

# MÉTODOS MOLECULARES: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), FRENTE A MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES. ANÁLISIS COMPARATIVO EN LA DETECCIÓN DE HONGOS DERMATOFITOS

M<sup>a</sup> José Iglesias Sánchez<sup>1</sup>, Ana M<sup>a</sup> Pérez Pico<sup>1</sup>, José Román Muñoz del Rey<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Carmen Ledesma Alcázar<sup>1</sup>, Raquel Mayordomo Acevedo<sup>1</sup>.

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

## CORRESPONDENCIA

Dra. María José Iglesias Sánchez  
Centro Universitario de Plasencia  
Titulación de Podología  
10600 Plasencia (Cáceres)  
E-mail: maiglesiass@unex.es

MÉTODOS MOLECULARES: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), FRENTE A MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES. ANÁLISIS COMPARATIVO EN LA DETECCIÓN DE HONGOS DERMATOFITOS

## RESUMEN

Las dermatomicosis constituyen un grupo de patologías muy frecuente en la práctica clínica podológica, y su prevalencia se ha incrementando en las últimas décadas.

La confirmación diagnóstica de la infección micótica es fundamental por la atípica expresividad clínica que se da en algunos casos, y las patologías con manifestaciones clínicas similares como por ejemplo la psoriasis.

El diagnóstico habitual de las dermatomicosis en la actualidad está basado en la detección de estructuras típicas de hongos por observación directa al microscopio, seguida por el cultivo *in vitro* y la identificación morfológica de los hongos. Estos métodos requieren de dos a tres semanas para la detección, y personal especializado para su identificación. Por ello, es necesario afrontar métodos de diagnóstico precisos y rápidos que permitan la aplicación de tratamientos adecuados con prontitud para mejorar la atención a los usuarios de nuestras clínicas.

En nuestro laboratorio hemos puesto a punto una metodología, basada en la detección de material genético, más rápida y específica que el método tradicional. Consiste en una extracción de ADN seguida de dos amplificaciones mediante PCR, de dos secuencias específicas de hongos.

Para realizar el estudio comparativo se utilizaron 54 muestras, que fueron analizadas mediante los dos métodos. Los resultados fueron concordantes en el 89% (48/54) de los casos, aunque el método tradicional detectó derma-

tofitos en 14 muestras (25,9%), mientras que el método molecular lo hizo en 15 (27.7%).

Además del ligero aumento de sensibilidad de la nueva técnica, la ventaja fundamental que presenta es la significativa reducción del tiempo de espera desde dos o tres semanas hasta 24 horas.

## PALABRAS CLAVE

Dermatomicosis, Onicomycosis, Detección, PCR, Cultivo en placa.

## ABSTRACT

Human pathogenic dermatophytes are moulds that infect human skin, nails and hair. Onychomycosis, or fungal infection of nails, is a very common pathology in clinic practising. The importance of that mycosis has increased in the latest years.

As other pathologies (for instance, psoriasis) may resemble onychomycosis and as onychomycosis requires long-term of antifungal treatment, the correct identification of causal fungi is mandatory. The current diagnosis is based on detection of fungal elements by direct microscopy followed by *in vitro* culture and morphological identification of the fungus. These methods are time-consuming (2 to 3 weeks) and have got a low specificity.

A PCR-based methodology increases specificity, simplicity, speed, and it even could reduce cost. The new method consists in a rapid DNA extraction, followed by a multiplex PCR.

Designed primers amplified two fragments at chitin syntase I gene and at the ribosomal internal transcribed spacer 2, in the fungal genome. (The rDNA spacer regions provide easily accessible, polymorphic genetic loci for strains identification).

A total of 54 nail samples were cultured, microscopically analysed and tested by PCR. Overall 14/54 (25.9%) of the samples were positive by traditional method and 15/54 (27,7%) were dermatophyte positive by PCR.

In conclusion, this PCR test improves the classical method of diagnosis of onychomycosis increasing the sensitivity, and identification of the causal mold, even the time consumed is significantly shorten.

## KEY WORDS

Fungal Infection, Onychomycoses, Dermatophyte Detection, PCR, Petri Dish Culture.

## INTRODUCCIÓN

Los dermatofitos comprenden un grupo de hongos relacionados que pertenecen a tres géneros: *Epidermophyton*, *Microsporium* y *Trichophyton*, cada uno de los cuales incluye varias especies. Estos hongos son queratinófilos e infectan tejidos superficiales queratinizados (piel, pelo y uñas) de humanos y animales causando micosis cutáneas llamadas también dermatomicosis.

La prevalencia de las dermatomicosis en países europeos varía entre un 3 y un 22%, pero además, se ha producido un incremento reciente a nivel global que se atribuye al incremento de los estados inmunodeprimidos tales como el SIDA, diabetes mellitus, trasplante de órganos y el uso de corticoides y/o antineoplásicos<sup>1</sup>.

El diagnóstico habitual de las dermatomicosis está basado en la detección de estructuras típicas de hongos por observación directa al microscopio, seguida por el cultivo in vitro y la identificación morfológica de los hongos<sup>2, 3, 4, 5, 6</sup>.

Concretamente, en el caso de las onicomosis es necesario hacer un diagnóstico diferencial debido a que existen una serie de patologías que presentan una sintomatología muy similar, como las onicodistrofias originadas por la psoriasis<sup>7</sup>.

Sin embargo, esta metodología presenta dos inconvenientes principales: por un lado, el examen directo al microscopio da resultados falsos negativos en un 5 a un 15% de los casos<sup>8, 9</sup>; y en segundo lugar, la siembra en placa con medios de cultivo específicos requiere de 2 a 4 semanas para la identificación de la especie<sup>9, 10, 3</sup>.

El desarrollo de la biología molecular y la accesibilidad de las bases de datos de secuencias biológicas, han permitido, en general, la mejora en la sensibilidad y especificidad de muchos métodos de diagnóstico en clínica, aunque en el campo de las micosis, esta aplicación es sólo incipiente<sup>11, 12, 13, 14</sup>.

En los últimos meses hemos puesto a punto un método rápido de detección de onicomosis a partir de muestras de uña consistente en la extracción de ADN seguido de una PCR, basado en un método descrito anteriormente<sup>15</sup> que nos permite detectar la presencia de hongos dermatofitos y la identificación del agente causal más frecuente: *Trichophyton rubrum*. Esta técnica se probó con 20 cepas de referencia y 89 aislados clínicos de dermatofitos<sup>15</sup>. Se comprobó que

no amplificaban ADN de 22 aislados clínicos de hongos no dermatofitos, ni ADN humano.

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

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

A continuación, se realizó el análisis molecular a partir de un fragmento de la misma muestra. En primer lugar se procede a la extracción del ADN según un método descrito anteriormente<sup>15</sup> que consiste en una incubación de 10 minutos a 95°C de la muestra de uña en 100 µl de un tampón de extracción (bicarbonato sódico 60 mM, KCl 250 mM y Tris 50 mM a pH 9,5) añadiendo posteriormente un tampón antiinhibición seguido de agitación en vortex.

La PCR (Polimerase Chain Reaction) se realizó usando un volumen de reacción de 25 µl con la siguiente composición: 4µl de ADN más los reactivos suministrados por Sigma-Aldrich: 2,5 µl de tampón de reacción, 2 µl de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato 2,5 mM cada uno, 2,5 µl de cloruro magnésico 25 mM, 0,2 µl de cuatro oligonucleótidos diferentes: Derm1, Derm2, Tr y uni a una concentración de 100 µg/µl. y 0,3 µl de Taq polimerasa.

Los ciclos de la reacción fueron los siguientes: un primer ciclo de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 58°C y 30s a 72°C, seguida de un último ciclo de 6 min a 72°C.

En esta primera amplificación se usaron dos pares de oligonucleótidos: el primero de ellos, amplifica un fragmento de la Quitin sintasa 1 específica de hongos dermatofitos: panDerm1 (5GAAGAAGATTGCTGTTTGC ATCGTCTC3) panDerm2 (5CTCGAGGTCAAAGCACG CCAGAG3), que delimitan un fragmento del genoma de 366 pb.

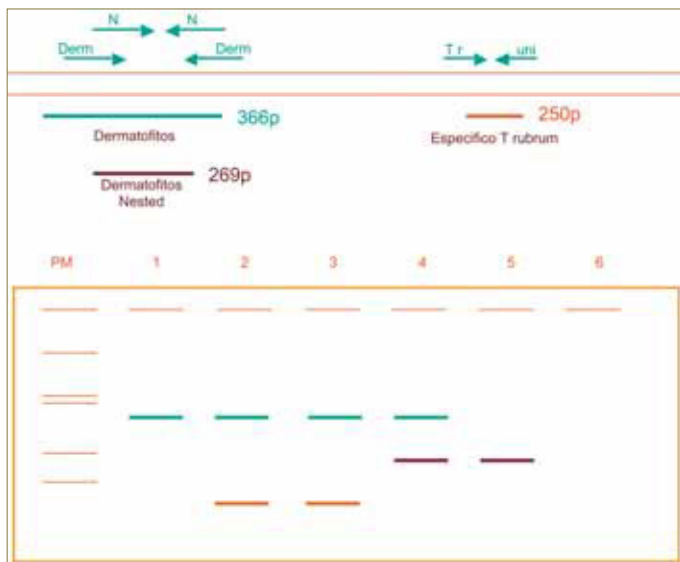


Fig. 1. Representación esquemática del planteamiento y el resultado de la PCR. El genoma se representa por dos líneas paralelas, las flechas representan a los oligonucleótidos utilizados, y los fragmentos amplificados corresponden a las líneas gruesas con sus longitudes respectivas. En el rectángulo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

El segundo par de oligonucleótidos amplifican una secuencia específica de *Trichophyton rubrum* localizada en una región espaciadora intergénica del ADN ribosomal): universal (uni, 5'TCTTTGAACGCACATTG CGCC3) y *Trichophyton rubrum* (Tr, 5CGGTCCTGA GGGCGCTGAA3). La longitud del ADN amplificado es de 203 pb. (Fig. 1)

Por último, para aumentar la sensibilidad de la amplificación en la región de la quitin-sintasa, diseñamos otro par de oligonucleótidos N1 y N2 para realizar una Nested PCR, con los siguientes ciclos: 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos de 94°C 30 s, 58°C 30s y 72°C 30s, seguido de un ciclo de 72°C durante 5 minutos. El tamaño de este fragmento es de 269 pb.

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

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

## RESULTADOS

De un total de 57 muestras, todas fueron sometidas a cultivo en placa de agar glucosado de Sabouraud durante 3 semanas o un mes en estufa a 30°C. En los casos de crecimiento positivo, se realizó un estudio morfológico al microscopio para la identificación de la especie. Después de 4 semanas, los cultivos que no mostraron crecimiento se consideraron negativos.

En 54 muestras se procedió a extraer el ADN directamente a partir del fragmento de uña recogida (en tres casos, la cantidad de muestra fue insuficiente). A partir de este ADN, se realizaron dos amplificaciones consecutivas mediante el método puesto a punto en nuestro laboratorio, consistente en dos PCRs para la detección de dos secuencias específicas de hongos dermatofitos, descritas en el apartado de materiales y métodos.

Nº muestra	Resultado cultivo	Resultado PCR	Discordancias
5	+	+	
7	-	+	+
11	+	+	
16	+	-	-
20	+	+	
25	+	+	
29	+	+	
33	+	-	-
34	+	+	
37	+	+	
38	+	+	
39	+	+	
40	+	+	
42	-	+	+
44	-	+	+
47	-	+	+
52	+	+	
57	+	+	

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

Los resultados positivos obtenidos mediante las dos técnicas se muestran en la Tabla 1.

14 de 54 muestras (25,9%) fueron positivas para el cultivo y la identificación morfológica, mientras que por el método molecular detectamos 15 (27,8%) positivas (ver segunda columna en Tabla 1). El total de muestras positivas por alguno de los dos métodos fue 19 de 54 (35%).

Por tanto, un 65 % de las muestras con sospecha de onicomicosis, presentaron distrofias debidas a otras patologías que no son causadas por hongos dermatofitos (psoriasis, candidiasis...).

El método molecular y el clásico coinciden en el 89% de las muestras analizadas, aunque el resultado fue discordante en 6 de 54 (11,1%). 4 de ellas son positivas para la amplificación de ADN pero no crecieron en el cultivo, mientras que dos muestras presentaron crecimiento en el cultivo en placa pero su ADN no se amplificó mediante la PCR (ver porcentajes en Tabla 2).

Método	% Positivos	% Discordantes	% Negativos
Cultivo + PCR	31,5 % (17/54)	11,1% (6/54)	68,5%
Cultivo	25,9 % (14/54)	3,7 % (2/54)	74,1%
PCR	27,8 % (15/54)	7,4% (4/54)	72,2 %

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

## DISCUSIÓN

El cultivo sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de micosis<sup>6</sup>, porque permite la identificación del agente etiológico y el posterior estudio de sensibilidad a antifúngicos; pero sus dos principales inconvenientes son la baja especificidad y la lentitud del método.

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

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

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

Los dos métodos son discordantes en 6 de las 54 muestras analizadas (11,1%). Cuatro de estos casos dan positivo en la PCR, mientras que no encontramos crecimiento en las placas, por tanto se deben a una mayor sensibilidad del nuevo método.

Sin embargo, encontramos dos muestras (0,4%) que no presentan amplificación del ADN, pero si dan crecimiento en placa. Estos dos casos requieren la secuenciación de este fragmento del genoma, para comprobar que no se trata de cepas que presenten mutaciones en las zonas de hibridación de los oligonucleótidos utilizados.

Aunque existen dos explicaciones más probables: la primera es que la muestra ha sido insuficiente, o que no fue tomada en las condiciones adecuadas; y la segunda es que puede haberse producido una contaminación durante el manejo del cultivo en el laboratorio.

En cualquier caso queda pendiente el estudio de

la secuencia.

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

La técnica presentó, en un principio, una baja sensibilidad en la primera PCR.

Para subsanar esta deficiencia añadimos un paso más al método: una "nested PCR", o "PCR anidada" que supone una segunda amplificación del ADN, en el fragmento de la quinta cinta I.

Aunque este paso supone adoptar mayores medidas de control en el laboratorio para evitar contaminaciones, ha supuesto un considerable aumento de sensibilidad.

Por otro lado, creemos que aun podemos mejorar la técnica, concretamente aumentando la eficacia en el paso de la extracción de ADN debido a que partimos de muestras de tamaño reducido que en muchos casos incorporan muy poca cantidad de material genético.

## CONCLUSIÓN

La aplicación de esta técnica molecular supone un gran avance en el abordaje clínico de las onicodistrofias, ya que permite confirmar o descartar un diagnóstico antes de 24 horas frente a las dos-tres semanas del método de cultivo en placa y con una sensibilidad similar (ligeramente superior). Además permite el procesamiento de gran número de muestras en poco tiempo y su posible abaratamiento a medio-largo plazo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Shehata A. S., Mukhetjee P.K., Aboulatta H.N., Akhras A.I., Abbadi S.H., Ghannoum M.A. Single-Step PCR Using (GACA)<sub>4</sub> Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 2641-2645.
2. Elewski, B. E., Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11: 415-428
3. Liu, D., Coloe S., Baird R., and Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. med. Microbiol.* 2000; 49:493-497.
4. Mahoney, J. M., Bennet J., and Olsen B. The diagnosis of onychomycosis. *Dermatol. Clin.* 2003; 21:463-467.
5. Mayordomo Acebedo R., Hidalgo Ruiz S., Pérez Pico A.M. Estudio de la eficacia de la sospecha clínica en la detección de onicomicosis. *Rev. Esp. Podología.* 2007; 18 (3) 114-120.
6. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Martín E, Pemán J, Pontón J, Rodríguez-Tudela JL. Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2007. 25(5):336-40.
7. Martínez Roig, A., Micosis cutáneas. Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos en Dermatología Pediátrica 65-73, 2002.
8. Gentles, J. C., laboratory investigations of dermatophyte infections of nail. *Sabouraudia* 1971;9:149-152.
9. Petrini, B., and M. L. von Rosen, Optimal dermatophyte diagnosis requires both microscopy and culture. *Lakartidningen* 2002;99:4084
10. Weinberg J.M.; Koestenblatt, E.K.; Tutrone, W.D.; et al, Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*, 2003; 49: 193-197.
11. Kac G., Molecular approaches to the study of dermatophytes. *Med. Mycol.* 2000. 38: 329-336.
12. Rodríguez-Tudela JL, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Aug;58(4):435-40. Epub 2007 May 16.
13. Yang J., Chem L., Wang L., Zhang, W., Liu T., and Jin Q. TrED: the *Trichophyton rubrum* expression Database. *BMC Genomics*, 2007;8:250.
14. Rodríguez-Tudela JL, Cuesta I, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M. Molecular techniques in mycology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 Nov;26 Suppl 13:47-53.
15. Brillowska-Dabrowska, A., Saunte D.M., and Arendrup M.C. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:1200-1204.