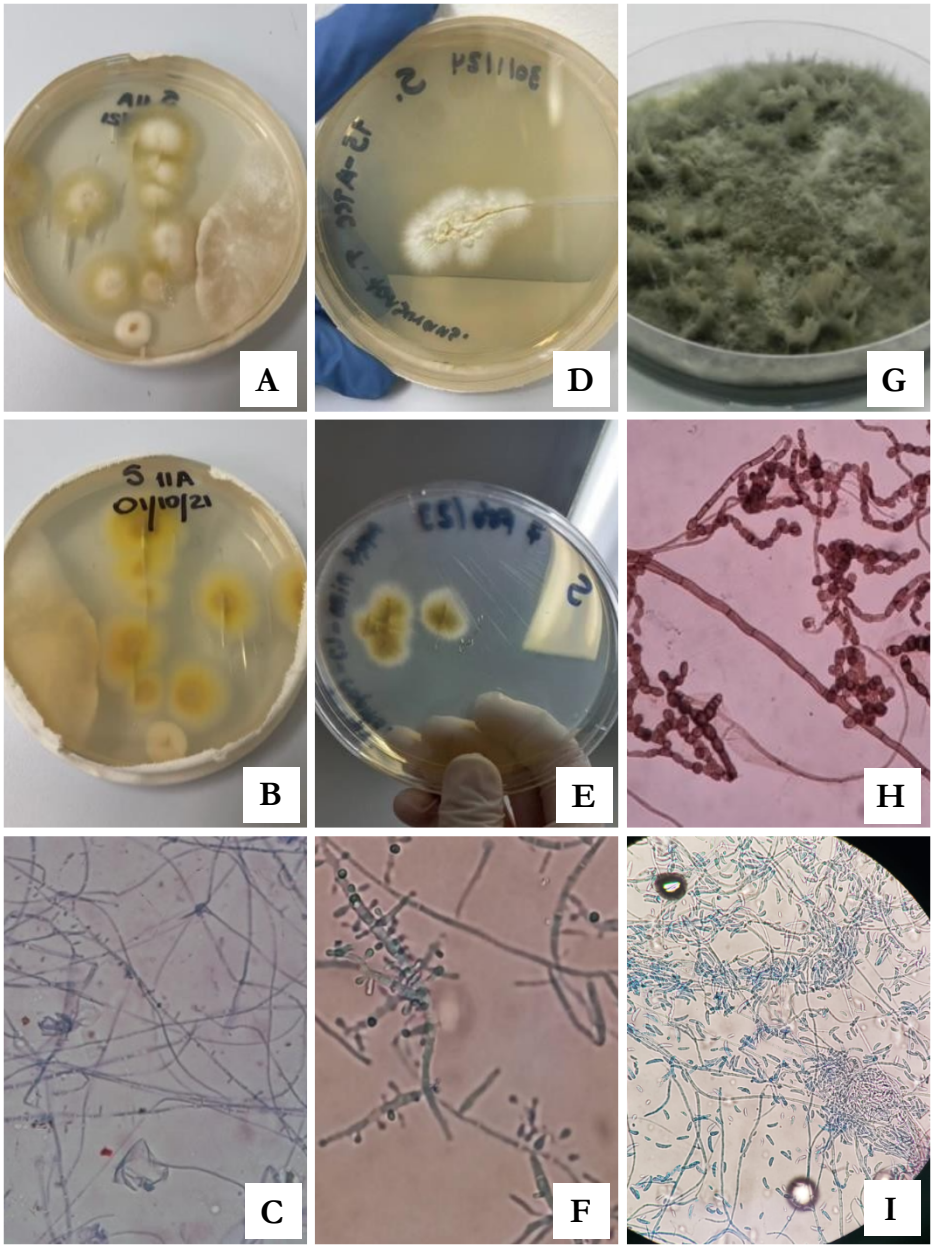


**Tabla 14.**
*Frecuencia de agentes etiológicos de acuerdo con el sitio anatómico.*

| Agente etiológico | Localización anatómica n (%) | | | Total |
|---|---|---|---|---|
| | Manos | Pies | Manos y pies | |
| **Dermatofitos** | | | | |
| *T. rubrum* | 1 (20) | 12 (48) | 1 (20) | 14 (40) |
| *T. mentagrophytes* | 0 (0) | 5 (20) | 0 (0) | 5 (14,3) |
| *T. tonsurans* | 0 (0) | 1 (4) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *T. interdigitale* | 0 (0) | 1 (4) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **1 (20)** | **19 (76)** | **1 (20)** | **21 (60)** |
| **Levaduras** | | | | |
| *C. albicans* | 1 (20) | 1 (4) | 3 (60) | 5 (14,3) |
| *C. parapsilosis (s.s)* | 0 (0) | 1 (4) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *C. orthopsilosis* | 1 (20) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *C. tropicalis* | 1(20) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **3 (60)** | **2 (8)** | **3 (60)** | **8 (22,9)** |
| **Mohos no dermatofitos** | | | | |
| *N. dimidiatum* | 1 (20) | 2 (8) | 0 (0) | 3 (8,6) |
| *Fusarium* | 0 (0) | 1 (4) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **1 (20)** | **3 (12)** | **0 (0)** | **4 (11,4)** |
| **Etiología mixta** | | | | |
| *C. parapsilosis (s.s)* + *T. rubrum* | 0 (0) | 1 (4) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *C. albicans* + *Trichosporon asahii* | 0 (0) | 0 (0) | 1 (20) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **0 (0)** | **1 (4)** | **1 (20)** | **2 (5,7)** |
| **Total** | **5 (100)** | **25 (100)** | **5 (100)** | **35 (100)** |

(s.s): sensu stricto.

La distribución de los hongos según el género del participante se presenta en la Tabla 15; se muestra que la frecuencia de dermatofitos fue mayor en hombres que en mujeres (73,7 % vs 43,8 %), mientras que para

*Candida* spp. fue menor en hombre que en mujeres (15,8 % vs 31,3 %), sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (valor p = 0.201, prueba exacta de Fisher).

**Tabla 15.**
*Frecuencia de agentes etiológicos de acuerdo con el género.*

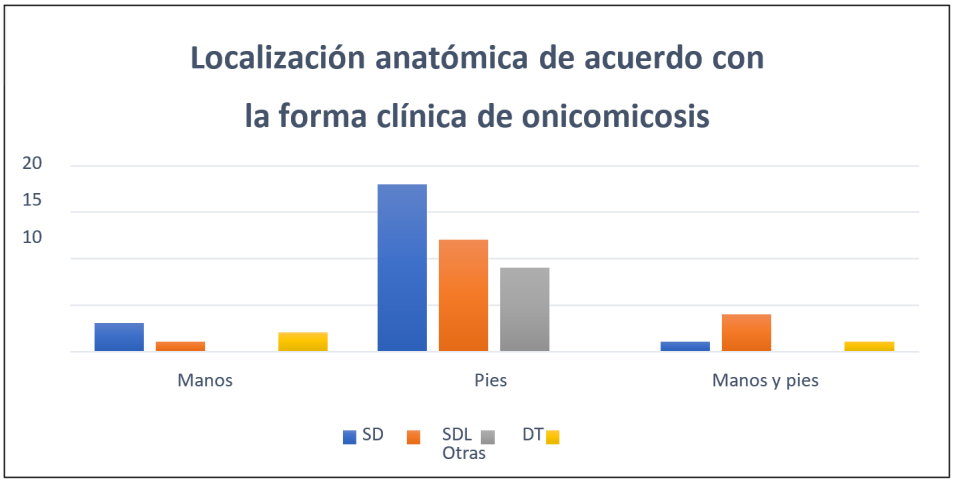
| Agente etiológico | Género n (%) | | Total |
|---|---|---|---|
| | Mujeres | Hombres | |
| **Dermatofitos** | | | |
| *T. rubrum* | 4 (25) | 10 (52,6) | 14 (40) |
| *T. mentagrophytes* | 2 (12,5) | 3 (15,8) | 5 (14,3) |
| *T. tonsurans* | 0 (0) | 1 (5,3) | 1 (2,9) |
| *T. interdigitale* | 1 (6,3) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **7 (43,8)** | **14 (73,7)** | **21 (60)** |
| **Levaduras** | | | |
| *C. albicans* | 3 (18,8) | 2 (10,5) | 5 (14,3) |
| *C. parapsilosis (s.s)* | 0 (0) | 1 (5,3) | 1 (2,9) |
| *C. orthopsilosis* | 1 (6,3) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *C. tropicalis* | 1 (6,3) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **5 (31,3)** | **3 (15,8)** | **8 (22,9)** |
| **Mohos no dermatofitos** | | | |
| *N. dimidiatum* | 2 (12,5) | 1 (5,3) | 3 (8,6) |
| *Fusarium* | 0 (0) | 1 (5,3) | 1 (2.9) |
| **Subtotal** | **2 (12,5)** | **2 (10,5)** | **4 (11,4)** |
| **Etiología mixta** | | | |
| *C. parapsilosis (s.s)* + *T. rubrum* | 1 (6,3) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *C. albicans* + *Trichosporon asahii* | 1 (6,3) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **2 (12,5)** | **0 (0)** | **2 (5,7)** |
| **Total** | **16 (100)** | **19 (100)** | **35 (100)** |

(s.s): sensu stricto.

Al revisar la distribución de las formas clínicas relacionadas con la localización anatómica, la Figura 16 indica que en las uñas de los pies se presentaron todas las formas clínicas; mientras que las uñas de manos solo tuvieron onicomicosis distal, distal lateral y otras formas clínicas como paroniquia y onicomicosis blanca superficial. Se observa que la onicomicosis subungueal distal es la forma clínica más frecuente (43,1 %) y la más frecuente en las uñas de los pies (81,8 %).

**Figura 16.**

*Localización anatómica de acuerdo con la forma clínica de onicomicosis. Figura de elaboración propia.*




La Tabla 16 presenta la relación entre los diferentes agentes etiológicos y las diversas formas clínicas de la onicomicosis, se puede observar que los hongos dermatofitos predominaron en las formas subungueal distal (OSD), lateral (OSL) y en los casos de onicomicosis distrófica total (ODT), sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (valor - p=0.681, prueba exacta de Fisher).

**Tabla 16.**
*Frecuencia de agentes etiológicos de acuerdo con el tipo clínico de onicomicosis.*

| Agente etiológico | Tipo de onicomicosis n (%) | | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| | SD | SDL | DT | Otras | |
| **Dermatofitos** | | | | | |
| *T. rubrum* | 7 (38,9) | 3 (30) | 3 (75) | 1 (33,3) | 14 (40) |
| *T. mentagrophytes* | 2 (11,1) | 2 (20) | 1 (25) | 0 (0) | 5 (14,3) |
| *T. tonsurans* | 0 (0) | 1 (10) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *T. interdigitale* | 1 (5,6) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **10 (55,6)** | **6 (60)** | **4 (100)** | **1 (33,3)** | **21 (60)** |
| **Levaduras** | | | | | |
| *C. albicans* | 2 (11,1) | 2 (20) | 0 (0) | 1 (33,3) | 5 (14,3) |
| *C. parapsilosis (s.s)* | 1 (5,6) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *C. orthopsilosis* | 1 (5,6) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *C. tropicalis* | 1 (5,6) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **5 (27,8)** | **2 (20)** | **0 (0)** | **1 (33,3)** | **8 (22,9)** |
| **Mohos no dermatofitos** | | | | | |
| *N. dimidiatum* | 1 (5,6) | 1 (10) | 0 (0) | 1 (33,3) | 3 (8,6) |
| *Fusarium* | 1 (5,6) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **2 (11,1)** | **1 (10)** | **0 (0)** | **1 (33,3)** | **4 (11,4)** |
| **Etiología mixta** | | | | | |
| *C. parapsilosis (s.s) + rubrum* | 1 (5,6) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| *C. albicans + Trichosporon asahii* | 0 (0) | 1 (10) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (2,9) |
| **Subtotal** | **1 (5,6)** | **1 (10)** | **0 (0)** | **0 (0)** | **2 (5,7)** |
| **Total** | **18 (100)** | **10 (100)** | **4 (100)** | **3 (100)** | **35 (100)** |

DT Distrófica total, SD Subungueal distal, SDL Subungueal distal lateral, otras (Blanca superficial y paroniquia), (s.s): sensu stricto.

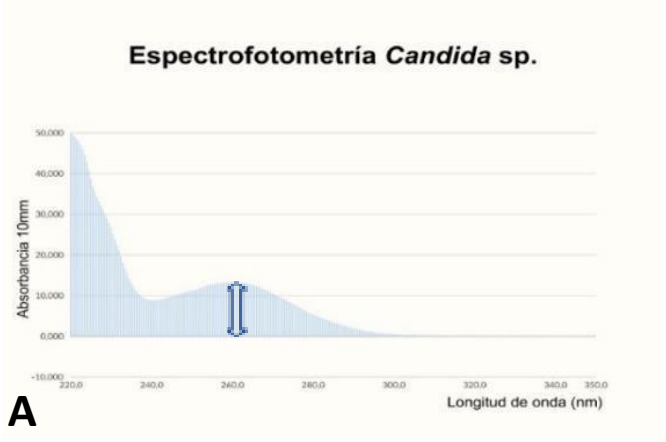
# 4.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

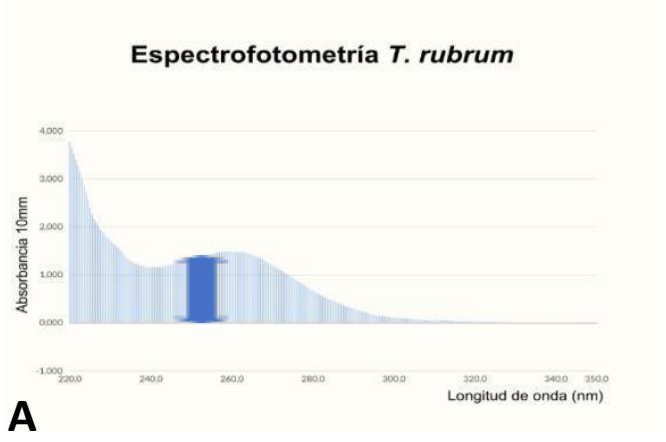
## 4.5.1 Extracción del ADN:

En la cuantificación y evaluación de la pureza del ADN del blanco, los controles y las muestras se obtuvo ADN con concentraciones entre 4,5 y 1359,6 ng/µL y valores de A260/A280 entre 0,42 y 1,6 dados por la alta concentración de proteínas en las muestras provenientes de uñas. En la Figura 17 se muestran las curvas de absorbancia del ADN de los controles.

**Figura 17.**

*Cuantificación y evaluación de la pureza del ADN de los controles de C. albicans (A) y T. rubrum (B), respectivamente. En estas figuras se observan las curvas de absorbancia del ADN de los controles. En el eje X (horizontal) la longitud de onda (nm) y en el eje Y (vertical) la absorbancia (mm). La flecha azul indica el pico de absorbancia del ADN a 260 nm. Figuras de elaboración propia.*



Aunque la concentración de ADN fue mayor en los sujetos con onicomicosis que en los sujetos sanos, los índices 260/280 y 260/230 fueron inferiores a 1,8; sin embargo, no hubo diferencias con significancia estadística en la distribución de los resultados de estos índices entre los sujetos sanos y los que tenían onicomicosis.

### 4.5.2 Cuantificación de la expresión del gen de la ribonucleoproteína (*RNP*) por qPCR

Ante la variabilidad en la concentración y en la pureza del ADN extraído, a todas las muestras analizadas se les realizó como control interno una cuantificación del gen *RNP* por qPCR para confirmar la presencia de ADN conservado. Se encontró *RNP* positivo en el 74,5 % (38/51) de las muestras de los pacientes con onicomicosis y en el 76,9 % (40/52) de las personas sanas; a pesar de lo reportado en la espectrometría sobre la calidad de la extracción, existía ADN conservado en las muestras, por lo que se procedió a realizar la PCR en todas estas. En la Figura 18 se muestran ejemplos del gráfico de amplificación del gen *RNP*.

### 4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional:

Se realizó PCR-ITS convencional a todas las muestras y posteriormente se realizó reamplificación del amplicón con los mismos cebadores y bajo las mismas condiciones de la PCR-ITS original (Ver proceso en página 65) a las muestras de los participantes del grupo de enfermos que tuvieron una PCR negativa y a las que tenían bandas de amplificación débiles.

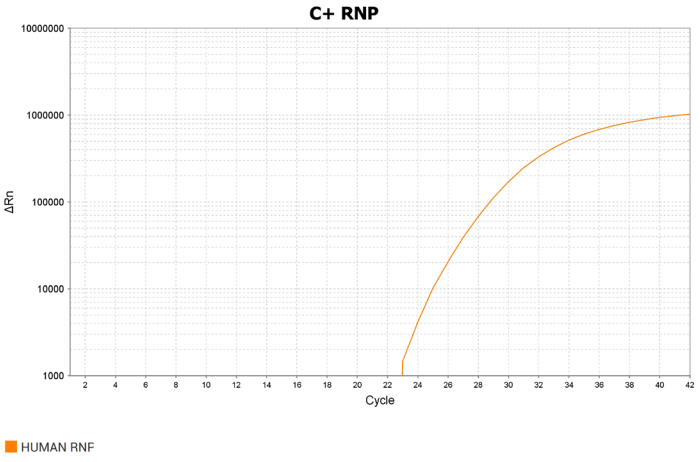
De las 104 muestras, una, correspondiente a un participante del grupo de los sanos, no tenía suficiente muestra para el procesamiento de las pruebas diagnósticas moleculares. Las que amplificaron adecuadamente desde el inicio fueron 13.59% (14/103); 21.35% (22/103) fueron reamplificadas, y de ellas 45.45% (10/22) fueron recuperadas, es decir, 9.7% (10/103) de las muestras.

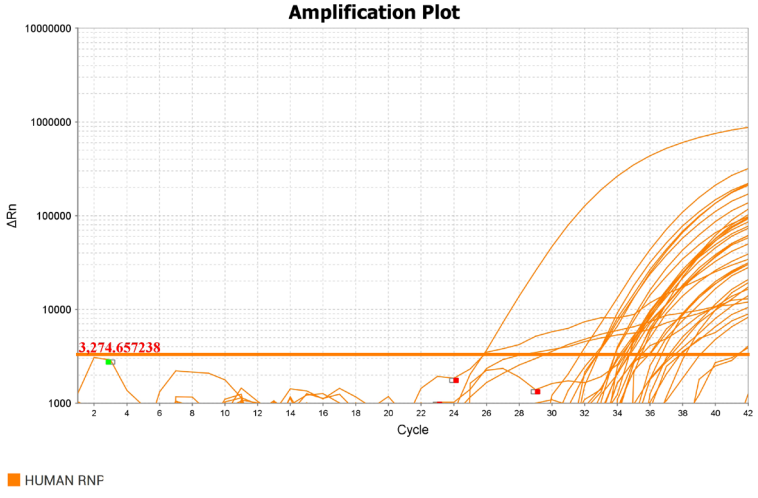
Usando la detección molecular con PCR-ITS convencional se encontró que el 31.4% (16/51) de los pacientes con onicomicosis y 15.4% (8/52) de los participantes sanos, tuvieron PCR positiva. Se observa en

el gel de agarosa los resultados de la PCR-ITS para hongos de una de las amplificaciones iniciales en la Figura 19 y el gel de una reamplificación en la Figura 20.

**Figura 18.**

*Gráfico de amplificación del gen RNP del control de C. albicans (A) y del consolidado de todas las muestras analizadas (B). Se observan las curvas de fusión de cada muestra, donde se evidencia la variación de fluorescencia en cada ciclo de PCR. En el eje X (horizontal) se aprecia el número de ciclos y en el eje Y (vertical) la fluorescencia, la línea naranja transversal es el umbral. El ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral es el valor de Ct, cuando es menor a 38 se considera bajo (como vemos en la mayoría de las muestras), lo que indica que hay una gran cantidad de transcripciones, ya que en pocos ciclos se alcanza el umbral de fluorescencia y por tanto el gen RNP investigado tiene una expresión muy alta.*






ÍNDICE

**Figura 19.**

*Electroforesis en gel de agarosa #1 del producto de la PCR-ITS para hongos. Tamaño esperado del amplicón: 1500 pb*. Línea 0: marcador de peso molecular; línea B: control negativo; línea 1: control positivo Candida sp.; línea 2 y 3: muestras negativas; línea 4 y 5: control positivo T. rubrum con estuche de extracción Prepman Ultra; línea 6: muestra negativa; línea 7 y 8: control positivo T. rubrum con estuche de extracción DNeasy PowerPlant; línea 9 a 11: muestras negativas. Foto tomada en transiluminador UV Fisher® Scientific Modelo 88A (Fisher biotech).*

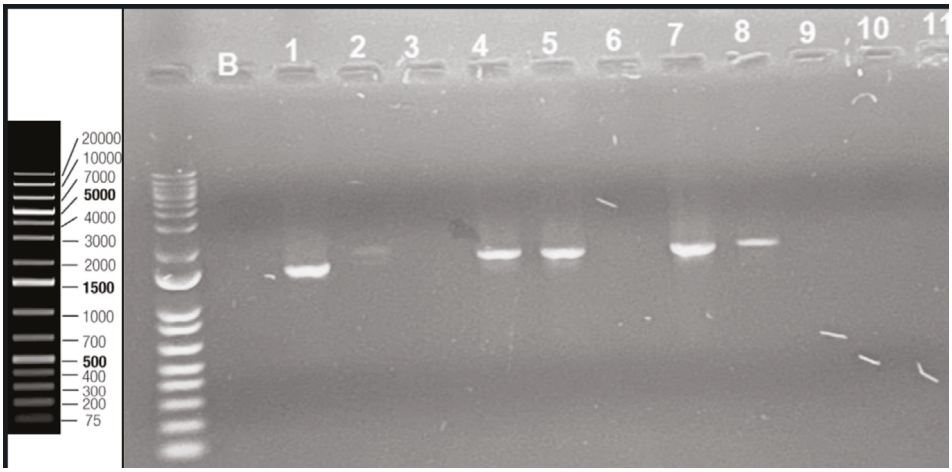
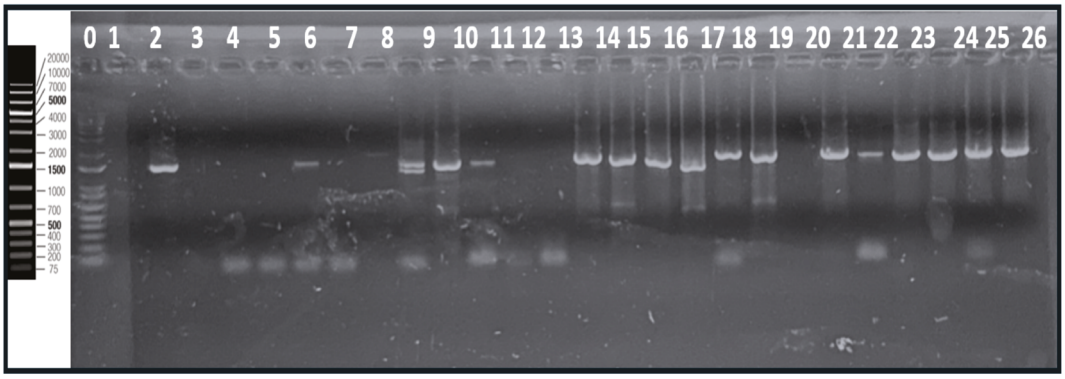



**Figura 20.**

*Electroforesis en gel de agarosa #2 del producto de la reamplificación de la PCR- ITS para hongos. Tamaño esperado del amplicón: 1500 pb*. Línea 0: marcador de peso molecular; línea 1: control negativo; línea 2: control positivo Candida sp.; línea 3 a 5: muestras negativas; línea 6: muestra positiva; línea 7 y 8: muestras negativas; línea 9 a 11: muestra positiva; línea 12 y 13: muestras negativas; línea 14 a 19: muestras positivas; línea 20: muestra negativa; línea 21 a 26: muestras positivas. La flecha a la izquierda señala las bandas inferiores a 200 pb que corresponden a restos de cebadores de la PCR y la flecha de la derecha señala bandas inferiores inespecíficas. Foto tomada en transiluminador UV Fisher Scientific Modelo 88A (Fisher biotech).*



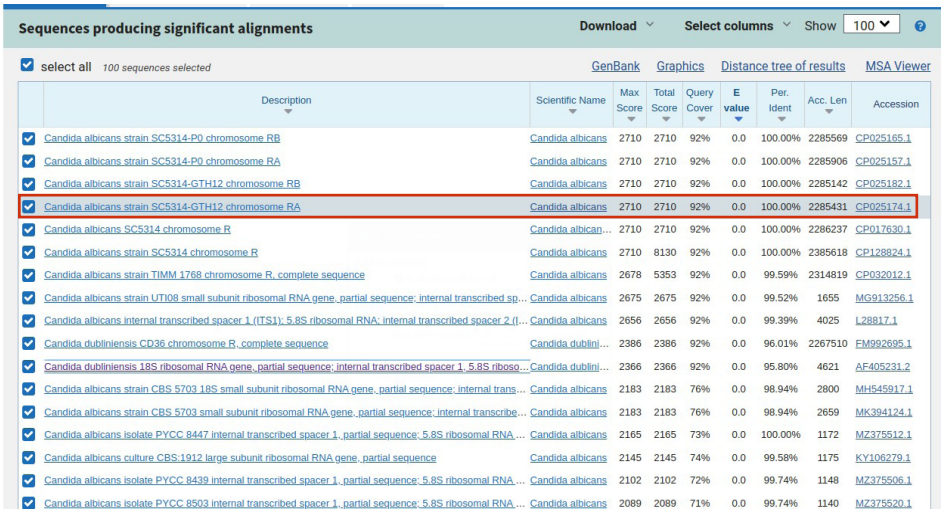
## 4.5.4 Secuenciación

Dado que la secuenciación es más sensible que la PCR y logra secuenciar pequeñas trazas de ADN aun cuando las bandas de PCR sean débiles o poco perceptibles (71,72), se le realizó la secuenciación a todos los amplicones, se hayan evidenciado o no en el gel de electroforesis.

Las secuencias de consenso obtenidas se alinearon con la base de datos no redundante (nr) utilizando BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para determinar el valor de identidad máximo. Para el análisis se consideraron las puntuaciones de bits más altas asignadas a la consulta. En las Figuras 21, 22 y 23 se muestran ejemplos de los resultados del BLAST del alineamiento local realizado en el NCBI.

**Figura 21.**

*Resultados del BLAST descriptivo del alineamiento local realizado en el NCBI de una de las secuencias obtenidas que mostró homología con Candida albicans. Entrada del Gen Bank CP025174.1.*



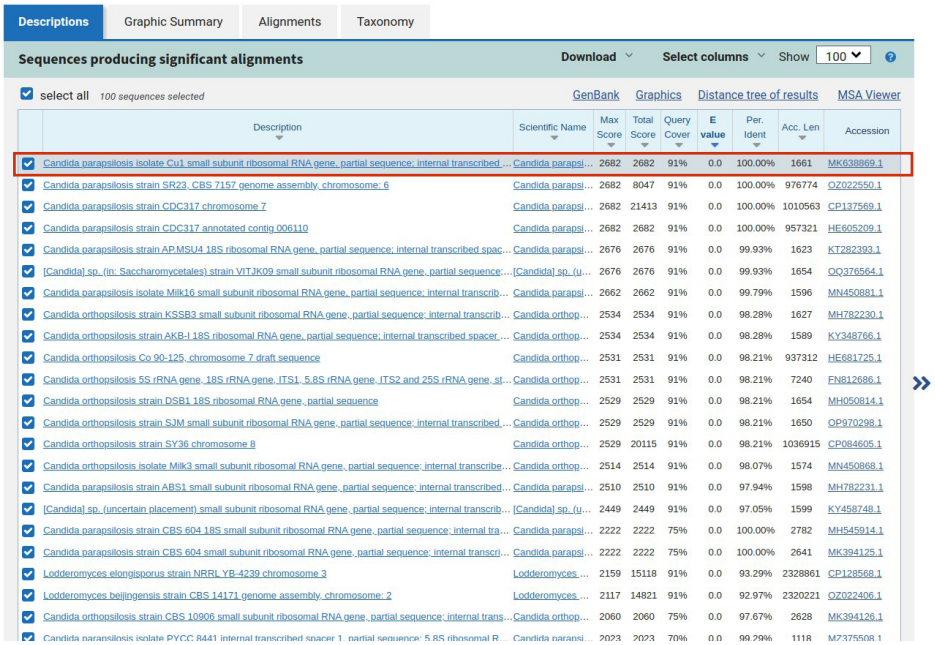
**Sequences producing significant alignments** — Download — Select columns — Show 100

select all *100 sequences selected* — GenBank — Graphics — Distance tree of results — MSA Viewer

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Candida albicans strain SC5314-P0 chromosome RB | Candida albicans | 2710 | 2710 | 92% | 0.0 | 100.00% | 2285569 | CP025165.1 |
| Candida albicans strain SC5314-P0 chromosome RA | Candida albicans | 2710 | 2710 | 92% | 0.0 | 100.00% | 2285906 | CP025157.1 |
| Candida albicans strain SC5314-GTH12 chromosome RB | Candida albicans | 2710 | 2710 | 92% | 0.0 | 100.00% | 2285142 | CP025182.1 |
| Candida albicans strain SC5314-GTH12 chromosome RA | Candida albicans | 2710 | 2710 | 92% | 0.0 | 100.00% | 2285431 | CP025174.1 |
| Candida albicans SC5314 chromosome R | Candida albican... | 2710 | 2710 | 92% | 0.0 | 100.00% | 2286237 | CP017630.1 |
| Candida albicans strain SC5314 chromosome R | Candida albicans | 2710 | 8130 | 92% | 0.0 | 100.00% | 2385618 | CP128824.1 |
| Candida albicans strain TIMM 1768 chromosome R, complete sequence | Candida albicans | 2678 | 5353 | 92% | 0.0 | 99.59% | 2314819 | CP032012.1 |
| Candida albicans strain UTI08 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp... | Candida albicans | 2675 | 2675 | 92% | 0.0 | 99.52% | 1655 | MG913256.1 |
| Candida albicans internal transcribed spacer 1 (ITS1): 5.8S ribosomal RNA; internal transcribed spacer 2 (I... | Candida albicans | 2656 | 2656 | 92% | 0.0 | 99.39% | 4025 | L28817.1 |
| Candida dubliniensis CD36 chromosome R, complete sequence | Candida dublini... | 2386 | 2386 | 92% | 0.0 | 96.01% | 2267510 | FM992695.1 |
| Candida dubliniensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboso... | Candida dublini... | 2366 | 2366 | 92% | 0.0 | 95.80% | 4621 | AF405231.2 |
| Candida albicans strain CBS 5703 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans... | Candida albicans | 2183 | 2183 | 76% | 0.0 | 98.94% | 2800 | MH545917.1 |
| Candida albicans strain CBS 5703 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe... | Candida albicans | 2183 | 2183 | 76% | 0.0 | 98.94% | 2659 | MK394124.1 |
| Candida albicans isolate PYCC 8447 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ... | Candida albicans | 2165 | 2165 | 73% | 0.0 | 100.00% | 1172 | MZ375512.1 |
| Candida albicans culture CBS:1912 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence | Candida albicans | 2145 | 2145 | 74% | 0.0 | 99.58% | 1175 | KY106279.1 |
| Candida albicans isolate PYCC 8439 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ... | Candida albicans | 2102 | 2102 | 72% | 0.0 | 99.74% | 1148 | MZ375506.1 |
| Candida albicans isolate PYCC 8503 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ... | Candida albicans | 2089 | 2089 | 71% | 0.0 | 99.74% | 1140 | MZ375520.1 |

**Figura 22.**

*Resultados del BLAST descriptivo del alineamiento local realizado en el NCBI de una de las secuencias que mostró homología con Candida parapsilosis. Entrada del Gen Bank MK 638869.1*



Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

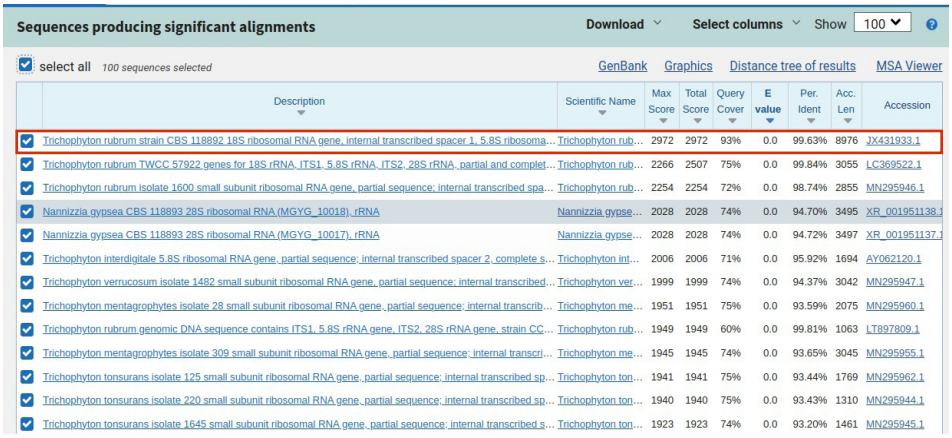
Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Candida parapsilosis isolate Cu1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed ... | Candida parapsi... | 2682 | 2682 | 91% | 0.0 | 100.00% | 1661 | MK638869.1 |
| Candida parapsilosis strain SR23, CBS 7157 genome assembly, chromosome: 6 | Candida parapsi... | 2682 | 8047 | 91% | 0.0 | 100.00% | 976774 | OZ022550.1 |
| Candida parapsilosis strain CDC317 chromosome 7 | Candida parapsi... | 2682 | 21413 | 91% | 0.0 | 100.00% | 1010563 | CP137569.1 |
| Candida parapsilosis strain CDC317 annotated contig 006110 | Candida parapsi... | 2682 | 2682 | 91% | 0.0 | 100.00% | 957321 | HE605209.1 |
| Candida parapsilosis strain AP.MSU4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac... | Candida parapsi... | 2676 | 2676 | 91% | 0.0 | 99.93% | 1623 | KT282393.1 |
| [Candida] sp. (in: Saccharomycetales) strain VITJK09 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence;... | [Candida] sp. (u... | 2676 | 2676 | 91% | 0.0 | 99.93% | 1654 | OQ376564.1 |
| Candida parapsilosis isolate Milk16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib... | Candida parapsi... | 2662 | 2662 | 91% | 0.0 | 99.79% | 1596 | MN450881.1 |
| Candida orthopsilosis strain KSSB3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib... | Candida orthop... | 2534 | 2534 | 91% | 0.0 | 98.28% | 1627 | MH782230.1 |
| Candida orthopsilosis strain AKB-I 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer ... | Candida orthop... | 2534 | 2534 | 91% | 0.0 | 98.28% | 1589 | KY348766.1 |
| Candida orthopsilosis Co 90-125, chromosome 7 draft sequence | Candida orthop... | 2531 | 2531 | 91% | 0.0 | 98.21% | 937312 | HE681725.1 |
| Candida orthopsilosis 5S rRNA gene, 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 25S rRNA gene, st... | Candida orthop... | 2531 | 2531 | 91% | 0.0 | 98.21% | 7240 | FN812686.1 |
| Candida orthopsilosis strain DSB1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence | Candida orthop... | 2529 | 2529 | 91% | 0.0 | 98.21% | 1654 | MH050814.1 |
| Candida orthopsilosis strain SJM small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed ... | Candida orthop... | 2529 | 2529 | 91% | 0.0 | 98.21% | 1650 | OP970298.1 |
| Candida orthopsilosis strain SY36 chromosome 8 | Candida orthop... | 2529 | 20115 | 91% | 0.0 | 98.21% | 1036915 | CP084605.1 |
| Candida orthopsilosis isolate Milk3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe... | Candida orthop... | 2514 | 2514 | 91% | 0.0 | 98.07% | 1574 | MN450868.1 |
| Candida parapsilosis strain ABS1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed... | Candida parapsi... | 2510 | 2510 | 91% | 0.0 | 97.94% | 1598 | MH782231.1 |
| [Candida] sp. (uncertain placement) small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib... | [Candida] sp. (u... | 2449 | 2449 | 91% | 0.0 | 97.05% | 1599 | KY458748.1 |
| Candida parapsilosis strain CBS 604 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra... | Candida parapsi... | 2222 | 2222 | 75% | 0.0 | 100.00% | 2782 | MH545914.1 |
| Candida parapsilosis strain CBS 604 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri... | Candida parapsi... | 2222 | 2222 | 75% | 0.0 | 100.00% | 2641 | MK394125.1 |
| Lodderomyces elongisporus strain NRRL YB-4239 chromosome 3 | Lodderomyces ... | 2159 | 15118 | 91% | 0.0 | 93.29% | 2328861 | CP128568.1 |
| Lodderomyces beijingensis strain CBS 14171 genome assembly, chromosome: 2 | Lodderomyces ... | 2117 | 14821 | 91% | 0.0 | 92.97% | 2320221 | OZ022406.1 |
| Candida orthopsilosis strain CBS 10906 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans... | Candida orthop... | 2060 | 2060 | 75% | 0.0 | 97.67% | 2628 | MK394126.1 |
| Candida parapsilosis isolate PYCC 8441 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R... | Candida parapsi... | 2023 | 2023 | 70% | 0.0 | 99.29% | 1118 | MZ375508.1 |

**Figura 23.**

*Resultados del BLAST descriptivo del alineamiento local realizado en el NCBI de una de las secuencias obtenidas que mostró homología con Trichophyton rubrum. Entrada del Gel Bank JX431933.1*



Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Trichophyton rubrum strain CBS 118892 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosoma... | Trichophyton rub... | 2972 | 2972 | 93% | 0.0 | 99.63% | 8976 | JX431933.1 |
| Trichophyton rubrum TWCC 57922 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complet... | Trichophyton rub... | 2266 | 2507 | 75% | 0.0 | 99.84% | 3055 | LC369522.1 |
| Trichophyton rubrum isolate 1600 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa... | Trichophyton rub... | 2254 | 2254 | 72% | 0.0 | 98.74% | 2855 | MN295946.1 |
| Nannizzia gypsea CBS 118893 28S ribosomal RNA (MGYG_10018), rRNA | Nannizzia gypse... | 2028 | 2028 | 74% | 0.0 | 94.70% | 3495 | XR_001951138.1 |
| Nannizzia gypsea CBS 118893 28S ribosomal RNA (MGYG_10017), rRNA | Nannizzia gypse... | 2028 | 2028 | 74% | 0.0 | 94.72% | 3497 | XR_001951137.1 |
| Trichophyton interdigitale 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete s... | Trichophyton int... | 2006 | 2006 | 71% | 0.0 | 95.92% | 1694 | AY062120.1 |
| Trichophyton verrucosum isolate 1482 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed... | Trichophyton ver... | 1999 | 1999 | 74% | 0.0 | 94.37% | 3042 | MN295947.1 |
| Trichophyton mentagrophytes isolate 28 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib... | Trichophyton me... | 1951 | 1951 | 75% | 0.0 | 93.59% | 2075 | MN295960.1 |
| Trichophyton rubrum genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain CC... | Trichophyton rub... | 1949 | 1949 | 60% | 0.0 | 99.81% | 1063 | LT897809.1 |
| Trichophyton mentagrophytes isolate 309 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri... | Trichophyton me... | 1945 | 1945 | 74% | 0.0 | 93.65% | 3045 | MN295955.1 |
| Trichophyton tonsurans isolate 125 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp... | Trichophyton ton... | 1941 | 1941 | 75% | 0.0 | 93.44% | 1769 | MN295962.1 |
| Trichophyton tonsurans isolate 220 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp... | Trichophyton ton... | 1940 | 1940 | 75% | 0.0 | 93.43% | 1310 | MN295944.1 |
| Trichophyton tonsurans isolate 1645 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s... | Trichophyton ton... | 1923 | 1923 | 74% | 0.0 | 93.20% | 1461 | MN295945.1 |

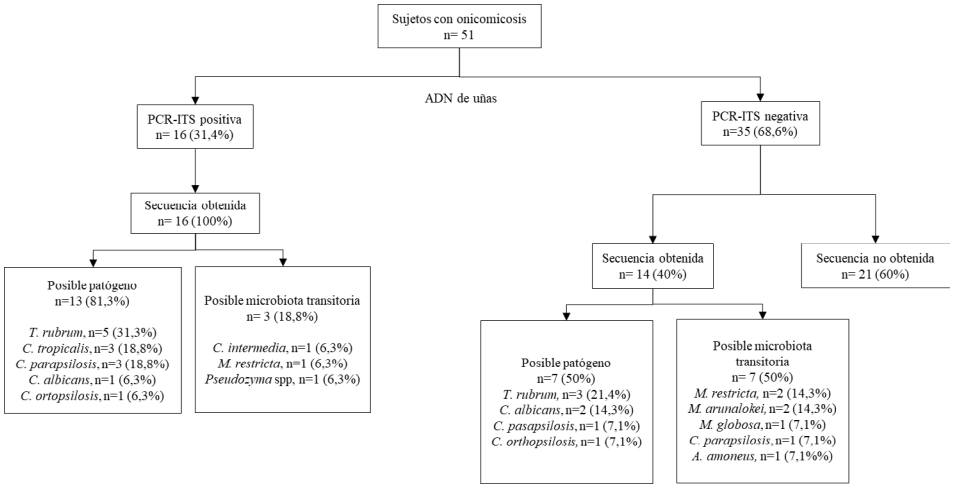
### 4.5.5 Comparación diagnóstico molecular (PCR-ITS vs. Secuenciación)

Entre los 51 participantes con onicomicosis, se obtuvieron 16 resultados positivos en la PCR-ITS, de los cuales 5 (31.2%) fueron por reamplificación, para una sensibilidad estimada de 31.4% (IC95% 18.6-44.1). Se obtuvo una secuencia en 30 participantes con onicomicosis (16 con PCR positiva y 14 con PCR negativa) para una sensibilidad del 58.8% (IC95% 45.3-72.3), aunque 10 (33.3%) se consideraron como posible microbiota transitoria (Figura 24). La mediana del porcentaje de cobertura de las 30 muestras con secuencias positivas fue del 92% (rango 84-96), mientras que la mediana del porcentaje de la identificación fue del 100% (rango 96-100%).

Utilizando la prueba binomial exacta para pruebas pareadas se determinó que la PCR-ITS tenía una sensibilidad menor que la secuenciación (valor-p <0,001), el KOH (valor-p <0,001) y que el cultivo (valor-p <0,001).

**Figura 24.**

*Flujograma de los resultados de PCR-ITS y secuenciación en los participantes con onicomicosis.*



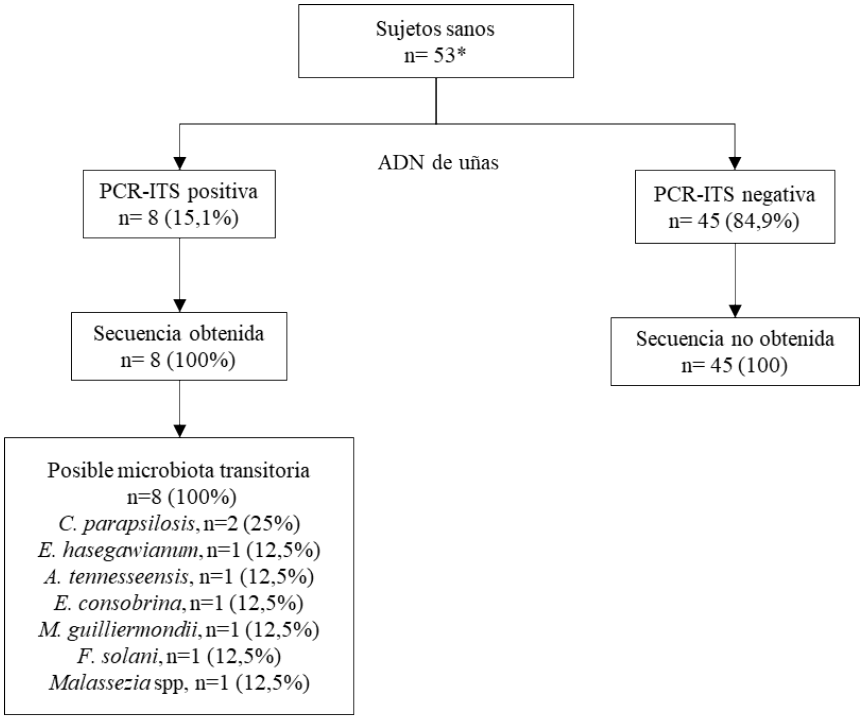

Entre los 52 participantes sanos, se obtuvieron 8 resultados positivos en la PCR-ITS, de los cuales 5 (62.5%) fueron por reamplificación, para una especificidad estimada de 84.6% (IC95% 74.8-94.4). Se obtuvieron

8 secuencias en los sujetos sanos, para una especificidad estimada de 84.6% (IC95% 74.8- 94.4). A diferencia de los sujetos del grupo con onicomicosis, en los sujetos sanos solo se obtuvo secuencias en sujetos con PCR positiva, aislando 8 secuencias de hongos compatibles con microbiota transitoria (Figura 25). La mediana del porcentaje de cobertura entre las 8 muestras con secuencias positivas fue del 92% (rango 72-95%), mientras que la mediana del porcentaje de identificación fue del 100% (rango 74-100%).

Utilizando la prueba binomial exacta para pruebas pareadas se determinó que la PCR-ITS y la secuenciación tenían una especificidad menor que el KOH (valor-p=0.00781) y el cultivo (valor-p=0.00781).

**Figura 25.**

*Flujograma de los resultados de PCR-ITS y secuenciación en los participantes sanos. *De los 53 participantes sanos, hubo uno con una muestra insuficiente para el procesamiento de las pruebas moleculares.*




* Una de las muestras fue considerada insuficiente para los análisis

Al comparar los resultados de la PCR-ITS y la secuenciación con la concentración de ADN, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

## 4.6 COMPARACIÓN DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO CONVENCIONAL VS MOLECULAR

La Tabla 17 muestra los resultados de KOH, cultivo, *RNP*, PCR-ITS y secuenciación en los participantes con onicomicosis. Entre los 46 participantes con KOH positivos, 30 (65.2%) tenían un cultivo positivo, 15 (32.6%) una PCR positiva y en 29 (63%) se pudo identificar un agente asociado por secuenciación. En este grupo se logró obtener secuencias genómicas entre los participantes con onicomicosis que tenían PCR positiva y negativa; en los participantes con onicomicosis de PCR positiva, fue más frecuente la identificación de secuencias de hongos considerados como patógenos.

De los 35 pacientes con cultivo positivo, en 23 (65.7%) de los que tenían aislamiento del hongo se identificó una secuencia genómica, 10 (43.5%) coincidieron en género y especie: *C. albicans* (n=3*), T. rubrum* (n=4), *C. tropicalis* (n= 1), *C. parapsilosis* (n= 2); 8 (34.8%) coincidieron sólo en el género: *Candida* spp. (n= 4), *Trichophyton* spp. (n=4), 1 (4.5%) (*N. dimidiatum* por cultivo y *C. tropicalis* por secuenciación) no coincidió ni en género ni en especie y 4 (17.4%) fueron considerados como microbiota transitoria (*Malassezia arunalokei, M. globosa, M. restricta* y *Candida intermedia*).

Se identificaron 4 secuencias entre los 12 sujetos con KOH positivo, pero con cultivo y PCR negativos, de los cuales todos fueron considerados parte de la microbiota transitoria (*Malassezia restricta, M. arunalokei C. parapsilosis y Aspergillus amoenus*) y una secuencia en un sujeto con KOH positivo, pero con cultivo negativo y PCR positivo que también se consideró de la microbiota transitoria (*Pseudozyma* spp). Entre los 5 sujetos con KOH negativo y cultivo positivo, uno tenía la PCR y secuenciación

positiva, con identificación de *C. tropicalis* por ambas metodologías, siendo considerada patógena, mientras que la PCR y la secuenciación fueron negativas en los otros casos.

**Tabla 17.**

*Resultados de KOH, cultivo, RNP, PCR-ITS y secuenciación de los participantes con onicomicosis.*

| ID | KOH | Estructuras | Cultivo | *RNP* | PCR-ITS | Secuenciación |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| 4 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| 5 | Positivo | HH | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 6 | Positivo | B | *Candida albicans*+ *Trichosporon asahii* | Negativo | Negativo | *C. parapsilosis* |
| 7 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Positivo | *T. rubrum* |
| 8 | Positivo | HH | *C. albicans* | Positivo | Negativo | *C. orthopsilosis* |
| 9 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Negativo | Negativo |
| 10 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Negativo | *M. restricta** |
| 11 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Positivo | *T. rubrum* |
| 12 | Positivo | HH | *T. interdigitale* | Negativo | Negativo | *M. arunalokei** |
| 13 | Positivo | B | *C. orthopsilosis* | Positivo | Positivo | *C. parapsilosis* |
| 14 | Positivo | B | *C. parapsilosis (s.s)* | Positivo | Positivo | *C. parapsilosis* |
| 15 | Positivo | A | *T. mentagrophytes* | Positivo | Positivo | *T. rubrum* |
| 16 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Negativo | *M. arunalokei** |
| 18 | Positivo | B | *C. albicans* | Positivo | Positivo | *C. orthopsilosis* |
| 19 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| 20 | Positivo | B | Negativo | Positivo | Positivo | *Pseudozyma spp.** |
| 22 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Negativo | Negativo |
| 23 | Negativo | Negativo | *N. dimidiatum* | Positivo | Negativo | Negativo |
| 25 | Negativo | Negativo | *Fusarium* | Negativo | Negativo | Negativo |
| 27 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Negativo | Negativo |
| 29 | Positivo | HH | *C. albicans* | Positivo | Negativo | *C. albicans* |
| 30 | Negativo | Negativo | *C. tropicalis* | Positivo | Positivo | *C. tropicalis* |
| 33 | Positivo | B | *C. parapsilosis (s.s)* + *T. rubrum* | Positivo | Positivo | *C. parapsilosis* |
| 34 | Positivo | HH | *T. mentagrophytes* | Negativo | Negativo | *T. rubrum* |
| 35 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Negativo | Negativo |
| 36 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| 37 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Negativo | Negativo | Negativo |
| 39 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Negativo | Negativo |
| 40 | Positivo | HH | Negativo | Negativo | Negativo | *C. parapsilosis** |
| 41 | Positivo | HP | *N. dimidiatum* | Positivo | Positivo | *C. tropicalis* |
| 43 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Negativo | *A. amoneus** |
| 44 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Negativo | Negativo | *T. rubrum* |
| 45 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Negativo | Negativo | *M. globosa** |

*Continuación tabla 17.*

| ID | KOH | Estructuras | Cultivo | *RNP* | PCR-ITS | Secuenciación |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 46 | Positivo | HH | *N. dimidiatum* | Positivo | Negativo | *M. restricta** |
| 47 | Positivo | HH | *T. mentagrophytes* | Positivo | Negativo | *T. rubrum* |
| 48 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Positivo | *T. rubrum* |
| 49 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Negativo | Negativo |
| 51 | Negativo | Negativo | *T. mentagrophytes* | Negativo | Negativo | Negativo |
| 52 | Positivo | A | Negativo | Positivo | Positivo | *C. tropicalis* |
| 53 | Positivo | A | *T. mentagrophytes* | Positivo | Positivo | *C. intermedia** |
| 54 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Positivo | *M. restricta** |
| 55 | Positivo | HH | *C. albicans* | Positivo | Negativo | *C. albicans* |
| 56 | Positivo | B | *C. albicans* | Positivo | Positivo | *C. albicans* |
| 57 | Positivo | HH | *T. rubrum* | Positivo | Negativo | Negativo |
| 58 | Positivo | HH | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 59 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| 60 | Positivo | HH | *T. tonsurans* | Positivo | Positivo | *T. rubrum* |
| 68 | Negativo | Negativo | *T. rubrum* | Negativo | Negativo | Negativo |
| 72 | Positivo | HH | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| 78 | Positivo | B | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |

A: Artroconidias, B: Blastoconidias, HH: Hifas hialinas, HP: Hifas pigmentadas
*Posible microbiota transitoria

La Tabla 18 muestra los resultados del KOH, del cultivo, del *RNP*, de la PCR-ITS y de la secuenciación en los participantes sanos. Se observa que en quienes se identificó una secuencia genómica para hongos, todos tenían PCR positiva. Los hongos identificados se consideran parte de la microbiota transitoria. Los datos de las demás muestras se obvian, porque eran negativas en todas las pruebas.

**Tabla 18.**

*Resultados de KOH, cultivo, RNP, PCR y secuenciación de los participantes sanos a quienes se les identificó una secuencia genómica para hongos y PCR positiva.*

| ID | KOH | Cultivo | *RNP* | PCR-ITS | Secuenciación |
|---|---|---|---|---|---|
| 83 | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | *C. parapsilosis** |
| 85 | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | *C. parapsilosis** |
| 86 | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | *F. solani** |
| 87 | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | *M. guilliermondii** |
| 112 | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | *E. consobrina** |
| 113 | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | *E. hasegawianum** |
| 116 | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | *A. tennesseensis** |
| 118 | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | *Malassezia sp.** |

*Posible microbiota transitoria



ÍNDICE

Al realizar la correlación de los resultados de los cultivos de los pacientes con onicomicosis con los resultados de la secuenciación, se observa que el género de hongos que presentó una mejor correspondencia entre ellos fueron las levaduras, con una diferencia estadísticamente significativa entre la concordancia entre el cultivo y la secuenciación y el grupo de microorganismos, (valor p=0.00041, prueba exacta de Fisher) como se evidencia en la Tabla 19.

**Tabla 19.**
*Correlación entre los resultados del cultivo y la secuenciación.*

| Agente causal | Aislamientos en cultivo | Secuenciados | % de concordancia |
|---|---|---|---|
| Dermatofitos | 21 | 8 | 38.1 |
| Levaduras | 8 | 8 | 100 |
| MND | 4 | 0 | 0 |

Se encontró que la prueba que mostró mayor positividad fue el KOH con un (90.2%), seguida por el cultivo (68.6%), la secuenciación (58.8%) y la PCR-ITS (31.4%) (Tabla 20).

**Tabla 20.**
*Resultados de las pruebas de los sujetos con onicomicosis.*

| KOH | | Cultivo | | PCR | | Secuenciación | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Positivo (%) | Negativo (%) | Positivo (%) | Negativo (%) | Positivo (%) | Negativo (%) | Positivo (%) | Negativo (%) |
| 46 (90.2) | 5 (9.8) | 35 (68.6) | 16 (31.4) | 16 (31.4) | 35 (68.6) | 30 (58.8) | 21 (41.2) |

Al comparar el rendimiento diagnóstico de las pruebas moleculares y las convencionales para el diagnóstico de onicomicosis, en la Tabla 21 se pueden ver los resultados, donde se evidencia que las pruebas convencionales en este experimento tienen un mejor rendimiento.

**Tabla 21.**

*Comparación del rendimiento de las pruebas moleculares con las convencionales.*

| | | Sensibilidad %(IC95%) | Especificidad %(IC95%) |
|---|---|---|---|
| **Pruebas diagnósticas** | **PCR-ITS** | 31.4 (18.6-44.1) | 84.6 (74.8-94.4) |
| | **Secuenciación** | 58.8 (45.3-72.3) | 84.6 (74.8-94.4) |
| | **Valor p** | <0.001[a] | 1.0[a] |
| | **Cultivo** | 68.6 (55.9-81.4) | 100* |
| | **Valor p** | <0.001[b] | 0.00781[b] |
| | **KOH** | 90.2 (82-98.4) | 100* |
| | **Valor p** | <0.001[c] | 0.00781[c] |

[a-c]Prueba binomial exacta para muestras pareadas

[a]Secuenciación vs PCR; [b]Cultivo vs PCR; [c]KOH vs PCR

* La especificidad del cultivo y el KOH se fijó en 100% por el diseño.



ÍNDICE

# CAPÍTULO V

# **DISCUSIÓN**

La prevalencia de onicomicosis en el mundo es cada vez más alta (45%) (7,22,79-83), posiblemente asociada con el aumento de la población de adultos mayores, así como con el incremento de la migración y el desplazamiento poblacional, los climas más húmedos y cálidos, el uso irresponsable de corticosteroides tópicos que con facilidad se obtienen sin prescripción médica; el aumento en el uso de antibióticos de amplio espectro; el incremento de la población inmunocomprometida; el uso desenfrenado de antifúngicos en agroindustrias, y la resistencia a antifúngicos (7,56). La mayoría de las publicaciones se centran en la prevalencia y en los agentes etiológicos más frecuentes; sin embargo, hay pocos estudios que comparen los diferentes métodos diagnósticos (1,5,14-18,84-91). En Colombia no había hasta el momento publicaciones donde se muestre el uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de onicomicosis como complemento de las técnicas convencionales como examen directo con KOH y cultivo para hongos (7).

Se conoce que la frecuencia de onicomicosis en la población va incrementando a medida que la población se hace mayor, pues la edad afecta la velocidad de crecimiento y las características de las uñas, por lo cual la población mayor es más propensa a padecer onicomicosis. En el

presente trabajo la mediana de la edad de los pacientes con onicomicosis fue de 63 años, similar a lo encontrado por otros autores (20,25,26).

En este estudio el 21,6 % de los afectados tenían historia personal de padecer onicomicosis, y el 31,4 % signos clínicos de otra micosis superficial como *tinea pedis*; esta forma de dermatofitosis se ha descrito como un factor predisponente para el desarrollo de onicomicosis más frecuente (92).

También se evidenció que las formas clínicas más frecuentes fueron la subungueal distal (43,1 %) y subungueal distal lateral (33,3 %), lo cual está de acuerdo con lo reportado en varios estudios realizados (8-11,23,32,43,53,83), mientras que la variedad clínica blanca superficial fue la menos frecuente (29).

Con relación al sitio de afección se encontró mayor compromiso de las uñas de los pies (76,5 %), como ha sido informado por otros investigadores (8-11,23,32,43,53,83). Este sitio se afecta con más frecuencia, probablemente por la exposición continua a traumas y el crecimiento más lento comparado con el de las uñas de las manos, lo cual favorece la invasión de la placa ungueal por el hongo. También se encontró que las uñas de las manos y la afectación simultánea de uñas de manos y pies presentaron una frecuencia igual de 11,8 %; estas ubicaciones no son tan frecuentes y cuando se encuentran, son más afectadas las uñas de manos que el compromiso simultáneo de los dos sitios, el cual se asocia con inmunosupresión (29,32,36,37). Al comparar estos resultados con los hallazgos encontrados en una publicación realizada en el 2004 igualmente en una población de la ciudad de Cali (10), se observa que a pesar de haber pasado 20 años, sigue el predominio de la onicomicosis en las uñas de los pies (77 %).

En este trabajo el examen directo con KOH mostró una sensibilidad de 90,2 %, mientras que la sensibilidad que mostró el cultivo fue de 68,6 %; otros investigadores informan porcentajes entre 44-100 % y 29-82 %, respectivamente (11,15); estos resultados indican que la sensibilidad del examen directo con KOH con relación a la sensibilidad del cultivo

es mayor. La sensibilidad baja de los cultivos puede deberse a la no viabilidad de los hongos, a recibir tratamiento antimicótico previo y a la calidad y cantidad de la muestra (84). Aun conociendo que la sensibilidad del examen directo con KOH es mayor comparada con la del cultivo, en el presente trabajo cinco participantes del grupo de enfermos tuvieron cultivo positivo con examen directo de KOH negativo, un examen directo con KOH en el que en el momento de la observación microscópica no se observaron las estructuras micóticas presentes como sucede en algunos casos donde son muy ocasionales o debido a la distribución no homogénea de la muestra al momento de dividirla en tres partes para los diferentes estudios diagnósticos (43,46).

Con relación a los agentes etiológicos de onicomicosis en la población estudiada se encontraron hongos dermatofitos, levaduras y MND. Los hongos filamentosos dermatofitos fueron el grupo más frecuente (60 %), seguido de levaduras (22,9 %), resultados muy similares a los reportados en estudios publicados previamente en Colombia y otros países como Japón, Canadá, Italia, EE. UU. y México(6,9,10,17,20,26,29,32,33). El género y la especie más frecuente en este trabajo fue *T. rubrum*, dato similar a los publicados anteriormente en trabajos donde este, además de ser el principal agente causal, también es el agente más frecuentemente aislado en las uñas de los pies (6,9,10,17,20,26,29,32,33). *T. rubrum* es el hongo dermatofito aislado con más frecuencia en todo el mundo, alcanzando valores hasta de 86,5 % en algunas poblaciones (31). El porcentaje de frecuencia (40 %) informado en el actual estudio es mayor a lo reportado en otras publicaciones realizadas con poblaciones colombianas (8-11), donde previamente se había informado la presencia de este agente con valores de frecuencia de hasta 30 % (10).

En esta investigación *T. mentagrophytes* (14,3 %) y *C. albicans* (14,3 %) ocuparon el segundo lugar en frecuencia como agentes etiológicos responsables de onicomicosis, en la población estudiada. *T. mentagrophytes* pertenece al Complejo *T. mentagrophytes* (91,92), el cual es el segundo agente etiológico más aislado en dermatofitosis de piel y de uñas en humanos y animales (16,87,92,93). Está asociado como agente causal de *tinea pedis*, a partir de la cual se puede desarrollar onicomicosis

(94). Publicaciones previas realizadas en Colombia han mostrado una frecuencia de 11 % (8,9) y en la literatura mundial se encuentran hasta en el 20 % de los casos reportados en países como EE. UU. (23).

*Candida albicans* es una levadura oportunista, perteneciente a la división *Ascomycota*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, encontrada con frecuencia en la población inmunocomprometida. Algunas especies del género *Candida* exhiben resistencia conocida a algunos antimicóticos como los azoles (56,57). El porcentaje de frecuencia (14,3 %) que se encontró en este trabajo es menor a lo publicado previamente en Colombia (8-11). La prevalencia de esta levadura en muestras de uñas se ha notificado en países como Argentina hasta en un 16,5 % (31). En el presente trabajo se reporta también el aislamiento e identificación de n = 1 (2,9 %) de *Candida orthopsilosis*, la cual es una especie que pertenece al complejo *C. parapsilosis*, como también n = 1 (2,9 %) de *C. parapsilosis* (s.s.), las cuales se pudieron identificar con precisión con el uso de MALDI-TOF.

Adicionalmente se aislaron n = 4 (11,4 %) de MND, siendo *N. dimidiatum* el de mayor frecuencia n = 3 (8,6 %), seguido de *Fusarium* sp. n = 1 (2,9 %), ambos mohos no dermatofitos identificados por macromicromorfología. Estos son igualmente los MND más frecuentemente reportados a nivel nacional, donde *Fusarium* spp. ocupa el primer lugar en frecuencia (8,10). En esta investigación se aislaron un *Fusarium* y un *N. dimidiatum* cuyos exámenes directos con KOH fueron negativos, pero fueron considerados como agentes etiológicos porque dichos cultivos fueron repetidos y cumplieron los criterios de Gupta; y aunque estos MND poseen queratinasas y, por lo tanto, pueden producir onicomicosis, también pueden ser contaminantes en los cultivos en un momento dado.

Se encontró que dos pacientes tenían infecciones mixtas de tipo doble (5,7 %). La asociación de *C. parapsilosis* (s.s.) + *T. rubrum* (2,9 %) coincide con la información al respecto publicada de forma previa en Colombia (10); adicionalmente la asociación *C. albicans* + *Trichosporon asahii* (2,9 %) no se ha publicado en estudios nacionales e internacionales

previos (8-11,29,66). Los hongos del género *Trichosporon*, son habitantes normales del suelo y también del ser humano, que se caracterizan por la presencia de hifas verdaderas, pseudohifas, artroconidias y blastoconidias. Estos pueden comportarse como patógenos oportunistas produciendo infecciones graves en huéspedes inmunocomprometidos. Se conoce un caso de una paciente inmunocompetente en Colombia a la cual se le aisló un *Trichosporon* como agente etiológico de onicomicosis (95).

En la actual investigación, al igual que en otros estudios realizados en Medellín y Cali (8,10), se encontró mayor frecuencia de aislamientos de dermatofitos en las uñas de los pies (76 %) y de levaduras en uñas de las manos (60 %). Estas diferencias entre los grupos aislados y la localización anatómica fueron estadísticamente significativas (valor p = 0,006, prueba exacta de Fisher). También se halló que las infecciones mixtas causadas por la presencia de *C. parapsilosis* (s.s.) + *T. rubrum* se localizaron en uñas de pies (1/25: 4 %) y de *C. albicans* + *Trichosporon asahii* afectando de forma simultánea uñas de manos y de pies (1/5: 20 %).

El diagnóstico de onicomicosis en países en vía de desarrollo se realiza con mayor frecuencia en los laboratorios usando las técnicas convencionales (microscopía y cultivo para hongos); las publicaciones científicas resaltan su importancia en el diagnóstico de las infecciones fúngicas por hongos dermatofitos y MND en onicomicosis (31,33,45,47,80).

El examen directo con KOH es la técnica que se usa de rutina en los laboratorios de microbiología, porque es una prueba de bajo costo y cuyos resultados se pueden obtener en un tiempo corto; sin embargo, la especificidad y sensibilidad pueden variar dependiendo de varios factores inherentes a la muestra tomada o a los procesos y técnicas usadas en los diferentes laboratorios. si bien la mayoría de la información publicada sobre onicomicosis toma el examen directo con KOH como referencia, al comparar los resultados del examen directo con KOH y los resultados obtenidos por técnicas moleculares, se ha reportado mayor sensibilidad para los métodos moleculares (14-18,39,40,60-68).

El cultivo para hongos, por su parte, se considera el estándar de oro entre las pruebas diagnósticas para onicomicosis; sin embargo, su principal desventaja radica en que se debe esperar, en promedio, de tres a cuatro semanas para obtener un reporte final. Cabe destacar, además, que pueden presentarse falsos negativos en los cultivos por dificultades en el muestreo (uso de una técnica inadecuada, toma en un sitio no acorde con la variedad clínica, recolección de material insuficiente o uso de recortes de uñas en lugar de material subungueal) o por el uso previo de tratamiento antifúngico, entre otras causas (84). Adicionalmente, la interpretación de la presencia de mohos no dermatofitos (MND) en muestras de uñas resulta controvertida, pues dicha presencia puede deberse a contaminación, colonización temporal, infección secundaria a un traumatismo u otra enfermedad, o incluso a contaminación en el laboratorio; por tanto, se requiere la repetición de la prueba para considerarlo un agente patógeno (40,84).

En el presente estudio, de los 35 pacientes con cultivo positivo, en 23 (65,7 %) de los que tenían aislamiento del hongo se identificó una secuencia genómica, 10 (43,5 %) coincidieron en género y especie, 8 (34,8 %) concordaron solo en el género, 1 (4,5 %) no coincidió ni en género ni en especie. El hongo con divergencia entre el resultado del cultivo y la secuenciación fue un *N. dimidiatum* aislado por cultivo, pero con reporte de *C. tropicalis* en la secuenciación, siendo considerado *N. dimidiatum* como el agente causal, pues al examen directo se observaron hifas pigmentadas y su crecimiento en el agar Sabouraud está directamente relacionado con la presencia de células viables, mientras que la positividad de las pruebas moleculares depende de la presencia de ADN viable o no. También se secuenciaron 4 (17,4 %) hongos que, al realizar la correlación de los resultados de los exámenes directos, los cultivos y las pruebas moleculares de la Tabla 19, fueron considerados como parte de la microbiota transitoria (*Malassezia arunalokei, M. globosa, M. restricta* y *Candida intermedia*). En estos casos donde se encontraron discrepancias entre los resultados del cultivo y los resultados de la secuenciación, estas podrían indicar una posible contaminación, un rápido crecimiento del hongo colonizante o una verdadera doble infección, como lo reportan Prieto y cols. en su investigación (84,96). En efecto, estos autores describen que en los

participantes sanos en los que se obtuvo una secuencia genómica, al igual que en el presente estudio, solo identificaron hongos pertenecientes a la microbiota transitoria. El principal inconveniente que presentan las técnicas moleculares es la facilidad de presentar contaminación cruzada al amplificarse cantidades ínfimas de ADN. Otro de los posibles desaciertos es la posibilidad de sobrediagnosticar patologías en las que el hongo se encuentra en un nivel subclínico (84).

También al respecto del riesgo de contaminación con microbiota normal, Arammehr y cols. (85) refieren que esta es otra de las dificultades que se presentan al usar técnicas moleculares para el diagnóstico de onicomicosis en uñas, relacionadas con la extracción de ADN a partir de las uñas, las cuales pueden dar resultados falsos positivos y falsos negativos.

Cuando se determinó la concordancia entre los resultados de los cultivos con los resultados de la secuenciación, se observó que el género de hongos que presentó una mejor correspondencia entre ellos fueron las levaduras, con una diferencia estadísticamente significativa entre la concordancia entre el cultivo y la secuenciación y el grupo de microorganismos (valor p = 0,00041, prueba exacta de Fisher). Esto quizás se deba a que el tipo de cebadores utilizados sea más afín con las levaduras que con los dermatofitos y MND, o a que la secuencia blanco utilizada (ITS) sea más discriminatoria para levaduras (39).

Al comparar las técnicas diagnósticas convencionales, los resultados obtenidos en el presente estudio confirman una mayor sensibilidad del KOH (90,2 %) con respecto a la del cultivo (68,6 %) con una significancia estadística (valor p = 0,0266), así como también encontró una concordancia considerable entre ambas pruebas (coeficiente de Kappa = 0,62). Al usar de forma complementaria para el diagnóstico de onicomicosis la PCR-ITS convencional y la secuenciación de nueva generación por nanoporos, los valores de sensibilidad hallados en este estudio fueron: PCR 31,4 % y secuenciación 58,8 %, respectivamente; esto difiere de los resultados obtenidos por las técnicas convencionales usadas (KOH 90,2 % y cultivo 68,6 %), lo que confirma la pertinencia de

estandarizar y mejorar estas herramientas moleculares para el diagnóstico de onicomicosis.

El uso de las técnicas moleculares ha complementado el diagnóstico convencional de la onicomicosis (1,5,14-18,84-91). Lo que se busca en una prueba para el diagnóstico de onicomicosis es que sea altamente sensible y específica; cualidades esperables en principio en este tipo de herramientas por cuanto ellas pueden detectar moléculas (ADN, ARN o proteínas) que diferencian, en medio de la diversidad genética, a una especie de otra, lo que en algunos casos se dificulta de determinar usando solo los métodos convencionales que se apoyan en las características macroscópicas y microscópicas del cultivo. La correcta identificación de los agentes etiológicos en onicomicosis permite instaurar el tratamiento correcto (85,86).

La información obtenida en esta investigación no es comparable con lo publicado a nivel internacional, dado que se utilizó la secuenciación de nueva generación con Oxford Nanopore MinION® (Oxford Nanopore Technologies) (96) y no hay estudios diagnósticos de onicomicosis con esta técnica molecular. La literatura mundial muestra diferentes resultados cuando compara las diversas técnicas moleculares con las convencionales en el diagnóstico de onicomicosis, considerando que se pueden utilizar distintos métodos moleculares, protocolos de extracción de ADN, cebadores o secuencias blanco (15,39,42-44,46,60-68,84-91). En la Tabla 22 se comparan varios estudios donde, al igual que en este trabajo, se compararon los resultados obtenidos por los métodos moleculares y los métodos convencionales usados para el diagnóstico de onicomicosis.

De los trabajos revisados (Tabla 22), solamente el de Bao y cols. (43) y Álvarez-Mosquera y cols. (46), encontraron menor sensibilidad (PCR/secuenciación de Sanger 40 %) con respecto a los métodos convencionales (KOH 62 % y cultivo 49 %), resultados similares a los que se han reportado en el presente estudio.

Los autores señalan que estos resultados podrían deberse a que no se obtuvo una cantidad suficiente de ADN o a una distribución

*Tabla 22. Comparación entre estudios que han utilizado la secuenciación en el diagnóstico de onicomicosis.*

| Referencia / Lugar | Técnica de PCR | Secuencia blanco | Secuencias de cebadores (5'-3') | Agentes detectados | S KOH - S Cultivo % / S Prueba molecular %* |
|---|---|---|---|---|---|
| (46) España | PCR/secuenciación de Sanger ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Thermofisher Scientific) | ARNr 18S | F-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG R-CCGATCCCTAGTCGGCATAG | Dermatofitos (69.5%) Levaduras (25%) MND (5.5%) | 62 - 49 40 |
| (39) Austria | PCR/secuenciación 2.ª generación Secuenciador de genoma FLX (454 Sequencing) (Roche) | ADNr 28S | F-GATAGCGMACAAGTAGAGTG R-GTCCGTGTTTCAAGACGGG | Dermatofitos (47.9%) Levaduras (21.8%) MND (29.1%) Infecciones mixtas (1.2%) | 68 - 28.7 63.5 |
| (43) China | PCR/secuenciación de Sanger 3500XL ADN Genetic Analyzer (Applied Biosystems) | ITS1 ITS4 | F-TCCGTAGGTGAACCTGCGG R-TCCTCCGCTTATTGATATGC | Dermatofitos (60%) Levaduras (30%) MND (10%) | 85 - 72 78 |
| (86) Senegal | PCR/secuenciación de Sanger 3500XL ADN Genetic Analyzer (Applied Biosystems) | ITS1 ITS2 ITS3 ITS4 | ITS1: F-TCCGTAGGTTGAACCTGCGG ITS2: R-GCTGCGTTCTTCATCGATGC ITS3: F-GCATCGATGAAGAACGCAGC ITS4: R-TCCTCCGCTTATTGATATGC | Dermatofitos (100%) | SD 84 |
| (90) Túnez | PCR/secuenciación** | CHS1 | SD | Dermatofitos (100%) | SD 83.3 |

* Sensibilidad KOH % - Sensibilidad Cultivo % / Sensibilidad Prueba molecular %
** Microscopía de fluorescencia. SD: sin datos.



INDICE

no homogénea de este dentro de la muestra, lo cual habría impedido lograr una amplificación satisfactoria. Otros factores que podrían haber afectado el rendimiento de la técnica incluyen la degradación del material genético y la inhibición de la PCR. Adicionalmente, señalan que los casos en los que no se logró secuenciar las muestras podrían explicarse por la presencia de agentes ambientales y colonizadores junto con especies patógenas, por lo que sugieren la realización de estudios adicionales para confirmarlo, entre ellos, un ensayo de inhibición de la PCR (46).

Pospischil y cols. (39) en su investigación reportan, respecto a los métodos diagnósticos convencionales, una sensibilidad de la microscopía de fluorescencia de 68,1 % y 28,7 % para el cultivo. Ellos realizaron PCR/secuenciación de segunda generación, con una sensibilidad de 63,5 % cercana a la de la actual investigación (58,8 %), en todas las muestras de uñas con diagnóstico micológico convencional no concluyente. En estas muestras que tenían microscopía directa positiva, pero cultivo negativo o contaminado, la prueba molecular resultó superior. Con base en sus resultados, estos investigadores destacan la importancia del diagnóstico molecular mediante PCR/secuenciación de ADN de muestras primarias de hongos como complementarias de las pruebas convencionales, las sugieren en caso de un cultivo negativo o contaminado, en caso de hallazgos equívocos, o en casos de onicomicosis por dermatofitos y MND resistentes al tratamiento. Igualmente reconocen la importancia de usar una buena técnica para tomar las muestras y advierten de la dificultad técnica de la secuenciación al no detectar adecuadamente las infecciones mixtas, presente en 10% de las onicomicosis.

Otra diferencia encontrada en este estudio fue la secuencia blanco utilizada (ADNr 28S) la cual es menos eficiente si la comparamos con la amplificación ITS-5.8S en la discriminación de hongos a nivel de especie. Sin embargo, encontraron que la amplificación del ADNr 28S es más sensible e identifica de manera confiable las especies a nivel de género, lo cual es importante para diferenciar los MND de los dermatofitos. Otra limitación que refirieron fue la falta de información acerca de que, si el paciente había recibido tratamiento antifúngico previo a la toma de la muestra, ya que el uso reciente de antifúngicos disminuye

significativamente la sensibilidad del cultivo de hongos, pero también afecta de forma negativa en menor medida a los métodos moleculares. La comparación entre los métodos diagnósticos de su investigación está limitada por el hecho de que, los tres métodos no se aplicaron simultáneamente al inicio del proceso de diagnóstico, sino que la PCR/secuenciación de segunda generación, se limitó a casos con un diagnóstico convencional previo no concluyente (39).

Bao y cols. (43) reportaron sensibilidades similares a las mostradas en el presente estudio al utilizar los métodos convencionales (KOH 85 % y cultivo 72 %) y un porcentaje mayor en la PCR/secuenciación de Sanger (78 %), pero con el uso de cebadores y un tipo de secuenciación diferentes al de la presente investigación. Al igual que en esta investigación, encontraron algunas diferencias entre la PCR/secuenciación y los resultados del cultivo. Estos autores consideran que estas divergencias pueden estar relacionadas con la división de la muestra inicial en alícuotas, que pueden no tener elementos fúngicos viables necesarios para el cultivo, mientras que en la PCR sí puede detectar ADN contenido en elementos fúngicos muertos.

La secuenciación de la región ITS también se ha utilizado para comparar las identificaciones basadas en las características fenotípicas y genotípicas de dermatofitos, a partir de cultivos seleccionados, con reportes de discrepancias entre las dos metodologías, como lo observado en el presente estudio. Diongue y cols. (86), Nasrin y cols. (88), Ahmadi y cols. (89) y Neji y cols. (90) coinciden en manifestar que la secuenciación es una buena herramienta para identificar cepas de dermatofitos que no presentan características morfológicas típicas, ya que muchos exhiben características morfológicas superpuestas lo que hace la identificación fenotípica propensa a errores.

Bhosale y cols. en 2022 (91) realizaron la comparación de la identificación fenotípica de los hongos con la identificación molecular a partir de dermatofitosis. Llevaron a cabo la secuenciación de la región ITS1 e ITS4 y las compararon usando NCBI BLAST para identificar la cepa fúngica. Ellos informan que el 33% fueron confirmadas por

secuenciación ITS y destacan que todas las identificaciones fenotípicas coincidieron con las basadas en secuencias. Los autores concluyen que lograron una buena correlación entre las pruebas fenotípicas y las moleculares, a pesar de que el rendimiento de estas últimas fue bajo.

Una de las dificultades que se presentaron en la realización de las pruebas fue la extracción del ADN a partir de las uñas dado su alto contenido de queratina, su principal proteína. La calidad y cantidad de ADN que se obtiene en las muestras tomadas de las uñas son variables; además hay que considerar que la queratina puede inhibir la actividad de las Taq polimerasas y enzimas de restricción; por lo tanto, el resultado de la PCR puede resultar negativo (84,85). Esto fue similar a lo reportado en el estudio de Arammehr y cols. (85), donde además informan dificultades en el volumen de las muestras y que, en el método molecular, la muestra se puede contaminar con la microbiota normal e interferir con los resultados. Estos autores recomiendan el uso de un homogeneizador para extraer el ADN y afirman que, aunque la extracción de ADN de muestras de uñas y las pruebas moleculares son útiles, el método microscópico directo es superior al método molecular en términos de consumo de material y tiempo de detección. También manifiestan que con la PCR convencional solo se puede probar la presencia de hongos, mientras que con otros métodos moleculares como la secuenciación se puede identificar el agente causal de la infección. Finalmente, consideran que el método de secuenciación puede tener buenos resultados, pero no es decisivo porque solo se secuencia un gen específico o una parte concreta del gen, lo que muchas veces no es conveniente y requiere tiempo prolongado (85).

Al revisar la literatura, se evidencia que los métodos de secuenciación están en proceso de optimización, así como las bases de datos; de tal manera que, a largo plazo, podrían ofrecer una mayor concordancia y tener un potencial uso en alguna de las fases del diagnóstico clínico.

La presencia de los agentes etiológicos evidenciada en este estudio demuestra la necesidad de detectar la onicomicosis en la población general y, en particular, la implementación rutinaria de la revisión de las

uñas de los pacientes que asisten a consulta dermatológica, así como el uso de los métodos diagnósticos convencionales para su confirmación diagnóstica, seguido de la provisión de medicamentos específicos para cada infección.

El presente trabajo, tal como lo reportado a nivel mundial (97-102), demuestra la susceptibilidad de los adultos mayores a presentar onicomicosis, particularmente por *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *C. albicans*. Es importante desarrollar investigaciones que permitan determinar la prevalencia de onicomicosis en la población general, así como la realización de nuevos estudios comparativos de los métodos diagnósticos convencionales con técnicas de detección molecular para conocer la epidemiología real y la caracterización de los genotipos circulantes y su relación con la buena respuesta o resistencia a los tratamientos antimicóticos.

# CAPÍTULO VI

# FORTALEZAS Y DEBILIDADES

Históricamente, el diagnóstico micológico se ha realizado por el examen microscópico directo (KOH) y cultivo para hongos para la identificación del microorganismo. Estas herramientas, aunque en la mayoría de los casos son específicas, tienen como limitación su inherente baja sensibilidad y el requerimiento de experiencia por parte del personal encargado (40).

En comparación con los métodos de diagnóstico convencionales, las técnicas moleculares aparentemente ofrecen un mejor panorama como ha sido informado en el diagnóstico de otras entidades micóticas y no micóticas, por ser más rápidas y presentar una mayor precisión en la identificación de los agentes causales (102). Sin embargo, en la práctica clínica actual, la micología molecular aún no está disponible de rutina en la mayoría de los laboratorios clínicos posiblemente debido a los precios altos de los reactivos y equipos y a la necesidad de entrenamiento del personal encargado (39,53).

La mayor fortaleza de este estudio radica en ser uno de los pocos trabajos y el pionero en Colombia sobre diagnóstico molecular en onicomicosis.

La principal dificultad del presente estudio fue en el desarrollo del diagnóstico molecular porque es difícil la extracción del ADN a partir de muestras de uñas, por lo que se probaron diferentes métodos de extracción hasta lograr una concentración adecuada de ADN por muestra, por lo que para futuros estudios se recomienda el uso de preservantes que eviten la degradación del ADN, así como también el uso de un estuche de extracción de ADN con columnas, para mejorar la calidad del ADN, ya que la gran cantidad de proteínas presente en las uñas interfiere negativamente en la amplificación.

# CAPÍTULO VII

# CONCLUSIONES

- La onicomicosis afecta predominantemente a adultos mayores (mediana: 63 años) y a las uñas de los pies (76,5 %), con mayor frecuencia de dermatofitos en pies y de levaduras en manos (valor p = 0,006).

- El examen directo con KOH mostró mayor sensibilidad (90,2 %) que el cultivo (68,6 %), con concordancia considerable entre ambos (Kappa = 0,62).

- La secuenciación por nanoporos presentó mayor sensibilidad (58,8 %) que la PCR-ITS convencional (31,4 %), aunque ambas fueron inferiores a los métodos convencionales en este estudio.

- El agente causal de onicomicosis más frecuente en la población estudiada fue *T. rubrum*, seguido de *T. mentagrophytes* y *C. albicans*, los cuales fueron identificados por los métodos de diagnóstico convencionales y en menor porcentaje por los moleculares.

- Se documentaron por primera vez en Colombia infecciones mixtas por *C. albicans* + *Trichosporon asahii*.

- Los resultados comparativos entre métodos fenotípicos y genotípicos mediante nanoporos se estudian por primera vez en Colombia.

- Las técnicas diagnósticas convencionales siguen siendo pertinentes para el diagnóstico de onicomicosis debido a su disponibilidad en los laboratorios clínicos y bajo costo operativo, y a su sensibilidad y especificidad, siempre que el personal cuente con la experiencia necesaria y se apliquen los protocolos operativos estándar. En el presente estudio, las técnicas convencionales mostraron mayor sensibilidad que las pruebas moleculares en el diagnóstico de onicomicosis.
- Se identificaron aspectos susceptibles de mejora en las pruebas moleculares para el diagnóstico de onicomicosis, que deberán abordarse en investigaciones futuras; entre ellos, la optimización del proceso de extracción del ADN, así como la evaluación de nuevos cebadores para la PCR-ITS. Una técnica de secuenciación de nueva generación por nanoporos optimizada tendría como beneficio potencial mejorar la identificación de los agentes etiológicos y la concordancia entre las distintas técnicas diagnósticas.

# REFERENCIAS


1. Haghani I, Shams-Ghahfarokhi M, Dalimi A, Shokohi T, Taghi T. Molecular identification and antifungal susceptibility of clinical fungal isolates from onychomycosis (uncommon and emerging species). Mycoses.2019; 62(2):128- 143.
2. Zuluaga A. Las onicomicosis. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2011; (19): 192- 193.
3. Morales C, Solórzano A, Rojas A. Características epidemiológicas y clínicas de las onicomicosis causadas por *Fusarium spp.* en un centro de referencia de Bogotá, Colombia, 2001-2010. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2013; 21(1):21-28.
4. Guevara-Suarez M, Cano-Lira J, Cepero de García M, Sopo L, De Bedout C, Cano L et al. Genotyping of *Fusarium* isolates from onychomycoses in Colombia: Detection of two new species within the *Fusarium solani* species complex and in vitro antifungal susceptibility testing. Mycopathologia. 2016; 181(3-4):165-174.
5. Hwee Koo S, Leng Teoh Y, Liang Koh W, Ochi H, Kye Tan S, Miao Fang Sim D, Jiang B et al. Development and validation of a real-time multiplex PCR assay for the detection of dermatophytes and *Fusarium* spp. J Medical Microbiol.2019;68:1641-48.

6. Sigurgeirsson B, Baran R. The prevalence of onychomycosis in the global population. A literature study. J Eur Acad Dermatology Venereol. 2014; 28:1480-1491.

7. Villanueva-Reyes J, Gonzalez-Ríos AM, Crespo-Ortiz María, Álvarez-Valle MI. Comparative evaluation of conventional and nanopore approaches in onychomycosis diagnosis. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease. 2026; 115:117348

8. Zuluaga A, de Bedout C, Tabares A, Cano LE, Restrepo A, Arango M, et al. Comportamiento de los agentes etiológicos de las onicomicosis en un laboratorio de micología (Medellín 1994-2003). Med Cutan Iber Am.2005; 33(6):251-256.

9. Pérez J, Cárdenas C, Hoyos AM. Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de la onicomicosis en un laboratorio de referencia, Manizales (Caldas), 2009. Infectio.2011; 15(3):168-176.

10. Álvarez MI, González LA, Castro LA. Onychomycosis in Cali, Colombia. Mycopathologia.2004; 158:181-186.

11. Villanueva J, Díaz C, Luna J. Perfil epidemiológico de la onicomicosis en un servicio de dermatología de un hospital de tercer nivel en Cali, Colombia. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2013; 21(1):31-37.

12. González SD, Campuzano R. Onicomicosis en pacientes VIH positivos. Clínica Universitaria Bolivariana 2000-2007. Medicina UPB 2008; 27:45-53.

13. Rugeles MJ, Vásquez JL, Jaramillo E, Orozco B, Estrada S, Ospina S. Etiología y características clínicas de la onicomicosis en un grupo de pacientes inmunosuprimidos. Infectio 2001; 5:7-13.

14. Watanabe S, Ishida K. Molecular diagnostic techniques for onychomycosis: validity and potential application. Am J Clin Dermatol.2017; 18:281-286.

15. Verrier J, Monod M. Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. Mycopathologia 2017; 182:193-202.

16. Miyajima Y, Satoh K, Uchida T, Yamada T, Abe M, Watanabe S, Makimura M, Makimura K. Rapid real-time diagnostic PCR for *T. rubrum and T. mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. Journal of Dermatological Science. 2013; 69:229-235.

17. Shimoyama H, Satoh K, Makimura K, Sei Y. Epidemiological survey of onychomycosis pathogens in Japan by real-time PCR. Medical Mycology.2019; 57:675-680

18. Hayette MP, Seidel L, Adjetey C, Darfouf R, Wéry M, Boreux R et al. Clinical evaluation of the DermaGenius ® Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and *Candida albicans* in nails. Med Mycol. 2019; 57(3):277-283.

19. Rinflerch A, Flores V, Argibay P, Galimberti R. Dermatofitos en onicomicosis de una muestra de la población argentina. Dermatología CMQ 2015; 13(2):108- 110

20. Gupta AK, Jain HC, Lynde CW, MacDonald P, Cooper EA, Summerbell RC: Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicenter Canadian survey of 15,000 patients. J Am Acad Dermatol 2000; 43(2):244–248.

21. Elewski B, Tosti A. Risk factors and comorbidities for onychomycosis. J Clin Aesthet Dermatol. 2015; 8 (11):38–42.

22. Gupta A, Daigle D, Foley K. The prevalence of culture-confirmed toenail onychomycosis in at-risk patient populations. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015; 29(6):1039-1044.

23. Lipner S, Scher R. Onychomycosis. J Am Acad Dermatol. 2019; 80(4):835- 851.

24. Giniebra GM, Rivera R, Gorrín Y, Linares LP, Ordóñez LY. Onicomicosis, factores predisponentes, características y dermatosis asociadas. Rev Ciencias Médicas. 2019; 23(3): 380-386.

25. Gupta A, Mays R, Versteeg S, Piraccini B, Takwale A, Shemer A et al. Global perspectives for the management of onychomycosis. Int J Dermatol. 2019; 58(10): 1118-1129.

26. Papini M, Piraccini BM, Difonzo E, Brunoro A. Epidemiology of onychomycosis in Italy: prevalence data and risk factor identification. Mycoses. 2015; 58(11):659-664.

27. Villanueva-Reyes J, Arenas R. Onicomicosis en niños: estudio en una población mexicana. Dermatol Pediatr.2006; 4(3):197-203.

28. Solís-Arias M, García-Romero M. Onychomycosis in children. A review. Int J Dermatol. 2017; 56(2):123-130.

29. Gupta AK, Gupta G, Jain HC, Lynde CW, Foley KA, Daigle D et al. The prevalence of unsuspected onychomycosis and its causative organisms in a multicentre Canadian sample of 30.000 patients visiting physicians' offices. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016; 30(9):1567-1572.

30. Gelotar P, Vachhani S, Patel B, Makwana N. The prevalence of fungi in fingernail onychomycosis. J Clin Diagn Res. 2013. 7(2): 250–252.

31. Relloso S, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Walker L, Agorio I et al. Onicomicosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. Rev Iberoam Micol. 2012; 29(3):157-163.

32. Lipner S, Scher R. Part II: Onychomycosis. J Am Acad Dermatol. 2019; 80(4):853-867.

33. Cobos D. La onicomicosis y su influencia en la calidad de vida. Dermatología CMQ. 2016; 14(4):318-327.

34. De la Calle N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *C. albicans* y dermatofitos. Rev CES Med 2012; 26(1): 43-55

35. Faway É, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. In vitro models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. Exp Dermatol.2018; 27(8):915-922

36. Hay R, Baran R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. J Am Acad Dermatol. 2011; 65(6):1219-1227.

37. Piraccini B, Alessandrini A. Onychomycosis: A Review. J Fungi (Basel). 2015; 1(1):30-43.

38. Burkhart CN, Burkhart CG, Gupta A. Dermatophytoma: Recalcitrance to treatment because of the existence of fungal biofilm. J Am Acad Dermatol 2002; 47:629-31.

39. Pospischil I, Reinhardt C, Botem O, Salamin K, Fratti M, Blanchard G. Identification of dermatophyte and non-dermatophyte agents in Onychomycosis by PCR and DNA sequencing. A retrospective comparison of diagnostic tools. J Fungi. 2022; 8 (10):1019

40. Gupta AK, Mays R, Versteeg S, Shear N, Piguet V. Update on current approaches to diagnosis and treatment of onychomycosis. Expert Rev. Anti infect Ther.2018; 16(12):929-938.

41. Hao X, Yim J, Freedman D, Siddiqui S, Levine D, Tritto M et al. PAS stain based histological classification and severity grading of toenail onychomycosis. Med Mycol. 2020; 58(4):453-459.

42. Kondori N, Abrahamsson A, 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 specimen. Med Mycol. 2010; 48(7):1005–1008.

43. Bao F, Fan Y, Sun L, Yu Y, Wang Z, Pan Q et al. Comparison of fungal fluorescent staining and ITS rDNA PCR-based sequencing with conventional methods for the diagnosis of onychomycosis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2018; 32(6):1017-1021.

44. Moursi S. Prevalence of Onychomycosis in Hail Region, Saudi Arabia. Nat J Lab Med. 2018; 7(2):1-5.

45. Begum J. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. J Basic Microbiol.2020; 60(4):293-303.

46. Álvarez-Mosquera I, Hernández S, Sánchez J, Suarez M, Cisterna R. Diagnosis of superficial mycoses by a rapid and effective PCR method from samples of scales, nails and hair. Mycopathologia. 2018; 183:777-783.

47. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI standard M27-4th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2017.

48. Zapata-González F, Cardona-Castro N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. Rev CES Med 2012; 26(1): 71-83.

49. Tapia C. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Rev Chil Infect 2009; 26 (2): 144-150.

50. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MC, Bonfietti LX, Rodríguez-Tudela JL. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. Rev Inst Med Trop. 2015; 57(S19): 57-64.

51. Martinez N, Bitencourt T, Peres N, Lang E, Gomes E, Quaresemin N et al. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. Frontiers in Microbiology. 2018; 9:1-18.

52. Kumar NP. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. Our Dermatology Online. 2015; 6(2):212-221.

53. Mendoza N. Onicomicosis: afección común de difícil tratamiento. Rev Asoc Colomb Dermatol.2012; 20:2:149-158.

54. Mereles B, Fiedler J, Bruquetas A, Chade M. Evaluación de la sensibilidad de hongos dermatofitos aislados de muestras clínicas a los antifúngicos. Rev Cienc Tecnol. 2020; 34:101-106

55. Osaigbovo I, Lofor P, Oladele R. Fluconazole resistance among oral Candida isolates from people living with HIV/AIDS in a nigerian tertiary Hospital. J Fungi (Basel). 2017; 3(4): 69-77.

56. Gupta A, Kohli Y. Evaluation of in vitro resistance in patients with onychomycosis who fail antifungal therapy. Dermatology. 2003; 207(4):375-380.

57. Pérez-Cárdenas J, Hoyos AN, Cárdenas C. Sensibilidad antimicótica de diferentes especies de hongos aislados de pacientes con micosis ungueal en la ciudad de Manizales (Colombia). Biosalud. 2012; 11(2): 26-39.

58. Castro L, Álvarez M, Martínez E. Candida en la cavidad oral de pacientes con VIH en Cali, Colombia: determinación de especies y sensibilidad al fluconazol. Iatreia. 2015; 28(4):368-377.

59. Hayette M, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. Curr Fungal Infect Rep. 2015; 9:164-179.

60. Spiliopoulou A. Evaluation of a commercial PCR test for the diagnosis of dermatophyte nail infections. J Med Microbiol. 2015; 64:25-31.

61. Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Kumar A, Nath G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. BMC Research Notes. 2009; 2:60.

62. Uchida T, Makimura K, Ishihara K, Goto H, Tajiri Y, Okuma M et al. Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. Journal of Dermatology 2009; 36: 202-208.

63. Ebihara M, Makimura K, Sato K, Abe S, Tsuboi R. Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. British Journal of Dermatology. 2009; 161:1038-1044.

64. Savin C, Huck S, Rolland C, Benderdouche M, Faure O, Noacco G et al. Multicenter evaluation of a commercial PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay diagnostic kit (Onychodiag) for diagnosis of dermatophytic onychomycosis. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45(4):1205–1210.

65. Mohammadi R, Abastabar M, Mirhendi H, Badali H, Shadzi S, Chadeganipour M. et al. Use of restriction fragment length polymorphism to rapidly identify dermatophyte species related to dermatophytosis. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(6): e17296.

66. Arabatzis M, Bruijnesteijn van Coppenraet L, Kuijper E, De Hoog G, Lavrijsen A, Templeton K. et al. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. British Journal of Dermatology. 2007; 157: 681- 689.

67. Bergans A, Van der Ent M, Klaassen A, Bohm N, Andriesse G, Wintermans R. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 704-710.

68. Gustafson E, Bakotic W, Bennett L, Page L, McCarthy L. DNA-based detection for onychomycosis correlates better to histopathology than does fungal culture. Dermatology Online Journal. 2019; 25 (7):1-9.

69. Kotrotsiou T, Chatzimichaloglou A, Nasr A, Spandou E, Patsatsi A, Sotiriadis D. et al. A comparative study of three extraction protocols of DNA from nails: Potential use in the diagnosis of onychomycoses. Mycoses 2016; 1- 5.

70. Emery S, Erdman D, Bowen M, Newton B, Winchell J, Meyer R, Tong S, Cook B, Holloway B, McCaustland K., et al. Real-time reverse transcription- polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. Emerg. Infect. Dis. 2004; 10:311-316.

71. Lu X, Wang L, Sakthivel S, Whitaker B, Murray J, Kamili S, Lynch B, Malapati L, Burke S, Harcourt J, et al. US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. Emerg. Infect. Dis. J. 2020; 26:1654.

72. Ohta A, Nishi K, Hirota K, Matsuo Y. DNA metabarcoding workflow utilizing nanopore long-read sequencing and consensus generation for rapid identification of fungal taxa with high phylogenetic resolution. bioRxiv. 2023 doi: https://doi.org/10.1101/2023.04.14.536971

73. Davidov K, Iankelevich-Kounio E, Yakovenko I, Koucherov Y, Rubin-Blum M, Oren M. Identification of plastic-associated species in the Mediterranean Sea using DNA metabarcoding with Nanopore MinION. Scientifc Reports. 2020; 10:17533.

74. García J, López JC, Jiménez F, Ramírez Y, Lino L, Reding A. Metodología de la investigación, bioestadística y bioinformática en ciencias médicas y de la salud. 2 ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores. 2011.

75. Blanco J, Maya J, Torres Y. Fundamentos de Salud pública. Epidemiología

básica y principios de investigación. Tomo III. 3 ed. Medellín: Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas; 2016.

76. Fleiss JL, Cohen J, Everitt BS. Large sample standard errors of kappa and weighted kappa. Psychol Bull. 1969; 72(5):323–7.

77. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. Biometrics. 1977; 33(1):159–74. PMID: 843571.

78. Krishnamoorthy K, Peng J. Some properties of the exact and score methods for binomial proportion and sample size calculation. Commun Stat Simul Comput. 2007; 36(6):1171–86.

79. Maskan N, Rodríguez-Tamez G, Pérez S, Tosti A. Onychomycosis: old and new. J. Fungi. 2023; 9:559.

80. Falotico J, Lipner S. Updated perspectives on the diagnosis and management of onychomycosis. Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology 2022;15:1933–1957.

81. Leung A, Lam J, Leong K, Hon K, Barankin B, Leung A, et al. Onychomycosis: an updated review. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery 2020; 14:32-45

82. Kawa N, Lee K, Anderson R, Garibyan L. Onychomycosis: a review of new and emerging topical and device-based treatments. J Clin Aesthet Dermatol. 2019; 12(10):29–34.

83. Gupta AK, Stec N, Summerbell RC, Shear NH, Piguet V, Tosti A, et al. Onychomycosis: a review. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2020; 34(9):1972- 1990

84. Prieto R, Jainero J, Fiaño L, Martinez L, Alba A, Gonzalez C. Diagnóstico de las infecciones por dermatofitos en uñas con detección rápida específica de *Trichophyton rubrum*. Revista Internacional de Ciencias podológicas. 2011; 5(2):9-16

85. Arammehr A, Dehghan P, Chadeganipour M, Katoueezadeh, Shadzi S. Detection of dermatophytes from dermatophytosis-suspected cases in Iran, Evaluation of polymerase chain reaction-sequencing method. Adv Biomed Res. 2020; 9: 56.

86. Diongue K, Brechard L, Diallo MA, et al. A comparative study on phenotypic versus ITS-based molecular identification of dermatophytes isolated in Dakar, Senegal. Int J Microbiol. 2019; 2019:6754058

87. Frías-De-León M, Martínez-Herrera E, Atoche-Diéguez C, González-Cespón J, Uribe B, Arenas R, Rodríguez-Cerdeira C. Molecular identification of isolates of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. International Journal of Medical Sciences 2020; 17(1): 45-52

88. Nasrin S, Saeed ZB, Sina M, Sahar N. Genotyping and molecular characterization of dermatophytes isolates collected from clinical samples. Arch Pulmonol Respir Care. 2017; 3:52-57

89. Ahmadi B, Mirhendi H, Shidfar M, et al. A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophyte isolates. J Mycol Med. 2015; 25(1):29-35

90. Neji S, Makni F, Sellami H, Cheikhrouhou F, Sellami A, Ayadi A. Molecular identification of dermatophytes isolated in Sfax-Tunisia. J Mycol Med. 2010;20(2):85-90

91. Bhosale N, Prabha R, Munuswamy R, Pramodhini S, Easow J. A Comparative study on the phenotypic versus molecular identification of clinical dermatophytes. J Pure Appl Microbiol. 2022; 16(2):1138-1146

92. Carrascal-Correa D, Zuluaga A, González A. Species distribution of the main aetiologic agents causing skin dermatophytosis in Colombian patients: A 23-year experience at a Mycological Reference Center. Mycoses. 2020; 63:494- 499

93. Rivas L, Mühlhauser M. Complejo *Trichophyton mentagrophytes*. Rev Chilena Infectol 2015; 32 (3): 319-320

94. Álvarez MI, González LA. Tiña pedis en estudiantes de la Universidad del Valle, Cali, Colombia. Biomédica. 1998; 18(4):268-273

95. García L, Osorio G. *Trichosporon mucoides* infección en paciente inmunocompetente. Colomb Med. 2008; 39(2):185-8

96. Petersen L, Martin I, Moschetti W, Kershaw C, Tsongalisa G. Third-Generation sequencing in the clinical laboratory: exploring the advantages and challenges of Nanopore sequencing. Journal of Clinical Microbiology. 2020; 58 (1): e01315-19.

97. Marcos-Tejedor F, Mota M, Iglesias-Sánchez MJ, Mayordomo R, Gonçalves T. Identification of fungi involved in onychomycosis in patients from a rural area of Spain. J Fungi. 2021; 7(8)

98. Albucker SJ, Falotico JM, Choo ZN, Matushansky JT, Lipner SR. Risk factors and treatment trends for onychomycosis: A case-control study

of patients with onychomycosis in the All of Us Research Program. J Fungi. 2023; 9(7).

99. Nenoff P, Reinel D, Mayser P, Abeck D, Bezold G, Bosshard PP, et al. Guide S1 Onychomycosis. J Dtsch Dermatol Ges. 2023; 21(6):678-692.

100. Salazar Garcés DK, Betancourt Karina I, Lituma Jumbo RDL, Hernández Quimbiulco CI. Yeast fungi causing onychomycosis in adult men residing in the city of Ambato – Ecuador. Rev Cien Salud BIOSANA. 2024; 4(3):73-87.

101. Gupta AK, Wang T, Cooper EA, Lincoln SA, Foreman HC, Scherer WP, among others. Clinical Diagnosis and Laboratory Testing of Abnormal-Looking Toenails: A Retrospective Evaluation of Confirmatory Testing for Onychomycosis in the United States, 2022-2023. J Fungi. 2024; 10:149.

102. Marin-Maldonado F, Pacheco-Torres AL, Gustafson E. Comparative analysis of onychomycosis in Puerto Rico using molecular and conventional approaches. J Med Mycol. 2023; 33(3):101412.