



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



**“Identificación molecular de hongos causantes de onicomycosis en
pacientes con protocolo para trasplante renal”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciada en Microbiología

PRESENTA

Andrea Lucía Rodríguez Martínez

DIRIGIDO POR

Dra. Francisca Hernández Hernández

Dra. Francisca Hernández Hernández

Presidente

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime

Secretario

Firma

Dr. Ulises Esquivel Naranjo

Vocal

Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Vocal

Firma

Dra. Alicia Lemini López

Vocal

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México
23 de febrero del 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Identificación molecular de hongos causantes de
onicomicosis en pacientes con protocolo para
trasplante renal

por

Andrea Lucía Rodríguez Martínez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: CNLIN-261803-0223-223

RESUMEN

La onicomicosis es una infección en las uñas causada por hongos dermatofitos, hongos filamentosos no dermatofitos o levaduras. Las uñas infectadas presentan cambio de coloración, engrosamiento y deformación. La prevalencia está relacionada con factores ambientales, la susceptibilidad del hospedador y la patogenicidad del hongo causante. Las infecciones fúngicas ponen en riesgo el éxito de una cirugía de trasplante, siendo una causa importante de morbilidad. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar mediante PCR-secuenciación las especies causantes de onicomicosis a partir de los cultivos de pacientes incluidos en el protocolo para trasplante renal atendidos en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, de la Ciudad de México. Se utilizaron escamas de uñas de pacientes mayores de 18 años, en protocolo para trasplante renal y donadores, atendidos durante el 2020, 2021 y el primer trimestre del 2022. Las muestras fueron sometidas a un examen directo (ED) con hidróxido de potasio (20%) y cultivadas en Agar Dextrosa Sabouraud y agar-tierra-pelos con antibióticos. De los cultivos positivos, se hizo un examen microscópico con azul de algodón, los hongos filamentosos fueron cultivados en Agar Borelli y se realizó un cultivo monospórico en Agar Papa Dextrosa (APD). Se registró la morfología macroscópica y microscópica, se realizó extracción de ADN y se amplificó y secuenció la región espaciadora interna transcrita (ITS), la subunidad mayor (LSU) del ADN ribosomal y la región que codifica a β -tubulina (TUB). Se analizaron 135 muestras de 75 pacientes. El 45.3% de las muestras eran de pacientes Pre- trasplante, 37.3% fueron de Post-trasplante, del 2.7% recibimos muestras de pre y post trasplante; el 14.7% restante correspondió a donadores. El ED fue positivo a estructuras fúngicas en 73.9% (96 muestras), negativo en 19.2% y no realizado en 9.6% de las muestras. De los 96 ED positivos, 71 dieron cultivo positivo: 74% dermatofitos, 10% levaduras y 17% hongos filamentosos no dermatofitos. Las especies más frecuentes fueron *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), seguido de *T. interdigitale* y *Candida albicans*. En el análisis filogenético de las especies de dermatofitos, se distinguieron tres clados bien definidos.

PALABRAS CLAVE: Onicomicosis, Dermatofitos, Trasplante.

ABSTRACT

Onychomycosis is a nail infection caused by dermatophytes, non-dermatophyte molds, or yeasts. Infected nails show color change, thickening and deformation. The prevalence is related to environmental factors, host susceptibility and pathogenicity of the causative fungus. Fungal infections jeopardize the success of transplant surgery, being an important cause of morbidity. The aim of this study was to isolate and identify by PCR-sequencing species that cause onychomycosis from cultures of patients included in kidney transplant protocol attended at the Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI of the IMSS, in Mexico City. Nail scales from patients over 18 years of age, in protocol for kidney transplantation and donors, seen during 2020, 2021 and the first quarter of 2022 were used. Samples were subjected to direct examination (DE) with potassium hydroxide (20%) and cultured on Sabouraud Dextrose Agar and soil-hair agar with antibiotics. Of the positive cultures, a microscopic examination was made with Lactophenol Cotton Blue, the filamentous fungi were cultivated on Borelli Agar and a monosporic culture was made in Potato Dextrose Agar. Macroscopic and microscopic morphology was recorded, DNA extraction was performed and Internal transcribed spacer (ITS) region, large subunit (LSU) of ribosomal DNA and the region encoding β -tubulin (TIUB) were amplified and sequenced. 135 samples from 75 patients were analyzed. 45.3% of the samples were from pre-transplant patients, 37.3% were from post-transplant, 2.7% were from pre- and post-transplant patients; the remaining 14.7% corresponded to donors. The DE was positive in 73.9% (96 samples), negative in 19.2% and unrealized in 9.6% of the samples. Of the 96 DE positives, 71 were culture positive: 74% dermatophytes, 10% yeasts, and 17% non-dermatophyte molds. The most frequent species were *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), followed by *T. interdigitale* and *Candida albicans*. In the phylogenetic analysis of the dermatophyte species, three well-defined clades were distinguished.

KEYWORDS: Onychomycosis, Dermatophytes, Transplant.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Francisca Hernández por darme la oportunidad de aprender de ella, por su paciencia, orientación y apoyo y por mostrarme la clase de investigadora que quiero llegar a ser.

Al Dr. Fidel Landeros por apoyar a una niña que le dijo que quería hacer micología médica, su valiosa asesoría y transmitirme su pasión por los hongos.

A la Dra. Patricia Manzano-Gayosso por la enorme ayuda y apoyo durante la realización de esta tesis y por contribuir en mi formación profesional.

Al Dr. Ulises Esquivel por ser parte importante de mi educación y permitirme entrar a su laboratorio y ser parte del equipo *Trichoderma*.

Al Dr. Antonio Cervantes por ser el mejor maestro durante estos cinco años, dándome los principios de biología molecular y celular que han sido la base en mi formación como microbióloga.

A la Dra. Alicia Lemini por la oportunidad de trabajar con las muestras de sus pacientes, su revisión y los valiosos comentarios.

A la Dra. Diana Chávez por su colaboración en la obtención de muestras.

A la QFB. Erika Córdova por su asesoría, paciencia, regaños y por ser mi amiga.

Al M. en C. Salvador Ramírez por ser el mejor consejero y amigo durante esta etapa, gracias por aguantar cada llamada, mensaje y visita, pero sobre todo gracias por creer en mí y junto con el M. en C. Daniel Sánchez por apoyarme y animarme a seguir mis sueños.

A Josaphat, Didier, Adrián, Charly, Isaí, Angelica, Anel, Erandi, Omar y Berenice por hacer de este proyecto una experiencia inolvidable, hacer las horas de laboratorio más amenas y brindarme su amistad.

A mi novio André por estar siempre al pendiente de mí, escucharme, aconsejarme, apoyarme y motivarme todos los días, gracias por crecer conmigo cada día y ser lo que necesito, Te amo.

Agradezco a mi familia por siempre estar para mí, su amor incondicional, por abrirme las puertas de sus casas para hacer posible todo esto y dejarme ser yo.

A mi hermano por inspirarme en siempre ser la mejor y quererme a su manera.

A mis padres por todo el amor que me dan, por ser mi soporte, siempre estar conmigo y creer en mí, dándome la libertad para tomar mis decisiones y aprender de ellas.

Yo sé quién soy y sé que puedo ser

Miguel de Cervantes Saavedra

-Don Quijote de la Mancha

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
1. MICOSIS SUPERFICIALES	2
2. ONICOMICOSIS	3
2.1. ASPECTOS GENERALES	3
2.2. PRESENTACIÓN CLÍNICA	5
2.3. AGENTES CAUSALES	7
2.3.1. DERMATOFITOS	7
2.3.2. HONGOS FILAMENTOSOS NO DERMATOFITOS (HFND)	8
2.3.3. LEVADURAS	9
2.4. EPIDEMIOLOGÍA	9
3. PACIENTES DE TRASPLANTE DE ÓRGANOS	11
3.1. ONICOMICOSIS EN PACIENTES DE TRASPLANTE RENAL	12
4. DERMATOFITOS	13
JUSTIFICACIÓN	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
METODOLOGÍA	18
MUESTRAS	18
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	18

EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO	18
CULTIVO	18
PROCESAMIENTO DE LOS CULTIVOS POSITIVOS	19
CULTIVO MONOSPÓRICO	19
ESTUDIO MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO.....	20
EXTRACCIÓN DE ADN UTILIZANDO EL PROTOCOLO DE FENOL- CLOROFORMO	20
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	22
PCR para ITS	22
PCR para LSU	22
PCR para TUB	23
SECUENCIACIÓN DE NUCLEÓTIDOS	23
ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	23
RESULTADOS	25
EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO	25
CULTIVOS DE LAS MUESTRAS	28
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	30
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	40
ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	45
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIÓN	59
BIBLIOGRAFÍA.....	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Origen y frecuencia del sitio anatómico.....	25
FIGURA 2. Exámenes directos con KOH al 20%.....	26
FIGURA 3. Carga fúngica observada en el examen directo.....	26
FIGURA 4. Fotos de un Dermatofitoma en ED.....	27
FIGURA 5. Resultado comparativo de los ED y los cultivos.....	27
FIGURA 6. Ejemplos de colonias desarrolladas en ADSa y en ATPa.....	28
FIGURA 7. Cultivo de bacterias.....	29
FIGURA 8. Hongos identificados de forma preliminar.....	31
FIGURA 9. Levaduras identificadas.....	32
FIGURA 10. Morfología macroscópica y microscópica de <i>T. rubrum</i>	34
FIGURA 11. Morfología macroscópica y microscópica de <i>T. interdigitale</i>	35
FIGURA 12. Morfología macroscópica y microscópica de <i>E. floccosum</i>	36
FIGURA 13. Morfología macroscópica y microscópica de <i>S. warcupii</i>	37
FIGURA 14. Morfología macroscópica y microscópica de <i>K. hubeiense</i>	37
FIGURA 15. Morfología macroscópica y microscópica de <i>B. piluliferum</i>	38
FIGURA 16. Morfología macroscópica y microscópica de <i>A. versicolor</i>	38
FIGURA 17. Morfología macroscópica y microscópica de <i>Scopulariopsis</i>	39
FIGURA 18. Morfología macroscópica y microscópica de <i>Fusarium</i>	40
FIGURA 19. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN.....	41
FIGURA 20. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de ITS.....	41
FIGURA 21. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de LSU.....	42
FIGURA 22. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de β -TUB.....	42
FIGURA 23. Especies de dermatofitos, levaduras y HFND identificadas mediante PCR-secuenciación.....	43
FIGURA 24. Árbol filogenético de dermatofitos (ITS).....	46
FIGURA 25. Árbol filogenético de dermatofitos (LSU).....	47
FIGURA 26. Árbol filogenético de dermatofitos (β -tubulina).....	48
FIGURA 27. Árbol consenso (ITS, LSU y β -TUB).....	49

LISTA DE TABLA

TABLA 1. CEPAS DE REFERENCIA UTILIZADAS.....	24
TABLA 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ED Y CULTIVO	30
TABLA 3. GRUPOS Y FRECUENCIA DE HONGOS CAUSANTES DE ONICOMICOSIS.....	44
TABLA 4: GRUPOS DE HONGOS IDENTIFICADOS POR SEXO DE PACIENTE.....	45

ANEXOS

ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO.....	69
ANEXO 2. SOLUCIONES.....	71
ANEXO 3. DATOS EPIDEMIOLOGICOS GENERALES	72
ANEXO 4. ELECTROFORESIS DE EXTRACCIONES DE ADN.....	78
ANEXO 5. ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN ITS.....	81
ANEXO 6. ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN LSU.....	84
ANEXO 7. ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN B-TUB..	87

INTRODUCCIÓN

La onicomicosis es una infección común de las uñas que afecta al 5.5% de la población mundial. Es causada por hongos dermatofitos, hongos filamentosos no dermatofitos (HFND) o levaduras (Kaur, et al., 2008; Petrucelli et al., 2020). Esta infección fúngica representa el 50% de todas las onicopatías a nivel mundial, afectando la placa y el lecho ungueal principalmente de las uñas de los pies (Kaur et al., 2008). Cinco principales tipos de onicomicosis han sido descritos: subungueal distal y lateral, subungueal proximal, blanca superficial, endonyx y distrófica total (Zaias, 1972; Singal & Khanna, 2011).

Los dermatofitos son hongos filamentosos patógenos del orden Onygenales que tienen la capacidad de invadir y alimentarse de estructuras queratinizadas como la piel, el cabello y las uñas (de Hoog et al., 2017). En un principio el orden Onygenales fue dividido en solo tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* (Gnat et al., 2021). Sin embargo, actualmente con el uso de técnicas moleculares la taxonomía de los dermatofitos se ha modificado y en 2017 se incluyeron los géneros *Nannizzia*, *Arthroderma*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Ctenomyces* y *Guarromyces* (de Hoog et al., 2017; Gnat et al., 2021).

Tanto los dermatofitos como los HFND infectan principalmente uñas de los pies, mientras que las levaduras son más comunes en uñas de las manos y pueden ser adquiridas a partir de humanos, animales o el suelo (Cobos Lladó et al., 2016). El dermatofito *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) es el agente causal más común de la onicomicosis, seguido de *T. mentagrophytes* y *Epidermophyton floccosum* (*E. floccosum*) (Cobos Lladó et al., 2016).

Las uñas infectadas presentan cambio de coloración, engrosamiento y deformación; esto puede provocar distrofia de las uñas y su separación del lecho ungueal (onicólisis); en casos graves llega a provocar dolor en los dedos y afectar las funciones táctiles (Cobos Lladó et al., 2016; Gupta et al., 2020). La prevalencia está relacionada con factores ambientales, la susceptibilidad del hospedador y la patogenicidad del hongo

causante de la infección (Kaur et al., 2008). Se sabe que ciertos factores de riesgo aumentan la susceptibilidad del hospedero; esos factores incluyen el envejecimiento, el sexo, la genética, el clima, la ocupación, la frecuencia de viajes, el tabaquismo, el calzado oclusivo y el uso de instalaciones compartidas como baños y vestidores (Petrucci et al., 2020).

Los pacientes sujetos a trasplante renal tienen un riesgo mayor que la población general de presentar onicomycosis debido a la terapia inmunosupresora a la cual son sometidos con el fin de minimizar el riesgo de rechazo; no obstante, tiene un gran impacto en el resultado del trasplante, siendo una causa importante de morbilidad (Oliveira et al., 2019; Zarei et al., 2020). El riesgo aumenta cuando se ha tenido *tiña ungueal* o *tiña del pie* antes de la cirugía, o se tiene antecedentes familiares de estas infecciones (Cobos Lladó et al., 2016; Petrucci et al., 2020).

La finalidad de este trabajo fue identificar, mediante técnicas de biología molecular las especies de hongos que están causando onicomycosis en pacientes incluidos en el protocolo para trasplante renal del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Ciudad de México durante los años 2020, 2021 y el primer trimestre del 2022.

ANTECEDENTES

1. MICOSIS SUPERFICIALES

El sistema tegumentario es la primera barrera contra el ambiente y microorganismos externos, especialmente contra los patógenos. También es un nicho ecológico para microorganismos comensales que tienen papeles fundamentales en la salud (Vettorato et al., 2003). Está compuesto por piel, cabello, uñas, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas, que además son elementos activos del sistema inmunitario al ayudar a controlar y prevenir infecciones y otros daños y mantienen la homeostasis del tejido (Burstein et al., 2020; Vettorato et al., 2003). La piel tiene similitudes anatómicas, funcionales y moleculares con las células epiteliales del timo; además, los

queratinocitos producen sustancias que activan la maduración de los linfocitos T (Burstein et al., 2020).

Entre las infecciones tegumentarias más frecuentes, están las micosis superficiales que afectan del 20% al 25% de la población mundial y se especula que su incidencia va en aumento, por lo que son un serio problema de salud pública mundial (Ameen, 2010; Havlickova et al., 2008). En México se estima que aproximadamente 10% de la población padece una micosis superficial en su vida; es una de las primeras causas de consulta en el servicio dermatología y constituyen hasta el 80% de las micosis (Manzano-Gayosso, 2008). Los hongos causantes infectan las capas queratinizadas de la epidermis o la porción suprafolicular del cabello, ocasionando daño tisular limitado teniendo un impacto principalmente cosmético (Borman & Summerbell, 2003).

Las micosis superficiales se dividen en dermatofitosis y en dermatomicosis. Las dermatofitosis son las más comunes y son causadas únicamente por dermatofitos. Las dermatomicosis incluyen la pitiriasis versicolor, candidosis cutánea, piedra blanca y piedra negra, tiña negra, onicomicosis e infecciones parecidas a dermatofitosis, pero causadas por hongos normalmente saprobios o fitopatógenos oportunistas (Borman & Summerbell, 2003; Manzano-Gayosso, 2008). La incidencia de estas micosis está influenciada por la región geográfica, el clima, el aspecto socioeconómico, la inmunocompetencia de individuos y la disponibilidad de un tratamiento (Ameen, 2010).

2. ONICOMICOSIS

2.1. ASPECTOS GENERALES

La onicomicosis es una afección común descrita por primera vez en 1853. Se estima que afecta al 5.5% de la población mundial, representando el 30% de las micosis superficiales y el 50% de las onicopatías, lo que genera una carga económica importante a los sistemas de salud (Kaur et al., 2008; Mendoza et al., 2012). Se caracteriza por la invasión de un hongo patógeno ya sea dermatofito, levadura o HFND en la placa y/o el lecho ungueal (Cobos Lladó et al., 2016; Petrucelli et al., 2020).

El término onicomicosis viene del griego onyx (uña) y mykes (infección por hongos) (Martínez-Herrera et al., 2015). La Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal sugiere la nomenclatura de la infección según el agente etiológico que la provoca, denominando *tiña ungueal* cuando es provocada por un dermatofito, candidosis ungueal si es provocada por una levadura del género *Candida* y micosis ungueal cuando es provocada por un HFND u otra levadura (Kaur et al., 2008; Martínez-Herrera, et al., 2015).

Es una infección superficial crónica considerada como un problema cosmético de poca prioridad, esto ha permitido el aumento de su propagación, alta prevalencia y falta de tratamiento en los centros de salud (Gupta et al., 2020). Aunque se puede presentar tanto en las uñas de las manos como en las de los pies, es más frecuente observarla en las uñas de los pies, principalmente afectando el primer dedo; es poco habitual que afecte más de una uña a menos que exista algún traumatismo o inmunosupresión (Gupta, et al., 2020; Kaur et al., 2008).

Las uñas cumplen múltiples funciones: protegen a los dedos de traumatismos, mejoran el tacto fino y aumentan la sensibilidad táctil; cuando se encuentran infectadas, la movilidad del dedo se ve limitada, afecta la circulación periférica y es propensa a la colonización por otros microorganismos (Scher et al., 2007). Las uñas infectadas deben ser tratadas, ya que se corre el riesgo de diseminación del hongo a otras partes del cuerpo, o a otras personas, desarrollar infecciones bacterianas secundarias, celulitis, reacciones idiopáticas o urticaria crónica (Cobos Lladó et al., 2016; Kaur et al., 2008).

Con el creciente número de hongos reconocidos como posibles patógenos es importante la identificación precisa del hongo causante de la infección para seleccionar el tratamiento adecuado (Ungo-kore et al., 2021). Para lograr un diagnóstico adecuado de la infección, lo primero que se realiza es un examen directo de escamas de la uña afectada con KOH, para la búsqueda de estructuras fúngicas; el resultado es corroborado mediante el cultivo micológico del cual se hace la identificación tradicional mediante el análisis de las características morfológicas (Gupta et al., 2020).

Existen casos en los que la curación se da de manera espontánea, pero habitualmente es necesario el uso de antifúngicos tópicos y sistémicos junto con avulsión o eliminación del área afectada. Se recomienda que el tratamiento dure de 12 a 18 meses para garantizar la eliminación de la infección al dejar crecer una nueva placa ungueal sana (Scher et al., 2007). Los antifúngicos más utilizados son itraconazol, griseofulvina, fluconazol y terbinafina; La griseofulvina solo es efectiva en el tratamiento de la *tiña ungueal*, mientras que los otros antifúngicos tienen diferentes grados de eficacia contra los diversos tipos de hongos (García-Martos et al., 2000; Mahoney et al., 2003).

Para la elección del tratamiento se deben tomar en cuenta otros factores como la preferencia del paciente, su estado de salud general, el consumo de otros medicamentos y la respuesta previa a antifúngicos. De ser necesario y posible, deben realizarse pruebas de sensibilidad para asegurar la efectividad del tratamiento (Scher et al., 2007). Se estima que hasta un 25% de los pacientes experimenta una infección totalmente nueva después haber logrado una cura o no se curan totalmente. Generalmente, después de un intervalo de al menos 1 año después del tratamiento, se presentan casos de reinfección, que puede estar asociada con un tratamiento inadecuado, no seguir adecuadamente el tratamiento o seguir expuesto a múltiples factores predisponentes (Scher et al., 2007; Petrucelli et al., 2020). La identificación de la especie fúngica causante y el seguimiento del tratamiento acompañado de un experto reducen el riesgo de reinfección (Petrucelli et al., 2020).

2.2. PRESENTACIÓN CLÍNICA

La onicomycosis no solamente tiene implicaciones cosméticas, sino que tiene efectos negativos físicos, fisiológicos, emocionales, sociales y ocupacionales. Psicológicamente provoca baja autoestima, inseguridad, depresión y dificultad para socializar; físicamente provoca dolor, limita la movilidad y afecta la circulación periférica (Cobos Lladó et al., 2016).

Se estima que las uñas de los pies son 25 veces más afectadas que las de las manos (Cobos Lladó et al., 2016). En los pies la onicomicosis provoca mayores síntomas físicos al impedir actividades diarias como caminar, mientras que cuando se presenta en las manos tiene un efecto más psicosocial ya que causa baja autoestima al sentir vergüenza e inseguridad debido a que la exposición es mayor (Cobos Lladó et al., 2016; Kaur et al., 2008).

El cuadro clínico causado por una especie fúngica es indistinguible del causado por otra. La infección comienza del borde distal o lateral extendiéndose por debajo del lecho ungueal donde puede causar cambio de color (amarillo, blanco o marrón), separación del lecho ungueal (onicólisis), engrosamiento por acumulación subungueal de detritus epidérmico, distrofia, paroniquia y/o fragilidad (Gupta et al., 2020; Mahoney et al., 2003). Aunque es una enfermedad principalmente asintomática, en manifestaciones graves provoca molestia, dolor, inflamación con aumento de volumen del área, disminución de las funciones táctiles, limitación de la movilidad y posible afección de la circulación periférica (Cobos Lladó et al., 2016).

De acuerdo con los criterios propuestos por Zaias en 1972, las onicomicosis presentan alguna de las cinco variedades clínicas, dependiendo del grado de afección de la lámina:

1) Subungueal distal y lateral: es la forma más común; el hongo entra por el surco ungueal distal y lateral, invadiendo la capa córnea del lecho y del hiponiquio ungueal, propagándose hacia el flujo de crecimiento, infectando toda la uña y ocasionando cambio de color, hiperqueratosis subungueal, onicólisis, onicodistrofia y/o paroniquia (Zaias, 1972).

2) Subungueal proximal: comienza debajo del pliegue ungueal proximal extendiéndose distalmente sin afectar la superficie, migra a la matriz subyacente y se disemina distalmente debajo de la placa ungueal ocasionando paroniquia; es común en pacientes inmunocomprometidos (Zaias, 1972).

3) Blanca superficial: la placa ungueal es infectada causando pequeñas manchas blancas opacas bien delimitadas, acompañado del adelgazamiento de la lámina ungueal; no presenta inflamación (Zaias, 1972).

4) Endonyx: es la forma clínica menos frecuente; es causada por invasión a la placa ungueal a partir del surco ungueal distal formando parches de color blanco lechoso y penetrando la lámina ungueal; no ocasiona hiperqueratosis ni onicólisis (Singal & Khanna, 2011)

5) Distrófica total: puede ser primaria o secundaria a partir de las otras formas clínicas, la placa ungueal es destruida completamente (Singal & Khanna, 2011).

Aunque la onicomycosis no se considera una enfermedad mortal, no puede tratarse como un simple problema cosmético; La enfermedad es de larga duración a pesar de tener una terapia temprana y adecuada (Scher et al., 2007). Enfermedades como psoriasis, eczema, liquen plano ungueal, infecciones bacterianas, dermatitis por contacto, distrofia por trauma, paroniquia congénita, tumores, síndrome de las uñas amarillas y onicólisis idiopática, dan un cuadro clínico similar por lo que un diagnóstico preciso es importante (Kaur et al., 2008).

2.3. AGENTES CAUSALES

2.3.1. DERMATOFITOS

Los dermatofitos son los principales agentes causales de la onicomycosis; causan entre el 50% y el 80% de todos los casos; son los responsables del 90% de las infecciones de los pies y el 50% de las manos (Kaur et al., 2008; Leung et al., 2020). *T. rubrum* es la especie más común causante de onicomycosis, seguida por *T. mentagrophytes* y *E. floccosum*. Especies de *Microsporum* u otras de *Trichophyton* son raramente aisladas de esta afección (Leung et al., 2020). La *tiña ungueal* en los pies suele ser secundaria a una *tiña del pie* crónica, mientras que en las manos puede surgir como una infección secundaria de la *tiña del pie*, *palmar* o *ungueal* de los pies (Cobos Lladó et al., 2016).

2.3.2. HONGOS FILAMENTOSOS NO DERMATOFITOS (HFND)

Los HFND causan del 1.5% al 6% de las onicomycosis, dependiendo de la región geográfica y el método de diagnóstico que se utilice. Afectan principalmente los pies y se asocian con inflamación periungueal (Kaur et al., 2008). Estos hongos están presentes en el suelo y en la materia orgánica, la mayoría con una distribución mundial. Cuando son aislados en un laboratorio de diagnóstico, puede ser debido a que sean contaminantes ambientales, comensales, colonizadores transitorios, invasores secundarios, invasores primarios o acompañantes de dermatofitos en infecciones mixtas (Martínez-Herrera et al., 2015; Singal & Khanna, 2011).

Los principales HFND aislados como agentes causantes de onicomycosis son *Scopulariopsis brevicaulis* y *Aspergillus versicolor*, seguidos de *Acremonium sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *Scytalidium hyalinum* y *Onychocola canadensis* (Cobos Lladó et al., 2016). El diagnóstico, se basa en la sospecha clínica y en la confirmación repetida demostrando que crecen más de cinco colonias de forma reproducible a partir de la uña en diferentes momentos (Gupta et al. 2003). El tratamiento es difícil ya que no responden adecuadamente a los antimicóticos convencionales, por lo que su identificación es muy importante (Martínez-Herrera et al., 2015; Singal & Khanna, 2011).

En México la incidencia calculada de este grupo de hongos es de 2.25%; se han reportado *S. brevicaulis*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Cladosporium spp.*, *Alternaria alternata*, *Acremonium spp.* y *Curvularia spp.* como agentes causales (Moreno & Arenas, 2010). En pacientes con alguna inmunodeficiencia como diabetes y esclerosis múltiple, se han reportado *Paecilomyces spp.*, *Tritirachium oryzae*, *Phialophora spp.*, *Rhizopus spp.*, *Neoscytalidium dimidiatum* y *Chaetomium globosum* como causantes de onicomycosis (Martínez-Herrera et al., 2015; Sánchez- Cárdenas et al., 2021).

2.3.3. LEVADURAS

En los últimos años han aumentado los reportes de levaduras que causan infecciones. Entre el 8 y el 10% de las onicomycosis son causadas por levaduras principalmente del género *Candida*, afectando generalmente las uñas de las manos (Cobos Lladó et al., 2016; Singal & Khanna, 2011). *Candida albicans* (*C. albicans*) es la principal levadura aislada de pacientes con onicomycosis, abarcando casi el 70% de los casos; le siguen *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y en menor medida se reportan otros géneros como *Trichosporon cutaneum*, *Geotrichum candidum* y *Geotrichum capitatum* (Cobos Lladó et al., 2016; Singal & Khanna, 2011).

Las especies de *Candida* son parte de la microbiota comensal y transitoria, por lo que son considerados patógenos endógenos oportunistas, aunque ocasionalmente se puede propagar entre individuos o intrahospitalariamente (Havlickova et al., 2008). La onicomycosis por *Candida* se divide en tres tipos: paroniquia, que se manifiesta por tumefacción y eritema en los pliegues ungueales proximales y laterales; granuloma, que implica la invasión directa de la placa ungueal, produciendo engrosamiento de esta y onicólisis, condición en que la placa ungueal se separa del lecho (Kaur et al., 2008).

En la última década las especies de *Trichosporon spp.* han tenido mayor relevancia como causa de onicomycosis. Se han reportado las especies *T. asahii* y *T. cutaneum* como las más frecuentes después de las especies del género *Candida* (Martínez-Herrera et al., 2021). En pacientes inmunocomprometidos la infección puede diseminarse produciendo fungemias con una mortalidad de hasta el 80% (Ortega-Springall et al., 2016; Martínez-Herrera et al., 2021).

2.4. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de onicomycosis está estimada entre 14 y 23% en la población general, y está determinada por factores predisponentes como hiperhidrosis, onicogrifosis, la edad, factores sociales, ocupación, clima, traumatismos repetidos en las uñas, exposición frecuente al patógeno, disminución de la función inmune, falta de higiene, mal corte de las uñas y uso de zapatos oclusivos (Haghani et al., 2019; García-Martos

et al., 2000). En pacientes con enfermedades como diabetes, psoriasis, insuficiencia venosa y arterial, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) e insuficiencia en algún órgano la prevalencia aumenta hasta un 25% (Gupta, y otros, 2020).

La incidencia no cuenta con valores establecidos debido a que los reportes vienen únicamente de la consulta dermatológica, pero se estima que va en aumento gracias a las migraciones masivas y a los viajes recreativos que han conducido a la dispersión de los agentes etiológicos principalmente en países industrializados (Ameen, 2010; Manzano-Gayosso, 2008). La incidencia es influenciada por el ambiente, el hospedador y el patógeno, el riesgo de la infección aumenta por factores como la edad, el sexo, la genética, el tabaquismo, frecuencia de viajes, uso de saunas, baños y piscinas públicas, antecedentes familiares, traumatismos repetidos y función inmunitaria disminuida (Ameen, 2010; Petrucelli et al., 2020).

La onicomycosis es una enfermedad común en todo el mundo y es considerada como un trastorno de adultos mayores, pacientes inmunosuprimidos y de grupos ocupacionales (soldados, deportistas, obreros o bomberos) (Cobos Lladó et al., 2016). Los agentes etiológicos varían según la región geográfica; son diferentes incluso dentro de un mismo país y cambian junto con los patrones de migración, el crecimiento del turismo, la globalización y el cambio en las condiciones socio económicas que provocan que se propaguen especies poco comunes (Ameen, 2010; Havlickova et al., 2008; Ungo-kore et al., 2021).

Se ha visto que en países occidentales con climas templados los dermatofitos son los principales causantes de onicomycosis, mientras que en países con clima tropical son más frecuentes las levaduras y HFND (Ameen, 2010). En México no se cuenta con datos precisos y actuales de la prevalencia y de la incidencia de esta enfermedad. En un estudio realizado de 1992 a 2005 en el que se reportaron 5 221 casos de onicomycosis se calculó una prevalencia de 3.22%. En 2010 se reportaron 12,637 pacientes con onicopatías; en el 48% se diagnosticaron onicomycosis y en el 88% los pies fueron los afectados (Cobos Lladó et al., 2016).

3. PACIENTES DE TRASPLANTE DE ÓRGANOS

El trasplante de órganos se ha convertido en una alternativa común cuando se presenta falla de algún órgano, para permitir aumentar la calidad y la esperanza de vida de los pacientes; su éxito se debe a las técnicas quirúrgicas actuales y a los regímenes inmunosupresores prolongados que mejoran la aceptación e impiden el rechazo del injerto, al inhibir la activación de los linfocitos T y B por la estimulación ante los antígenos de histocompatibilidad del órgano donado (Oliveira et al., 2019; Zarei et al., 2020).

La terapia inmunosupresora interfiere también con la reactividad hacia organismos infecciosos, por lo que se asocia a una mayor susceptibilidad a infecciones por hongos, bacterias, virus y protozoos comunes y oportunistas, que toman un curso agresivo y atípico, particularmente se presentan infecciones de tipo cutáneo (Oliveira et al., 2019). Las infecciones posteriores a una cirugía de trasplante son un desafío que persiste y tienen un gran impacto en la aceptación del órgano trasplantado. Se presentan inmediatamente después del trasplante o durante el periodo perioperatorio, siendo las infecciones del tipo fúngico un problema importante ya que presentan una tasa de morbilidad y mortalidad de hasta el 90% (Lima et al., 2013; Zarei et al., 2020).

La incidencia y la etiología de las micosis varían dependiendo de la edad, enfermedad subyacente, tipo de trasplante, condición del órgano donado, tiempo postrasplante, entorno hospitalario y la terapia inmunosupresora. Las micosis pueden ser endógenas o exógenas, pero se ha visto que es posible adquirirse a partir del órgano trasplantado o mediante una transfusión, tendiendo a ser generalizadas (Magaña Ramírez et al., 2013; Virgili et al., 2002).

Los inmunosupresores inhibidores de la calcineurina como ciclosporina, azatioprina y tacrolimus, han sido asociados con micosis superficiales (Oliveira et al., 2019). La piel es un órgano inmunológicamente activo por su función de barrera ante agentes externos y la producción de queratinocitos. Al ser afectada la piel o sus anexos por hongos, puede ser un signo de una micosis invasiva, por lo que su diagnóstico y

tratamiento oportuno son importantes para mejorar la supervivencia de los pacientes (Lima et al., 2013; Oliveira et al., 2019; Zarei et al., 2020).

3.1. ONICOMICOSIS EN PACIENTES DE TRASPLANTE RENAL

El trasplante renal es considerado la mejor terapia para pacientes con insuficiencia renal crónica, que antes solo tenían como opciones de tratamiento la hemodiálisis o diálisis peritoneal (Vettorato et al., 2003; Tapia-Amador et al., 2022). En México el primer trasplante renal fue realizado en 1963 en el Hospital General del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social (Ayala-García et al., 2020). Hasta el 2020 se realizaban en promedio 2,705 trasplantes renales anuales; este número bajó drásticamente debido a la epidemia por COVID-19. Durante este año 2022 se han realizado un total de 2,712 trasplantes de riñón, de los cuales 278 fueron realizados en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, y existen 15,261 pacientes en espera (Sistema Informático del Registro Nacional de Trasplantes, 2022).

La terapia inmunosupresora a largo plazo reduce el número de células de Langerhans epidérmicas, induce el engrosamiento y retrasa la descamación del estrato córneo, lo que los predispone a una variedad de complicaciones cutáneas, principalmente fúngicas como la onicomicosis (Güleç et al., 2003). La prevalencia de onicomicosis en estos pacientes es del 5.17% y su incidencia varía del 10 al 13%. El riesgo aumenta cuando hay antecedentes de onicomicosis y/o *tiña del pie* en el paciente o en los familiares (Cobos Lladó et al., 2016).

La literatura indica que las lesiones cutáneas pueden ser el primer hallazgo de una infección fúngica invasiva (Lima et al., 2013). Cuando se propaga una infección que inicia como onicomicosis se puede observar linfadenopatía severa, hifas dentro de los nodos linfáticos y fungemia potencialmente mortal, por lo que debe tomarse en serio su diagnóstico en estos pacientes (Cobos Lladó et al., 2016; Güleç et al., 2003).

4. DERMATOFITOS

Los dermatofitos son hongos filamentosos cosmopolitas, los cuales pertenecen al Phylum Ascomycota, orden Onygenales, familia Arthrodermataceae (de Hoog et al., 2017). Se caracterizan por su capacidad para utilizar la queratina como fuente de nutrientes lo que les permite invadir el estrato córneo de la epidermis, el cabello y las uñas causando infecciones subagudas o crónicas. A estas infecciones se les denomina tiñas (de Hoog et al., 2017; Gnat et al., 2021).

Las tiñas comprenden el 58% de todas las micosis superficiales (Manzano-Gayosso, 2008). En pacientes inmunocomprometidos pueden evolucionar rápidamente y llegar a formas extensas confinadas a la epidermis, o presentar un comportamiento invasivo a sitios extra cutáneos causando granulomas, nódulos, pápulas o lesiones frecuentemente asociadas a prurito, dolor y exudado (Rouzaud et al., 2018).

La patogenia de las dermatofitosis presenta cuatro etapas: adhesión, colonización, invasión y penetración (Burstein et al., 2020). Los síntomas y duración de estas etapas varían dependiendo del hospedador y de los factores de virulencia como: enzimas queratinolíticas (hidrolasas, glucanasas, quitinasas, manosil-transferasas), proteínas de choque térmico, proteínas del dominio LysM y producción del ergosterol. Las quitinasas (subtilisinas y fungalisinas) son el principal factor de virulencia ya que permiten la colonización y el mantenimiento del hongo en el hospedero; se ha visto que estas proteasas interfieren con la respuesta inmune del hospedero ante sí mismo y otros patógenos (Burstein et al., 2020).

Los hongos dermatofitos se pueden clasificar de acuerdo con su hábitat natural en antropofílicos cuando están mejor adaptados al humano; zoofílicos cuando están más adaptados a animales no humanos; y geofílicos cuando su principal hábitat es el suelo como saprobios (Havlickova et al., 2008). Los hongos antropofílicos están relacionados con micosis crónicas y leves de baja inflamación, pero son altamente contagiosas; los zoofílicos se caracterizan por causar mayor inflamación y los geofílicos infectan esporádicamente a humanos y otros animales ocasionando signos y síntomas variables (Havlickova et al., 2008; de Hoog et al., 2017).

Los principales géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* son patógenos tanto de humanos como de otros animales (Vera Díaz, et al., 2015). Por mucho tiempo solo se consideraban estos géneros como los pertenecientes al orden Onygenales. Sin embargo, gracias a las herramientas de biología molecular, la taxonomía de los dermatofitos ha evolucionado conformándose actualmente por nueve géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Arthroderma*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Ctenomyces* y *Guarromyces* (de Hoog et al., 2017; Gnat, et al., 2021). Las especies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* y *E. floccosum* tienen una distribución mundial. *T. rubrum* es la especie antropofílica más frecuente causante de diferentes tipos de tiña (Ameen, 2010).

T. mentagrophytes es el segundo dermatofito más común; es considerado un complejo de variedades antropofílicas y zoofílicas genéticamente indistinguibles; a las variedades antropofílicas se les llama *T. interdigitale*; esta variedad se distingue morfológicamente ya que genera menos microconidios que las variantes zoofílicas (Nenoff et al., 2007). Todas las especies de *T. mentagrophytes* tienen microconidios redondos, de paredes lisas, no forman macroconidios y forman hifas en espiral; macroscópicamente se asemejan a *T. rubrum* al formar colonias algodonosas o granulosas que pueden tener un pigmento amarillo a marrón (Nenoff et al., 2007).

Las especies del género *Trichophyton* son muy parecidas; las colonias suelen ser blancas a amarillas con un aspecto algodonoso, producen microconidios redondos, piriformes o en forma de clava, de pared lisa, que se forman individualmente a lo largo de las hifas y macroconidios en distintas cantidades de paredes lisas, delgadas a gruesas, con 1-12 tabiques y pueden observarse en racimos (Borman & Summerbell, 2003; Macura, 1993). Las colonias de *T. rubrum* suelen ser algodonosas y producen un pigmento vino a rojo. Las colonias de *T. interdigitale* son más pulverulentas a granulosas, algunas producen pigmento marrón-rojo, no forma macroconidios, pero produce microconidios abundantes e hifas en espiral. En la morfología macroscópica de *T. tonsuras* suele observarse un centro plegado, aspecto aterciopelado a pulverulento y con pigmento difuso marrón; microscópicamente produce pocos macroconidios (Macura, 1993; Nenoff et al., 2007).

Las colonias de *E. floccosum* son de aterciopeladas a pulverulentas, de color blanco, amarillo o verde oliva y en algunas ocasiones produce pigmento. Microscópicamente son fácilmente distinguibles ya que no producen microconidios y sus macroconidios son ovales, claviformes, lisos, de paredes delgadas, con dos a seis segmentos y dispuestos a lo largo de las hifas individualmente o en forma de racimo (Borman & Summerbell, 2003; Macura, 1993). Las especies del género *Microsporum* forman colonias blancas, algodonosas, con pigmento amarillo difuso, que producen macroconidios fusiformes, equinulados, con 4 a 15 septos que crecen individualmente desde los extremos de las hifas (Borman & Summerbell, 2003; Macura, 1993).

La mayoría de los laboratorios clínicos que hacen diagnóstico micológico se basan en las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas para diferenciar los géneros y especies. La identificación se basa principalmente en la morfología de la colonia y los conidios, aunque también se utiliza el cuadro clínico como referencia (de Hoog et al., 2017; Faramarzi et al., 2021). Esta forma de identificación resulta complicada debido a la similitud morfológica, la variabilidad y los polimorfismos entre los hongos o el mismo taxón. Una especie puede presentar diferentes fenotipos de acuerdo con las condiciones de su aislamiento, lo que ocasiona que sea confundida con otra especie o que se tengan varios nombres para nombrar a una sola especie (de Hoog et al., 2017; Kanbe, 2008). Los cultivos de muestras médicas y veterinarias que tienen mucho tiempo de haber sido tomadas muestran características fenotípicas insuficientes para identificar y diferenciar especies (de Hoog et al., 2017).

Los géneros de los dermatofitos están estrechamente relacionados filogenética y taxonómicamente (Kanbe, 2008). La identificación de género y especie se hace generalmente usando las secuencias del espaciador transcrito interno (Internal Transcribed Spacer ITS) del ARN ribosómico (18S, ITS1, 5.8S, ITS2 y 26S) debido al alto poder de resolución de esta región (Kanbe, 2008). En 2017, de Hoog y colaboradores construyeron un árbol filogenético donde se distinguen siete clados de dermatofitos: el clado (A), que contiene especies antropófilas y zoofílicas del género *Trichophyton*; (B), compuesto únicamente por *Epidermophyton floccosum*; (C), especies zoofílicas y geofílicas de *Microsporum*; (D) y (E) con grupos de especies

heterotáticas; (F), incluye a la especie *M. canis*; y el clado (G), con especies geofílicas del teleomorfo *Arthroderma* (de Hoog et al., 2017).

En estudios taxonómicos como el realizado por de Hoog (2017), se ha observado claramente una separación entre los clados predominantemente antropofílicos como *Trichophyton* y *Epidermophyton*. En los clados zoofílicos y geofílicos como el del género *Microsporum* y esta diferencia también se ve directamente en las especies como *T. interdigitale* que permanece diferenciada de las variantes zoofílicas de *T. mentagrophytes* (de Hoog et al., 2017). Las especies predominantemente antropofílicas y zoofílicas constituyen la copa del árbol filogenético, mientras que las especies geofílicas se encuentran en la base (de Hoog et al., 2017; Pchelin et al., 2016).

En México la incidencia de las dermatofitosis es del 16 – 60%, constituyendo del 70 al 80% de las micosis superficiales; de las formas clínicas, las más frecuentes son la *tiña ungueal* y la *tiña de los pies* y las menos frecuentes son la *tiña del cuerpo, de la ingle y de la cabeza* (Arenas et al., 2010; López-Aguado et al., 2021; Manzano-Gayosso, 2008). *T. rubrum* es la especie más frecuente constituyendo hasta el 70% de los casos; *T. mentagrophytes* (incluyendo la variedad *T. interdigitale*) el 10%; *T. tonsurans* 3%; *M. canis* 13%; y *E. floccosum* 1% (Arenas et al., 2010; López-Martínez et al., 2010; Manzano-Gayosso, 2008).

JUSTIFICACIÓN

Los pacientes con insuficiencia renal crónica tienen alta probabilidad de mortalidad, siendo el trasplante renal una opción para mejorar la calidad de vida. Los pacientes con trasplante renal presentan con frecuencia complicaciones dermatológicas asociadas a la inmunosupresión propia y del tratamiento (Ayala-García et al., 2020; Tapia-Amador et al., 2022).

En México las micosis superficiales afectan alrededor del 10% de la población, siendo la onicomycosis uno de los motivos más frecuentes de consulta dermatológica y representando el 5% de las dermatosis diagnosticadas en pacientes de trasplante renal. A pesar de que no es una condición mortal, tiene un impacto importante en la

calidad de vida del paciente y puede ser indicio de una micosis sistémica (Manzano-Gayosso, 2008; Tapia-Amador et al., 2022).

Este estudio contribuirá a conocer la prevalencia y los agentes causales más frecuentes de onicomycosis, y con ello buscar estrategias para prevenir, tratar y controlar de manera adecuada la infección en pacientes inmunosuprimidos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las especies causantes de onicomycosis en los pacientes incluidos en el protocolo para trasplante renal atendidos en el Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS?

HIPÓTESIS

Hipótesis alterna: Las principales especies causantes de onicomycosis en los pacientes con protocolo para trasplante renal son los hongos dermatofitos.

Hipótesis nula: Las especies de hongos dermatofitos no son los principales agentes causantes de onicomycosis en pacientes con protocolo para trasplante renal.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar mediante PCR-secuenciación las especies causantes de onicomycosis a partir de cultivos de escamas de uñas procedentes de pacientes incluidos en el protocolo para trasplante renal atendidos en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, de la Ciudad de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar los hongos obtenidos por cultivo de escamas de uñas de pacientes en protocolo para trasplante renal.
- Estudiar las características morfológicas (microscópicas y macroscópicas) de los hongos aislados.

- Identificar por PCR-secuenciación los hongos recuperados.

METODOLOGÍA

MUESTRAS

Se recibieron 135 muestras de escamas de uñas con onicopatía de 75 pacientes mayores de 18 años, incluidos en un protocolo para trasplante renal y de algunos posibles donadores, referidos del Servicio de Dermatología del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Ciudad de México de enero del 2020 a febrero del 2022.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO

Las escamas fueron sometidas a un examen directo (ED) utilizando hidróxido de potasio al 20% (KOH) para la visualización de estructuras fúngicas (Mendoza et al., 2012). En los casos en que se recibió la uña completa, ésta fue raspada con una hoja de bisturí previamente esterilizada o limpiada con alcohol al 70% para obtener escamas.

Las escamas fueron colocadas en un portaobjetos, añadiendo una gota de KOH y colocando encima un cubreobjetos; la preparación se dejó reposar por 20 minutos antes de su examinación en un microscopio óptico de campo claro a 10X y 40X. Los resultados fueron reportados como negativo, positivo a filamentos (o artroconidios) o positivo a levaduras, e indicando la abundancia de estructuras fúngicas con ++ (escasas), +++ (moderadas), o 5+ (abundantes).

CULTIVO

Las escamas fueron cultivadas en dos medios: Agar Dextrosa Sabouraud con antibiótico (ADSa) para el aislamiento de levaduras y hongos filamentosos y Agar-Tierra-Pelos con antibiótico (ATPa, para promover el crecimiento de dermatofitos). Ambos medios contienen como antibiótico cicloheximida y cloranfenicol que inhiben el crecimiento de bacterias y de hongos filamentosos con bajo o nulo poder patógeno que podrían competir por los nutrientes impidiendo el crecimiento de los hongos. En los

casos en que el examen directo con KOH mostró estructuras concordantes con levaduras, las escamas también fueron sembradas en Agar Dextrosa Sabouraud sin antibióticos (ADS, debido a que diversas levaduras principalmente del género *Candida* no crecen en presencia de cicloheximida). Los cultivos fueron incubados a 28 °C, máximo 3 semanas con revisión a los 5, 15 y 21 días.

PROCESAMIENTO DE LOS CULTIVOS POSITIVOS

Al tener un cultivo positivo se resembró una colonia en ADSa y/o ADS para purificar el aislado y se realizó un ED con azul de algodón para identificar de forma preliminar el género y la especie del hongo por sus características macroscópicas y microscópicas. En caso de resultar un HFND se revisó el número de colonias del primo aislamiento y se realizó un segundo cultivo de la muestra para determinar si el crecimiento era debido a contaminación o en efecto era posible causa de infección.

En el caso de los dermatofitos y los HFND, se realizó el ED con azul de algodón utilizando cinta adhesiva transparente, para tomar el micelio con la parte adhesiva y la ayuda de un asa micológica. En caso de levaduras un pequeño fragmento de la colonia fue tomado con un asa bacteriológica y se colocó en un portaobjetos sobre una gota de azul de algodón homogeneizando la muestra y colocando encima el cubreobjetos. La preparación fue visualizada en un microscopio de campo claro a 10X y 40X.

CULTIVO MONOSPÓRICO

A partir de un cultivo puro de dermatofitos en ADSa se realizó un subcultivo en Agar Lactrimel de Borelli incubándose a 28 °C durante una semana para promover la conidiación. Después del tiempo de incubación se realizó un ED de la colonia con azul de algodón para comprobar morfología y pureza; posteriormente se tomó un tubo de 1.5 ml colocándole 250 µl de solución salina estéril y un fragmento de la colonia agitando cuidadosamente la solución sin desprender el micelio del agar. Este procedimiento fue similar para los HFND, aunque los medios fueron diferentes dependiendo del género.

A partir de la suspensión se cuantificaron los conidios colocando 10 µl de esta en una cámara de Neubauer, visualizada en un microscopio de campo claro a 40X y utilizando

la fórmula $(\text{número de conidios}) \times (10^4) = \text{conidios/ml}$. Al obtener el promedio de conidios en la suspensión se realizaron diluciones hasta obtener un aproximado de 10-25 conidios en cada 10-20 μl ; de esta dilución se sembraron 20 μl por estría cerrada en Agar Papa Dextrosa (APD), para incubar a 28 °C y ser revisado cada 24 hrs hasta que se observan pequeñas colonias aisladas.

Una colonia aislada crecida en APD (u otro medio para HFND) fue sembrada en Agar Lactrimel de Borelli incubándose hasta tener la muestra suficiente para realizar microcultivo en Agar Lactrimel de Borelli, en ADSa, en ATPa. Se preparó un subcultivo para conservar en solución salina para su almacenamiento.

ESTUDIO MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO

El estudio macroscópico se realizó a partir de subcultivos en ADSa y ATPa, que fueron incubados por 15 días a 28°C. Las características de la colonia como aspecto, color, superficie, textura, borde y producción de pigmento fueron consideradas para determinar por lo menos el género. Se realizó registro fotográfico.

El estudio microscópico fue realizado a partir de microcultivos, preparados en cajas Petri de vidrio estériles, en donde se montó un portaobjetos sobre un triángulo de vidrio; encima del portaobjetos se colocaron dos cuadros de 0.5 x 0.5 cm de Agar Lactrimel de Borelli; en cada orilla del agar se inoculó la muestra y se colocó encima un cubreobjetos estéril. A la caja Petri se adicionó agua glicerinada al 10% estéril para evitar la deshidratación del agar.

Los microcultivos fueron incubados durante 3 a 5 días, dependiendo del crecimiento de la muestra, a 28°C. Las estructuras microscópicas fueron observadas en un microscopio de campo claro a 40 y 100X tomando el cubreobjetos del microcultivo y colocándolo en un portaobjetos limpio con una gota de azul de algodón. Se realizó registro fotográfico.

EXTRACCIÓN DE ADN UTILIZANDO EL PROTOCOLO DE FENOL-CLOROFORMO

Para la extracción de ADN se inoculó el cultivo monospórico en un matraz Erlenmeyer de 150 ml conteniendo 50 ml de Caldo Dextrosa Sabouraud, incubándose en agitación

a 28°C durante 5 días. El micelio obtenido se filtró con ayuda de un embudo de plástico y papel filtro estéril; la masa fúngica fue lavada con agua destilada estéril y secada totalmente con papel filtro; se cubrió con papel aluminio manteniéndolo en hielo hasta su uso.

El micelio obtenido fue fragmentado en un mortero estéril en presencia de nitrógeno líquido (N₂) hasta obtener un polvo fino. En un tubo estéril de 2.0 ml se colocó el micelio pulverizado junto con 600 µl del buffer de lisis y 10 µl de proteinasa K (20mg/µl); el tubo fue agitado manualmente hasta quedar una mezcla homogénea e incubado en baño seco a 65°C por 1 hora.

Pasado el tiempo de incubación se adicionó 1 volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (en proporciones 25-24-1) y se agitó firmemente hasta obtener un aspecto lechoso; la mezcla fue centrifugada a 14 000 rpm por 15 minutos. La fase acuosa (sobrenadante) fue recuperada en un tubo estéril de 1.5 ml y se adicionaron dos volúmenes de etanol al 100% y 0.1 volumen de Acetato de sodio 3M, agitando el tubo por inversión suave hasta la visualización de hebras blancas.

La muestra fue centrifugada a 14,000 rpm por 5 minutos precipitando el ADN en el fondo del tubo. El sobrenadante fue desechado y se agregó al tubo 1 ml de etanol al 70 %. Se agitó el tubo firmemente y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. El etanol fue decantado y se dejó secar la pastilla de ADN a temperatura ambiente, la cual fue resuspendida en agua ultrapura milliQ y se adicionaron 2 µl de RNAsa (Thermo Scientific) para finalmente incubar a 37°C por 1 hr.

La cantidad de ADN obtenida fue cuantificada por espectrofotometría con un DS-11 Spectrophotometer de DeNovix y la calidad fue determinada por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% diluido en TAE (Tris 40 mM, ácido acético 11.42 ml / L-EDTA 2 Mm) 1X, colocando por pocillo una mezcla de 3 µl del ADN, 1.6 µl de buffer de carga y 5.4 µl H₂O MiliQ. En un pocillo de cada gel se depositó también el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III Fragments (invitrogen); las muestras fueron corridas en un el gel al 0.8%, inmerso en TAE 1X, en una cámara de electroforesis, por 1 h a 80 voltios; el gel fue visualizado en un transiluminador de luz UV.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Dos regiones de ADN fueron consideradas para ser amplificadas en todas las muestras: la región espaciadora interna transcrita (ITS) y la subunidad mayor (LSU) del ADN ribosomal. Para los dermatofitos se utilizó también la región que codifica a beta-tubulina (TUB). Para todas las reacciones se utilizó el kit Taq DNA polymerase (recombinant) (Thermo Scientific), el juego de dNTP's de la misma marca y el termociclador Corbett CGI-96, Palm-Cycler Thermal Cycler.

Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, inmerso en TAE 1X, colocando por pocillo una mezcla de 3 µl del producto de PCR, 1.6 µl de buffer de carga y 5.4 µl H₂O MilliQ. En cada gel se depositó el marcador de peso molecular (Thermo Scientific GeneRuler 100 pb DNA Ladder). Las muestras fueron corridas en una cámara de electroforesis por 1 h a 80 voltios y visualizadas en gel con un transiluminador de luz UV.

PCR para ITS

Para ITS se usaron los cebadores ITS1 (5'-TCC GTA CCT GAA CCT GCG G -3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'), la reacción se realizó a un volumen final de 50 µl utilizando las siguientes concentraciones finales: buffer (1X) 5 µl, MgCl₂ (2 mM) 4 µl, dNTP's (0.24 mM) 1.25µl de c/u, Taq 0.7µl, cebadores (0.25 µM) 5µl de c/u, ADN (5 ng/ µl) 5 µl. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización 96°C por 5 min; 25 ciclos de desnaturalización, 95°C por 30 s, alineación 59°C por 30 s; elongación 72°C por 30 s; elongación final 72°C por 5 min.

PCR para LSU

Para la amplificación de LSU se utilizaron los cebadores LR0R (5'- ACC CGC TGA ACT TAA GC -3') y LR5 (5'- TCC TGA GGG AAA CTT CG -3'); la reacción se realizó a un volumen final de 50 µl con concentraciones finales: buffer (1X) 5 µl, MgCl₂ (2 mM) 4 µl, dNTP's (0.4 mM) 2 µl de c/u, Taq 0.7 µl, cebadores (0.08 µM) 2 µl de c/u, ADN (5 ng/µl) 5µl. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización 95°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización 94°C por 30 s, alineación 52°C por 50 s, elongación 72°C por 1 min; elongación final 72°C por 7 min.

PCR para TUB

Para el gen de β -tubulina se utilizaron los cebadores TUB2Fd (5'-GTB CAC CTY CAR ACC GGY CAR TG -3') y TUB4Fd (5'-CCR GAY TGR CCR AAR ACR AAG TTG TC -3'). La reacción se realizó a un volumen final de 50 μ l utilizando las siguientes concentraciones finales: buffer (1X) 5 μ l, MgCl₂ (2 mM) 4 μ l, dNTP's (0.1 mM) 0.5 μ l de c/u, Taq 0.5 μ l, cebadores (0.25 μ M) 5 μ l de c/u, ADN (5ng/ μ l) 5 μ l. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización 94°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización 94°C por 45 s, alineación 62°C por 30 s, elongación 72°C por 90 s; elongación final 72°C por 6 min.

SECUENCIACIÓN DE NUCLEÓTIDOS

Los productos de PCR observados en el gel de electroforesis como una única banda sin productos secundarios y con la concentración suficiente fueron purificados con el kit "DNA Clean & Concentrator™-5" (ZYMO RESEARCH) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los productos de PCR fue realizada con el método de Sanger por LABSERGEN de LANGEBIO. Los resultados de la secuenciación fueron analizados mediante comparación con la base de datos del NCBI, usando la herramienta nucleótido-BLAST estándar (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), para determinar el género y especie del hongo correspondiente.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para el análisis filogenético de las especies de dermatofitos obtenidas se utilizaron 2 secuencias de referencia por cada especie, obtenidas de artículos científicos y descargadas de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), (**Tabla 1**). Las secuencias crudas fueron editadas eliminando las bases con mala calidad de lectura utilizando las herramientas Trim Low Quality y Delete Trimmed Sequences y posteriormente revisándolas visualmente y eliminando las partes necesarias con el programa Chromas 2.6.6.

Para cada locus, las secuencias fueron alineadas individualmente utilizando MEGA 11, se verificaron visualmente y ajustaron manualmente en donde fue necesario; los espacios en donde no se encontraba una base definida se completaron utilizando signo

de interrogación “?”. Utilizando MrBayes 3.2.7 se construyeron árboles filogenéticos de inferencia bayesiana utilizando el modelo evolutivo como variación de tasa distribuida por gamma entre sitios y una proporción de sitios invariables (“GTR+I+??”). Se ejecutó la simulación de cadena de Markov Monte Carlo las generaciones suficientes para obtener una desviación estándar inferior a 0.01; se realizaron cuatro análisis simultáneos e independientes, con una frecuencia de muestra de 100, y un diagnóstico de frecuencias de 5000. Se descartó el 25% de las generaciones análisis total y se visualizaron los árboles usando FigTree.

TABLA 1. CEPAS DE REFERENCIA UTILIZADAS

Especie	Cepa	Origen	País	ITS	LSU	TUB	Referencia
<i>E. floccosum</i>	93-2767	Piel	Tehran, Iran	MF434533	MH389717	MG267092	(Faramarzi et al., 2021),
<i>E. floccosum</i>	CBS 230.76	Humano	Utrecht, Países bajos	KT155837	KT55176	KT155517	(de Hoog et al., 2017).
<i>T. interdigitale</i>	CBS 232.76	Tiña del pie	Utrecht, Países bajos	KT155838	KT155177	KT155518	(de Hoog et al., 2017).
<i>T. interdigitale</i>	CBS 113889	Uña	Utrecht, Países bajos	KT155711	KT155030	KT155406	(de Hoog et al., 2017).
<i>T. rubrum</i>	CBS 391.58	Humano	Países bajos	MH857821	MH869353	KT155557	(de Hoog et al., 2017).
<i>T. rubrum</i>	CBS 115318	Onicomycosis	Utrecht, Países bajos	KT155717	KT155037	KT155413	(de Hoog et al., 2017).

RESULTADOS

Se recibieron un total de 135 muestras de 75 pacientes de los cuales 45 fueron hombres y 30 mujeres. El 45.3% de las muestras eran de pacientes Pre- trasplante, 37.3% fueron de Post- trasplante, del 2.7% recibimos muestras de pre y post trasplante; el 14.7% restante correspondió a posibles donadores. En cuanto al origen de las muestras por región afectada, el 94% fueron uñas de pies, y el 6% uñas de las manos (**Figura 1**).

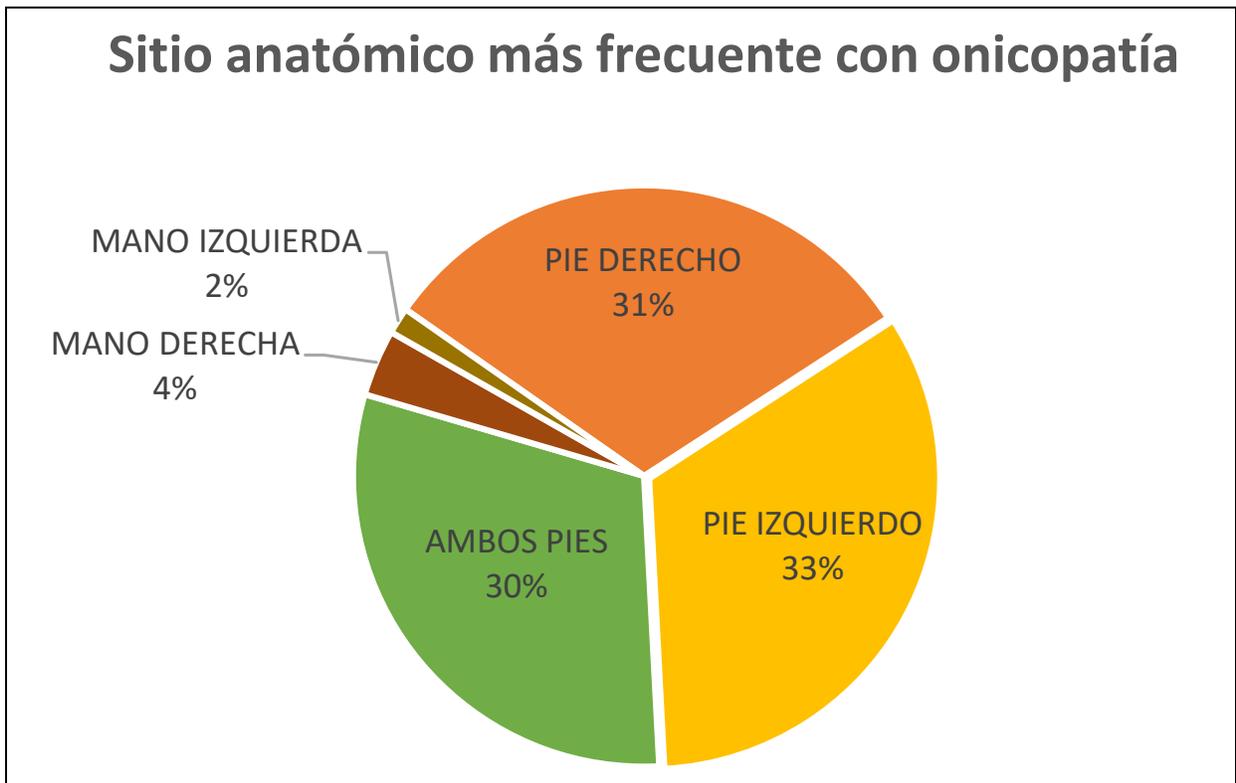


FIGURA 1. Origen y frecuencia del sitio anatómico de las muestras procesadas en este estudio.

EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO

A través del ED se observaron estructuras fúngicas en 96 muestras (**Figura 2**). En el resultado del ED positivo, la cantidad de estructuras fúngicas (filamentos, artroconidios o levaduras) fue anotada con escasas, moderadas o abundantes, dependiendo de la percepción visual (**Figura 3**). En cinco ED se visualizaron estructuras denominadas dermatofitomas, constituidos por una masa de color marrón formada por la agregación de filamentos y artroconidios (**Figura 4**) (Gupta et al., 2022).

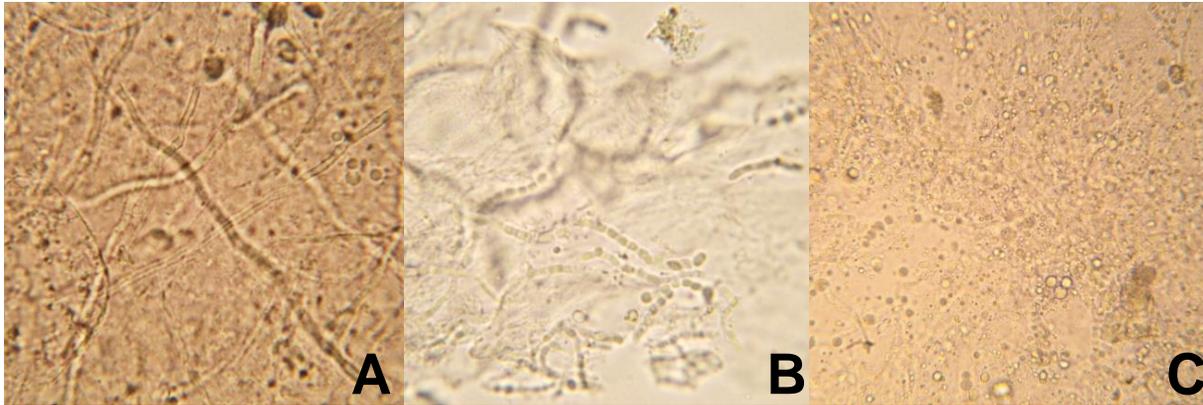


FIGURA 2. Exámenes directos con KOH al 20% de muestras de diferentes pacientes mostrando abundantes estructuras fúngicas. A) Filamentos (100X), B) Arthroconidios (100X), C) Levaduras (100X).

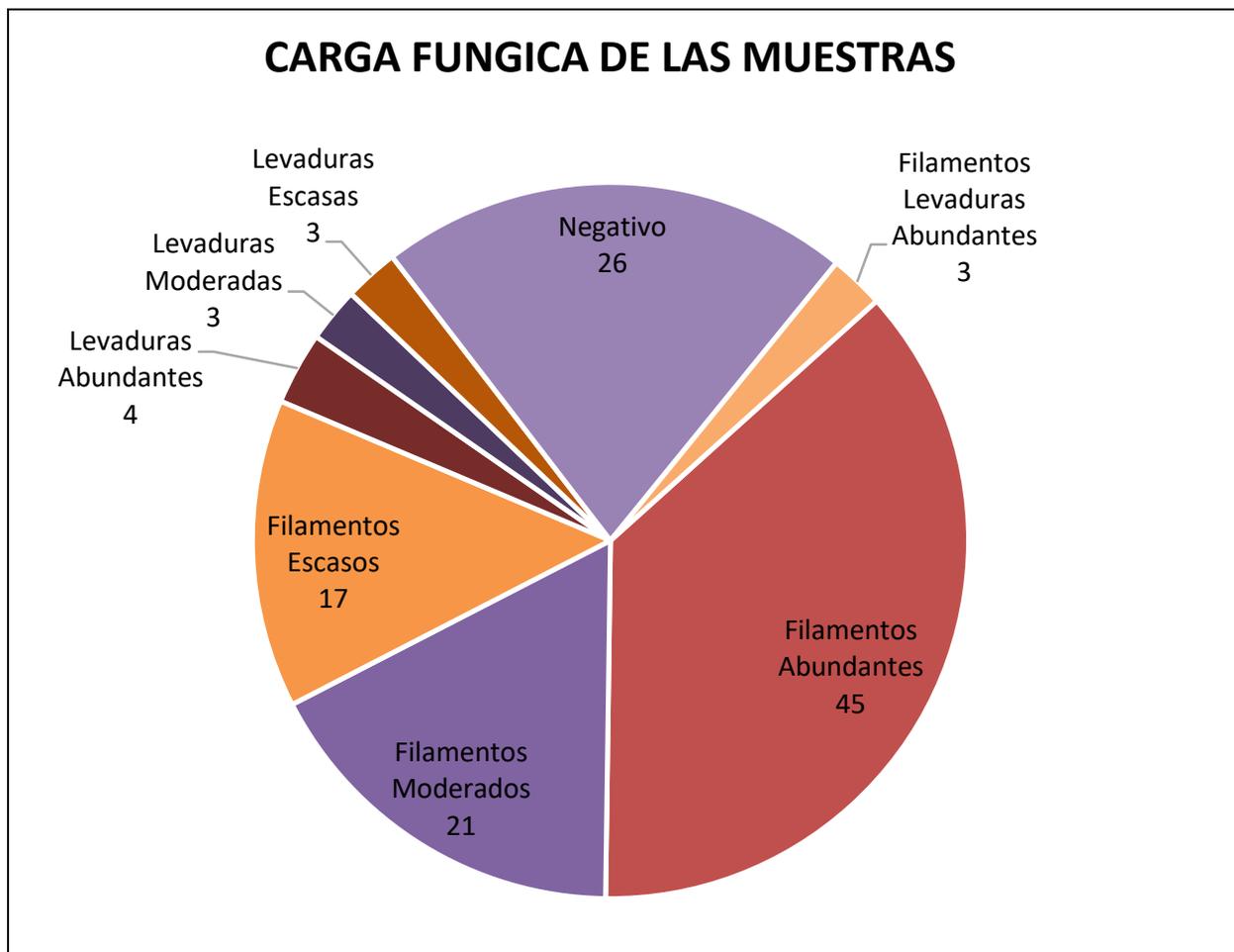


FIGURA 3. Percepción de la carga fúngica observada en el examen directo con KOH de las muestras estudiadas. En 83 muestras se observaron filamentos; en diez muestras se observaron levaduras; y en tres muestras se observaron tanto levaduras como filamentos. En 26 muestras el ED fue negativo.

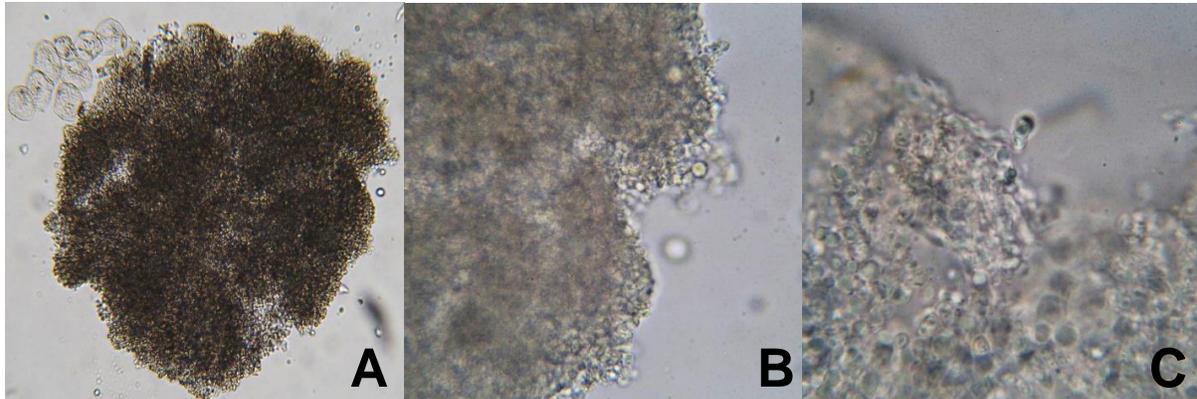


FIGURA 4. Fotos de un Dermatofitoma en ED tomadas a diferentes objetivos. A) 10X; B) 40X; C)100X.

Algunas muestras con ED positivo no tuvieron crecimiento en los medios de cultivo y a 13 muestras no se les logró realizar este examen debido a que se contaba con poca cantidad del material, por lo que se le dio preferencia a realizar los cultivos (**Figura 5**). En 81 muestras el cultivo fue positivo. En 56 crecieron dermatofitos, 12 HFND, ocho levaduras y en cinco hubo crecimiento mixto de dos microorganismos diferentes (HFND/dermatofitos (2), levadura/dermatofito (1), dermatofito/dermatofito (2)).

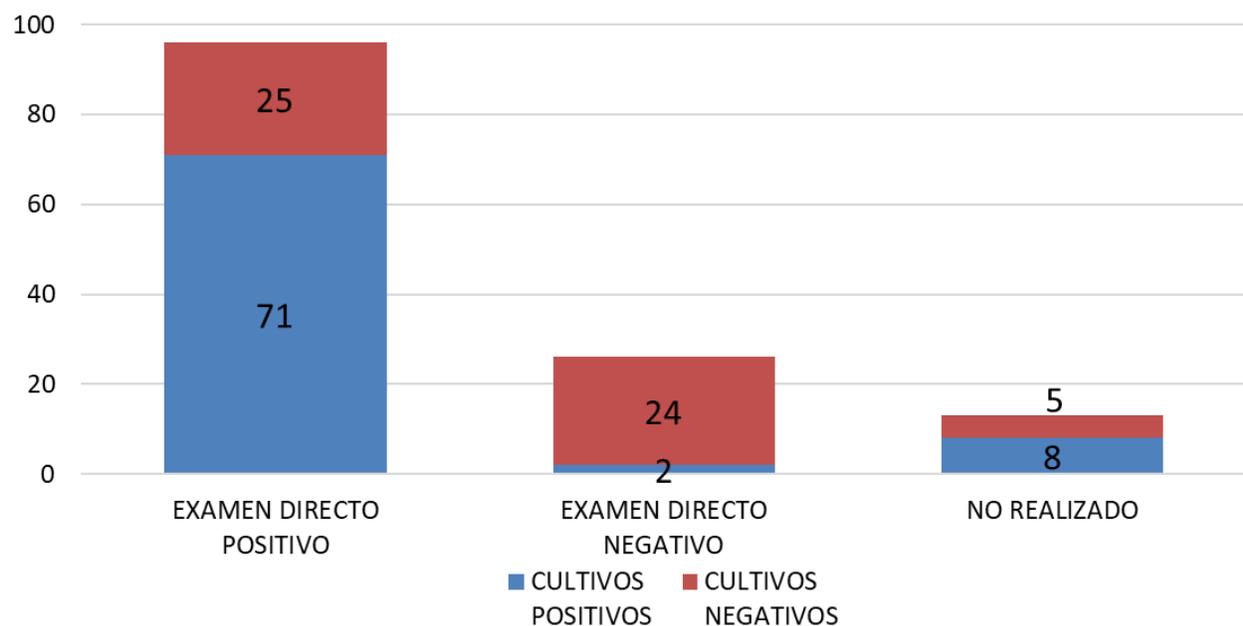


FIGURA 5. Resultado comparativo de los ED y los cultivos. De los 96 ED positivos, 25 muestras tuvieron cultivos negativos. De los 26 ED negativos, dos mostraron cultivo positivo. De las 13 muestras a las que no se les realizó ED la mayoría dieron cultivos positivos.

CULTIVOS DE LAS MUESTRAS

En el caso de los cultivos positivos a dermatofitos, en diez muestras crecieron numerosas colonias en ambos medios de cultivo utilizados; quince muestras tuvieron cultivos en ADSa negativos y ATPa positivos; diez tuvieron cultivos en ADSa positivos y en ATPa negativos. En general se obtuvo un mayor número de colonias en ATPa que en ADSa. En el caso de los HFND, todos los cultivos positivos con significancia para este estudio tuvieron más de 20 colonias por cultivo (**Figura 6C**).

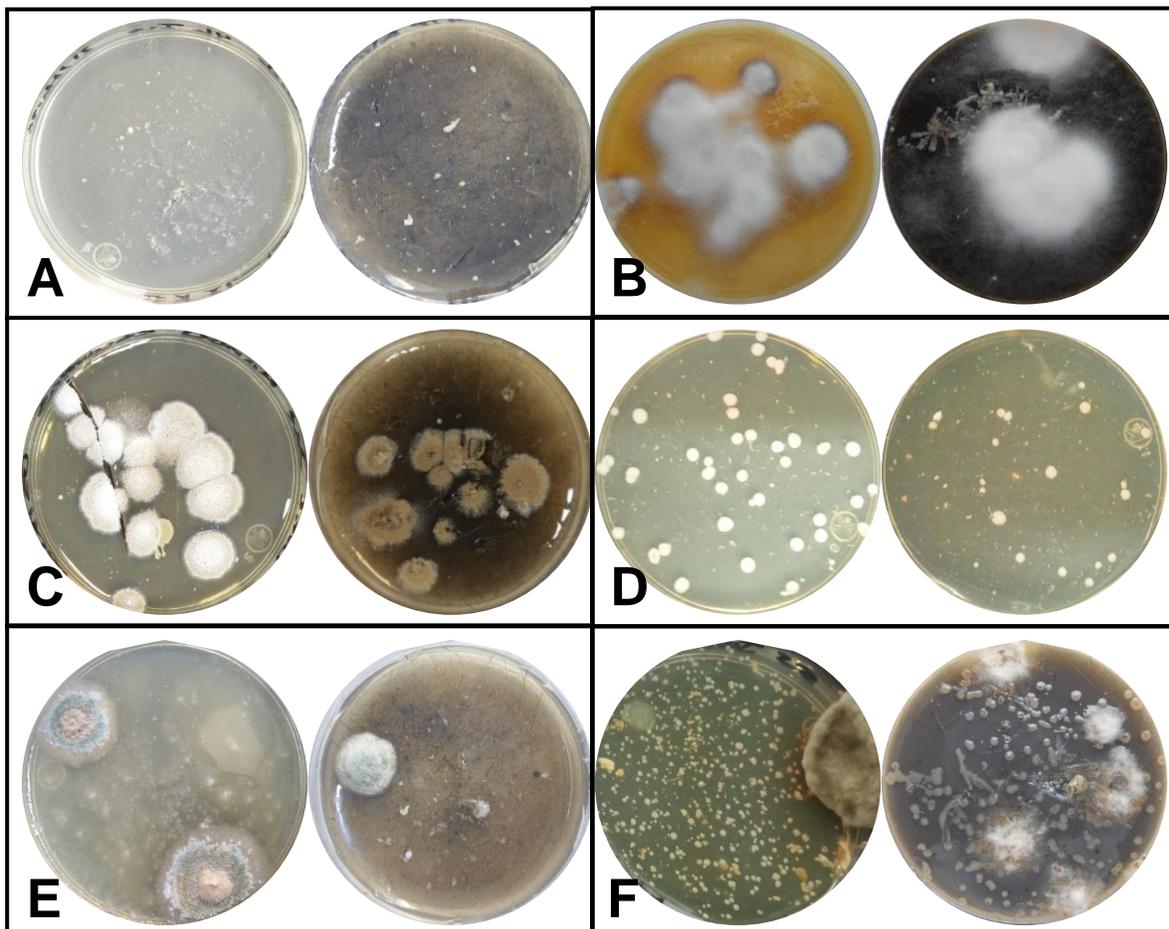


FIGURA 6. Ejemplos de colonias desarrolladas en ADSa (izquierda) y en ATPa (derecha). A) Cultivos negativos (Se observa inóculo de escamas), B) Dermatofitos (*T. rubrum*), C) HFND (*S. brevicaulis*), D) Levaduras (*C. albicans*), E) Contaminación de bacterias y *Aspergillus* sp., F) Cultivos con crecimiento bacteriano.

En un número importante de los cultivos positivos o negativos para hongos, se observó crecimiento bacteriano (**Figura 6F**); en muchos casos desde el ED se observó gran cantidad de estos microorganismos. De los 54 cultivos negativos para hongos, en 20 se

obtuvo una gran cantidad de colonias bacterianas, de las cuales 14 habían dado un ED positivo para hongos y en ocho de ellos se habían visualizado también abundantes bacterias. De las últimas muestras recibidas se decidió hacer identificación de 5 aislados con apariencia distinta y ya vistas en otros cultivos, por medio del sistema VITEK 2 (**Figura 7**).

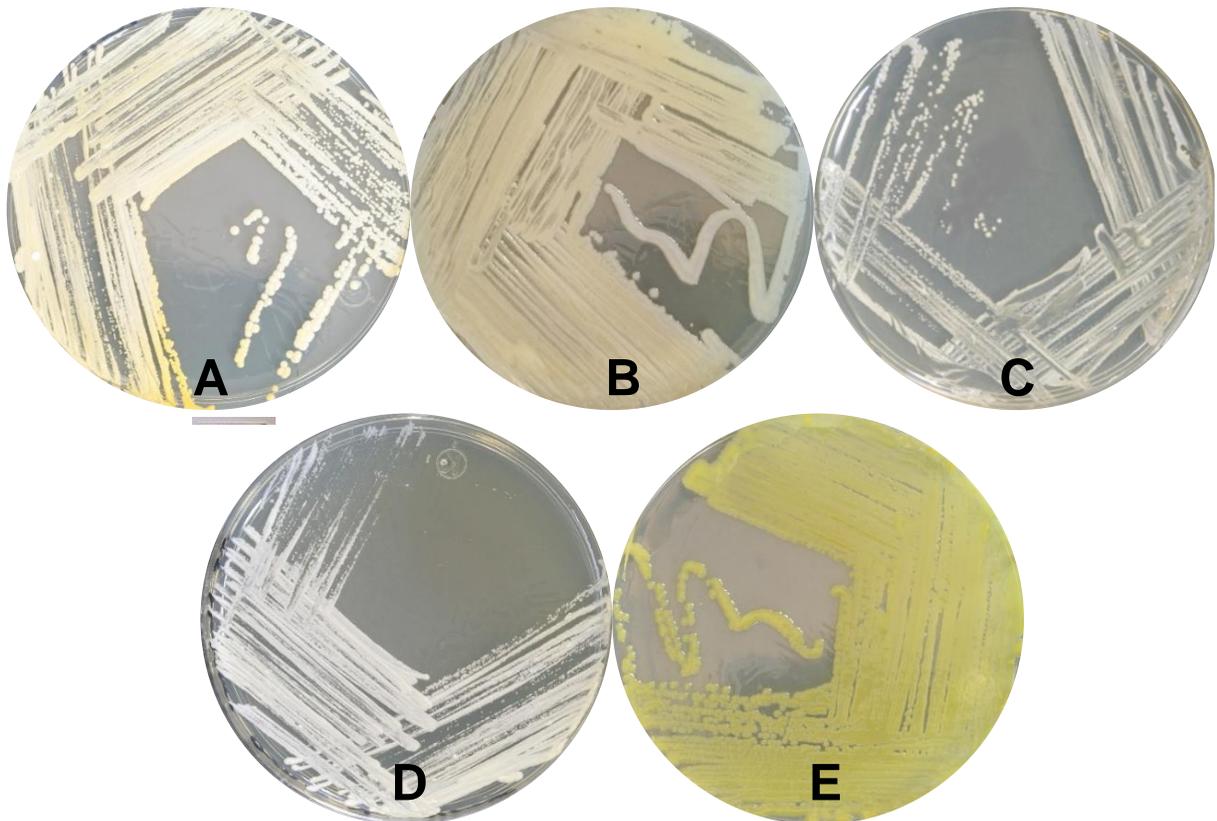


FIGURA 7. Cultivo de bacterias en ADS, recuperadas del primo-cultivo de diferentes muestras e identificadas con VITEK 2. A) *Kocuria kristinae*, B) *Sphingomonas paucimobilis*, C) *Staphylococcus epidermidis*, D) *Streptococcus iniae*, E) No identificada.

Con los resultados obtenidos de ED y cultivo de todas las muestras procesadas, se realizó un análisis estadístico para determinar la Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo de estos procedimientos. Para esto se utilizó la fórmula $VP/(VP+FN)$ para Sensibilidad, $VN/(FP+VN)$ para Especificidad, $VP/(VP+FP)$ para el Valor Predictivo Positivo y $FN/(FN+VN)$ para el Valor Predictivo Negativo, donde VP son los verdaderos positivos, FN los falsos negativos, VN verdaderos negativos y FP los falsos positivos. Los resultados son mostrados en la **Tabla 2**.

TABLA 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ED Y CULTIVO

	POSITIVO	NEGATIVO	S (IC)	E (IC)	VPP (IC)	VPN (IC)
ED positivo (n=96)	96	0	97% (0.95 - 1.00)	100% (1.00-1.00)	100% (1.00-1.00)	92% (0.87-0.97)
ED negativo (n=26)	2	24				
Cultivo Positivo (n=81)	81	0	76% (0.69-0.83)	100% (1.00-1.00)	100% (1.00-1.00)	53% (0.45-0.62)
Cultivo Negativo (n=54)	25	29				

Tabla 2. Análisis estadístico de la sensibilidad (S) y especificidad (E) del ED y del cultivo. El ED presentó una alta sensibilidad y especificidad, con un valor predictivo positivo y negativo (VPP, VPN) alto; para el cultivo la especificidad y el valor predictivo positivo fueron altos mientras que la sensibilidad y el valor predictivo negativo fueron bajos. Todos los porcentajes calculados entraron en el intervalo de confianza (IC).

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Respecto a los dermatofitos, con el aspecto de la colonia y el examen microscópico del primo aislamiento, se determinó de forma preliminar el género y la especie, con los siguientes resultados: *Trichophyton rubrum* (n=50), *Trichophyton tonsurans* (n=7), *Trichophyton interdigitale* (n=1), *Trichophyton sp.* (n=3) y *Epidermophyton floccosum* (n=2). Los HFND identificados fueron: *Scopulariopsis sp.* (n=4), *Aspergillus sp.* (n=2), *Chrysosporium sp.* (n=2), *Fusarium sp.* (n=4), *Penicillium sp.* (n=1). Uno de los HFND no pudo ser determinado por morfología. El porcentaje de identificación de los hongos recuperados del primo-aislamiento determinada solamente por morfología es mostrado en la **Figura 8**.

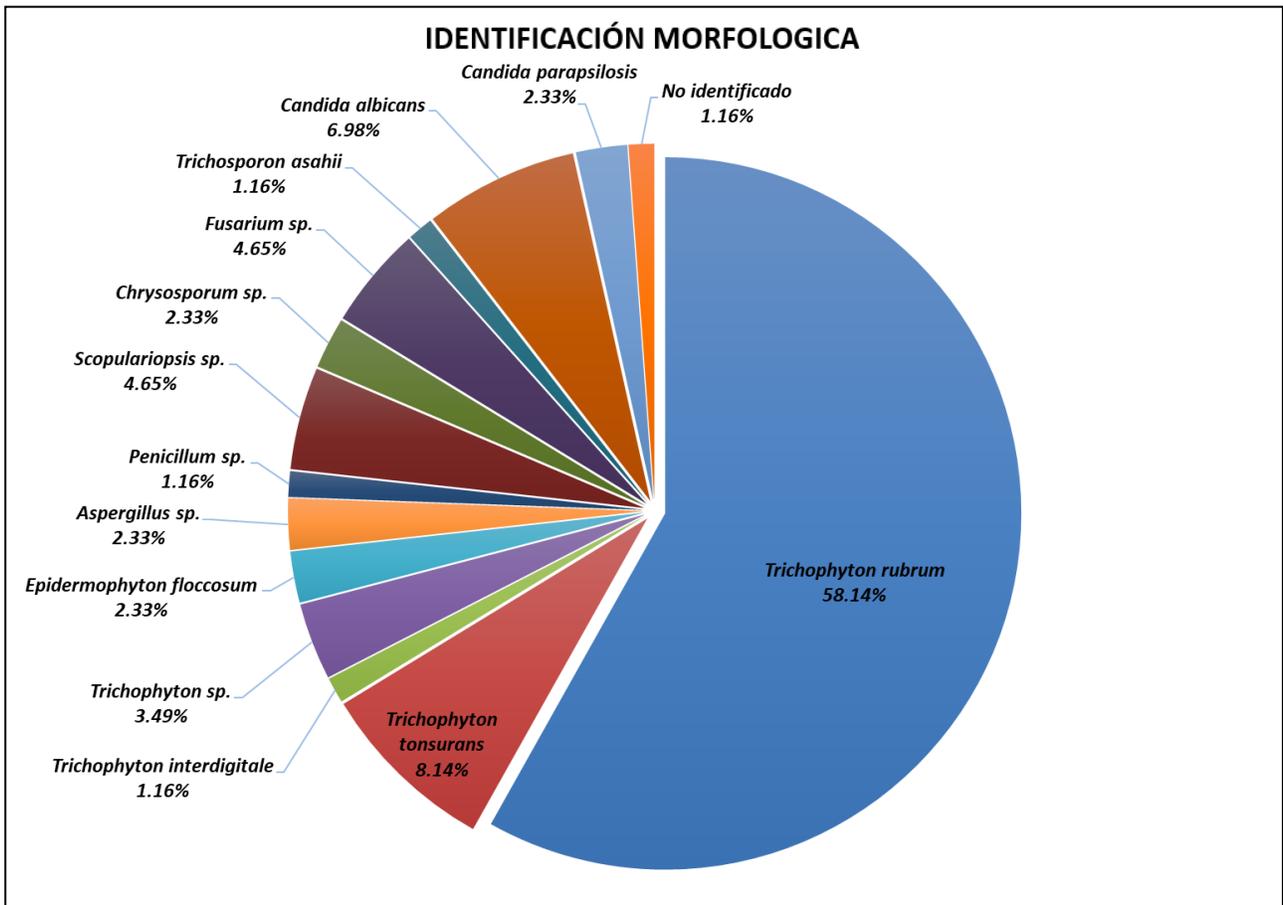


FIGURA 8. Porcentaje de hongos identificados de forma preliminar por sus características macroscópicas y microscópicas. La mayoría de los hongos filamentosos correspondieron a dermatofitos, en particular a *T. rubrum*.

Las levaduras fueron identificadas por cultivo en CHROMagar Candida. De las nueve levaduras aisladas se identificaron *Candida albicans* (n=6) y *Candida parapsilosis* (n=2) (**Figura 9, A y B**). Esta última fue corroborada con el kit API 20C y RapID Yeast Plus, ya que tuvo crecimiento en ADSa y *C. parapsilosis* es sensible a la cicloheximida. Los resultados de estas pruebas no fueron concluyentes, por lo que se optó por la secuenciación para su identificación final (**Figura 9, E y F**). La otra levadura aislada fue identificada como *Trichosporon asahii* utilizando el sistema API 20C que se basa en la asimilación de 19 sustratos después de 72 hrs de incubación (**Figura 9, C y D**).

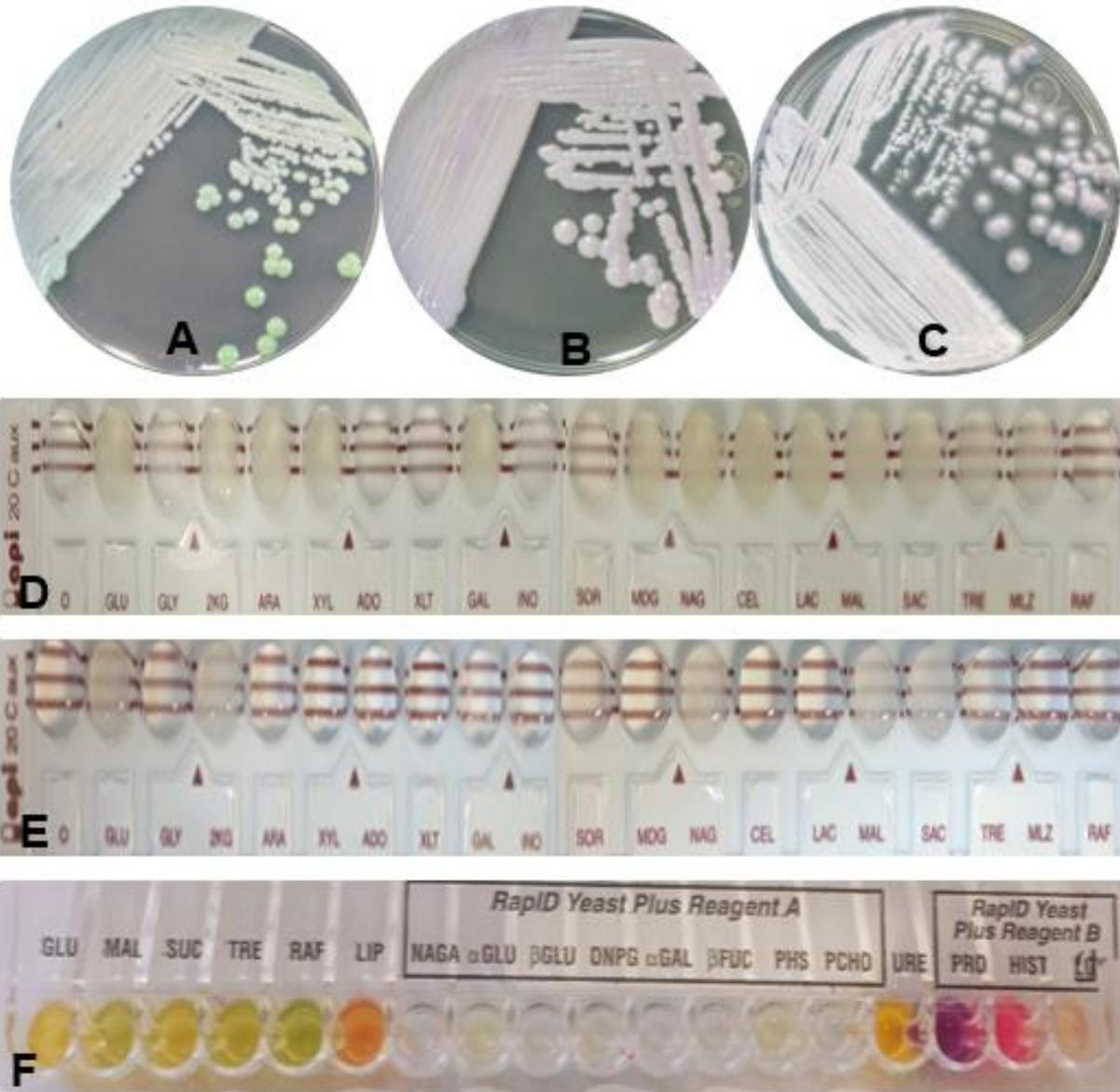
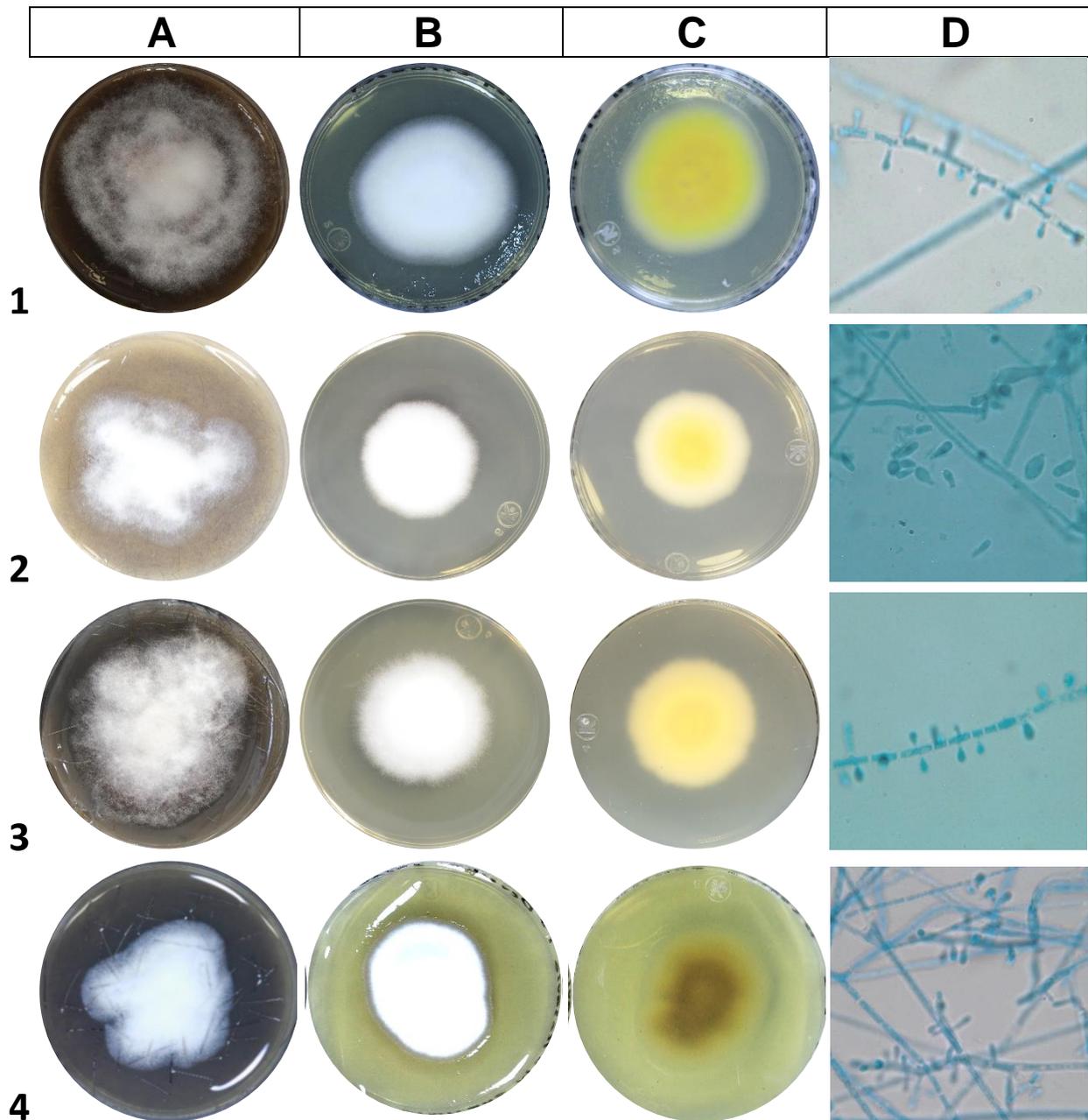


FIGURA 9. Levaduras identificadas por CHROMagar Candida (A, B y C), por API 20C (D y E) y por Rapid Yeast Plus panel (F). A) *C. albicans*; B) Posible *C. parapsilosis*; C) *T. asahii*; D) *T. asahii*, 2744734 (%id 99.9%), E) Posible *C. parapsilosis* 2100130 (No concluyente); F) Posible *C. parapsilosis* (No concluyente).

Los cultivos de los dermatofitos realizados para observar morfología macroscópica alcanzaron un diámetro promedio de 3.6 cm tanto en ADSa como en ATPa después de 15 días de incubación a 28°C. En la morfología microscópica de los dermatofitos se observó micelio hialino, septado y ramificado.

Las colonias de *T. rubrum* en ambos medios presentaron un color blanco, con el centro ligeramente elevado, textura algodonosa, con margen regular a excepción de algunos

cultivos de ATPa en los que debido a los cabellos del agar el margen fue irregular. En ADSa el reverso de la colonia mostró pigmento color amarillo y en algunos cultivos pigmento rojo vino. La morfología microscópica mostró microconidios piriformes en diferente abundancia, a ambos lados de la hifa, macroconidios ausentes y en algunos casos se observaron artroconidios (**Figura 10**).



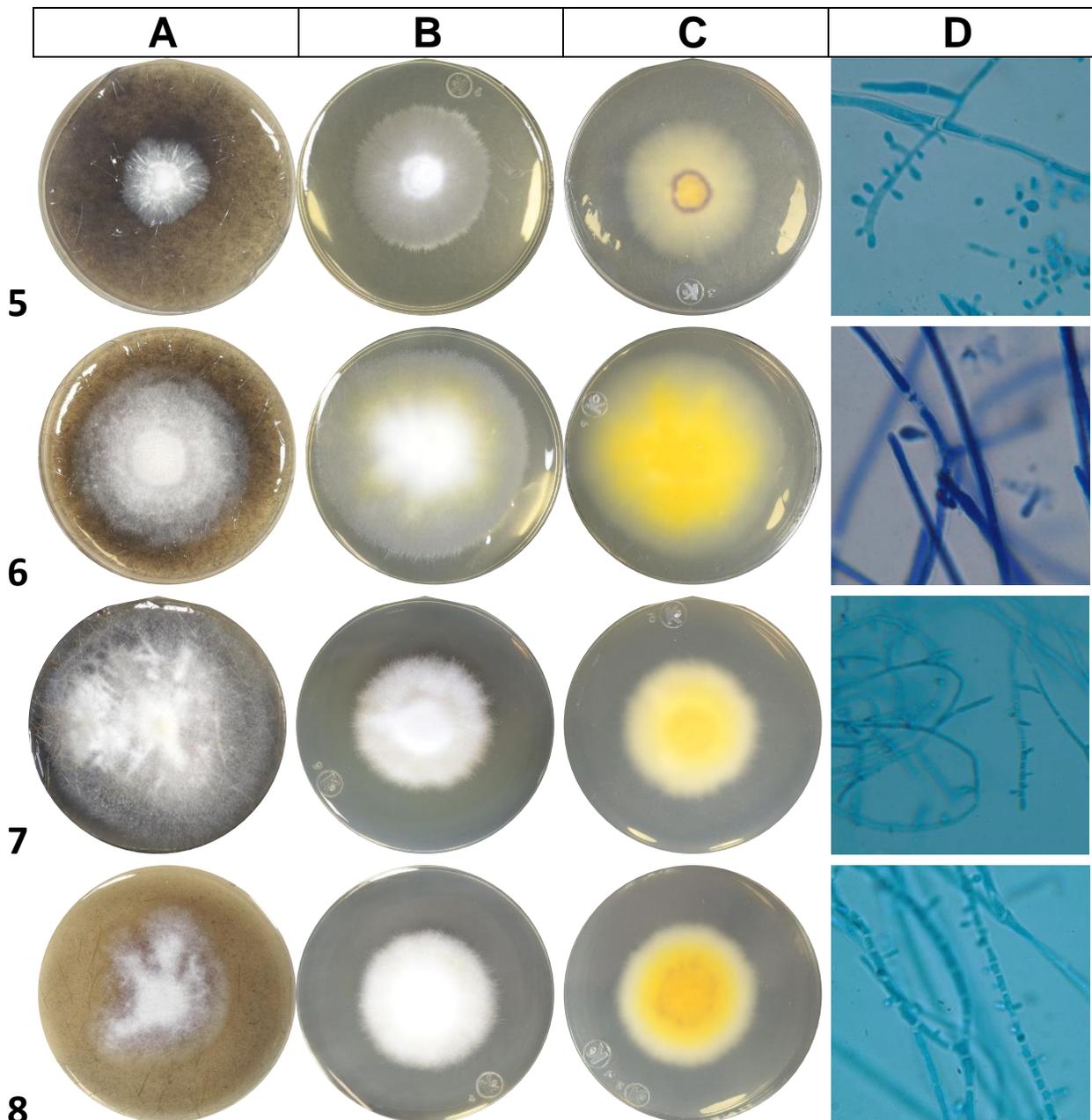


FIGURA 10. Morfología macroscópica y microscópica de diferentes aislados de *Trichophyton rubrum*. Columna A: cultivo en ATPa; B: anverso en ADSa; C: reverso en ADSa; D: microcultivo en agar Borelli (100X). Las Filas 1-8 corresponden a los aislados 009- 2, 011, 016, 026-1, 027, 028-2, 033, 036 respectivamente. Con excepción de la colonia de la Fila 1 cuyo color es ligeramente grisáceo, las demás colonias son blancas, algodonosas, en ATPa. El ADSa indujo colonias algodonosas de color blanco, y en el reverso predomina el pigmento amarillo; algunos aislados formaron pigmento rojo vino. Microscópicamente se observa micelio hialino, tabicado, con conidios piriformes dispuestos a ambos lados de la hifa; el número de conidios es variable en cada aislado.

La morfología de *T. interdigitale* fue de margen regular y color blanco en los dos medios de cultivo utilizados; en ADSa se observó pigmento amarillo y la textura difirió entre los aislados siendo algodonosa o pulverulenta. Microscópicamente mostró abundantes

microconidios y escasos macroconidios en forma de mazo, de paredes lisas y delgadas, con tres a seis segmentos (**Figura 11**).

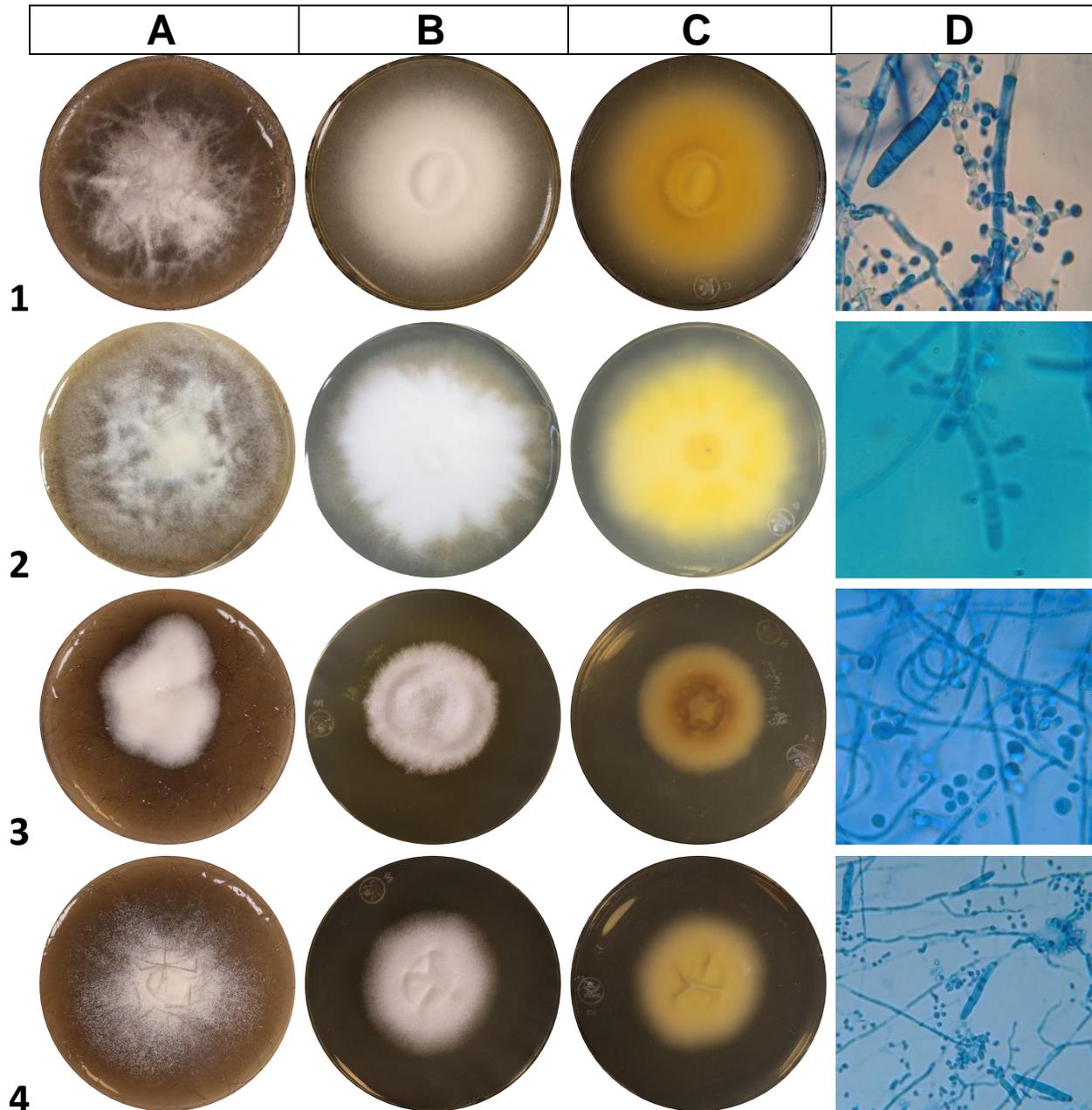


FIGURA 11. Morfología macroscópica y microscópica de diferentes aislados de *T. interdigitale*. Columna A: cultivo en ATPa; B: anverso en ADSa; C: reverso en ADSa y D: microcultivo en agar Borelli (100X). Filas 1 – 4, corresponden a los aislados 008-2, 019-2, 064 y 070 respectivamente. El tamaño y el aspecto de la colonia fueron variables, desde blanca vellosa y plana, hasta casi lanosa y elevada en el centro. La colonia de la fila 4 se observó una colonia pulverulenta. Fue evidente la producción de pigmento amarillo (filas 1, 2) o rojo vino (fila 3). Microscópicamente se observaron conidios redondos o cilíndricos. Algunas colonias desarrollaron macroconidios (fila 1 y 4), y algunas mostraron hifas en espiral (fila 3).

En *E. floccosum* las colonias fueron blancas, algodonosas a aterciopeladas, con margen regular y con pliegues en el centro, muy notables en ambos medios de cultivo. Microscópicamente se observaron abundantes macroconidios en forma de mazo, con dos a cuatro septos, individuales y en racimo, de pared gruesa (**Figura 12**).

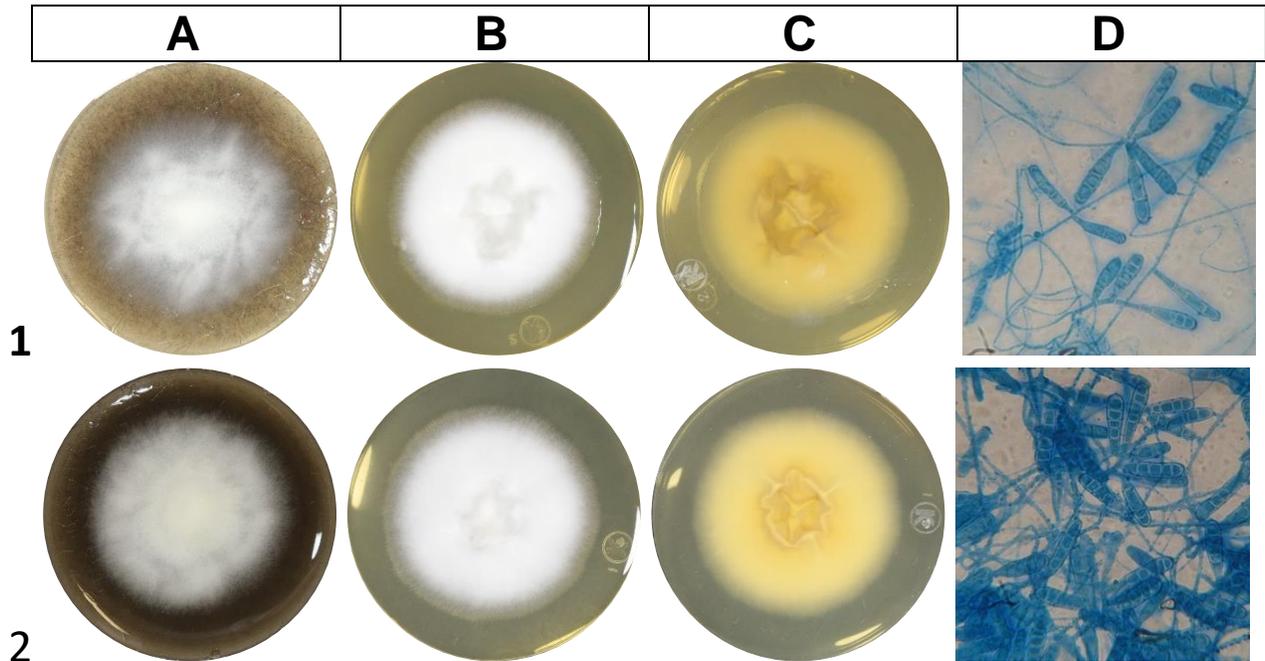


FIGURA 12. Morfología macroscópica y microscópica de dos aislados de *E. floccosum*. Columna A: cultivo en ATPa; B: anverso de ADSa; C: reverso de ADSa y D: microcultivo en agar Borelli (100X). La Fila 1 corresponde al aislado 062-1 y la fila 2 aislado 062-2 (ambos del mismo paciente). En ambos aislados las colonias A y B se observan de color blanco, algodonosas, de margen regular y centro plegado; C: no se observa pigmento; D: microscópicamente se observaron hifas hialinas, tabicadas, con abundantes macroconidios en forma de mazo.

La descripción de los HFND que se hace a continuación incluye el nombre con el que fueron identificados por PCR-secuenciación.

Los cultivos de *Spiromastigoides warcupii* en ATPa y ADSa alcanzaron un diámetro promedio de 2.6 cm después de 15 días de incubación a 28°C. En ATPa la colonia fue blanca, irregular, con aspecto lanoso y pigmento vino difuso en el medio; en ADSa la colonia fue blanca, regular, con una elevación en anillo y pliegues en el borde, su consistencia fue membranosa y su aspecto polvoso, al reverso se distingue pigmento marrón claro. Microscópicamente se observaron hifas hialinas y septadas. Conidios curvos similares a los de *Keratinophyton*, sobre protuberancias cortas (**Figura 13**).

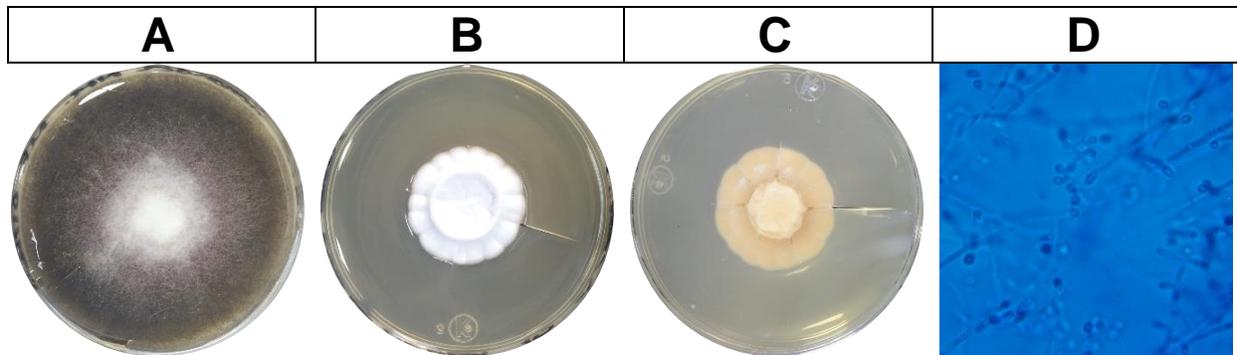


FIGURA 13. Morfología macroscópica y microscópica del aislado 003-2 identificado como *Spiromastigoides warcupii*. La columna A: corresponde al cultivo en ATPa; B: anverso ADSa; C: reverso ADSa y D: microcultivo en agar Borelli (100X).

La morfología macroscópica de *Keratinophyton hubeiense* se realizó en Agar Extracto de Malta de Levadura (MEYA), donde el diámetro de la colonia llegó a 3 cm después de 7 días de cultivo a 28°C, el color de esta fue blanco, de margen regular y aspecto polvoso/granuloso; en ADSa la colonia alcanzó un diámetro de 4 cm, de color blanco, algodonosa, con una depresión y rugosidades en el centro y pigmento amarillo al reverso. Microscópicamente se observó micelio hialino, septado, con conidios piriformes con bases truncadas intercalares y terminales de paredes lisas (**Figura 14**).

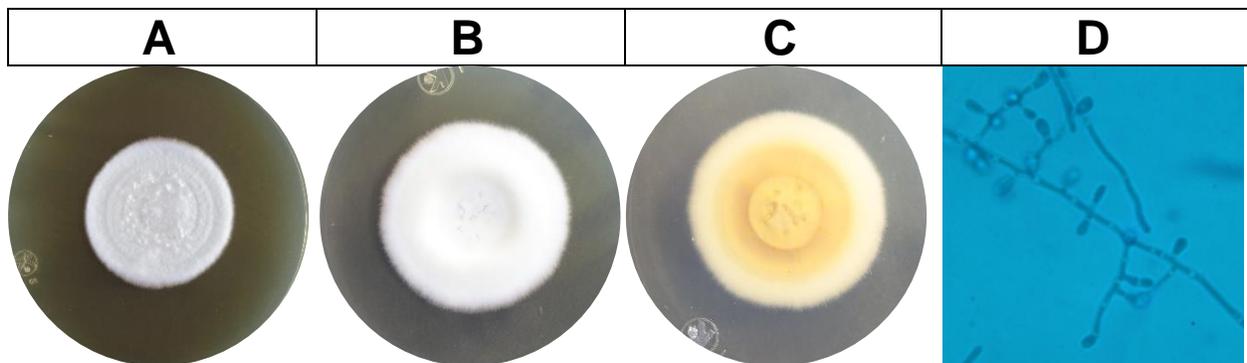


FIGURA 14. Morfología macroscópica y microscópica del aislado 015 identificado como *Keratinophyton hubeiense*. La columna A: cultivo en MEYA; B: anverso ADS; C: reverso ADS y D: microcultivo en agar Borelli (100X).

La morfología macroscópica de *Botryotrichum piluliferum* se determinó en Agar Borelli, el diámetro de la colonia fue de 4.8 cm después de 7 días de cultivo a 28°C, con aspecto lanoso, margen regular y color blanco; en ADSa la colonia tuvo un diámetro de 3.9 cm, de color blanco, margen regular y borde ligeramente ondulado, aspecto polvoso y pigmento amarillo ligeramente difundido en el medio; Microscópicamente se observan conidios globosos, hialinos, ligeramente rugosos (**Figura 15**).



FIGURA 15. Morfología macroscópica y microscópica del aislado 032-1 identificado como *Botryotrichum piluliferum*. La columna A: cultivo en Borelli; B: anverso ADSa; C: reverso ADSa y D: microcultivo en agar Borelli (100X).

La colonia de *Aspergillus versicolor* en APD alcanzó un promedio de 1.5 cm de diámetro después de 14 días de incubación a 28°C, de color blanco, algodonosa y de margen regular. En ADS alcanzó un diámetro promedio de 2.5 cm, el color en la periferia de colonia se mantuvo blanco, mientras que en el centro se observa de color verde; Microscópicamente se observan hifas hialinas septadas, con cabezas aspergílares, conidióforos largos cenocíticos, vesículas esféricas y dos series de fiáldes; los conidios son redondos equinulados (**Figura 16**).

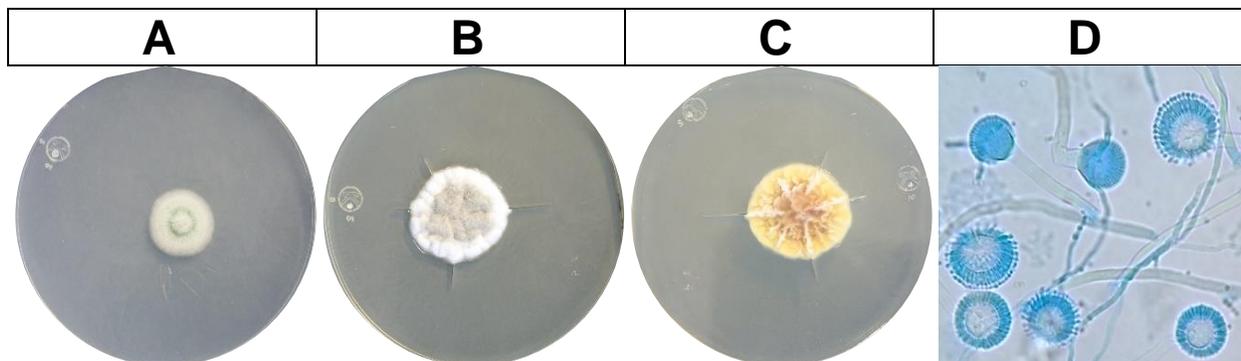


FIGURA 16. Morfología macroscópica y microscópica del aislado 051 identificado como *Aspergillus versicolor*. A: cultivo en APD; B: anverso ADS; C: reverso ADS y D: microcultivo en ADS (100X).

La morfología del género *Scopulariopsis* fue ligeramente diferente en cada especie. Las colonias de *S. brevicaulis* y *S. alboflavescens* en ADS alcanzaron un promedio de 4.5 cm de diámetro después de 7 días de incubación a 28°C, con margen regular, de aspecto polvoso y color crema; en ADSa alcanzó un diámetro promedio de 4 cm, aspecto polvoso y cerebriforme y consistencia membranosa. El color de la colonia de *S. brevicaulis* fue blanco-crema, mientras que las de *S. alboflavescens* fueron marrón

claro. Microscópicamente se observó micelio septado y hialino; células conidiógenas (anélides) formando conidios globosos a ovoides, de pared gruesa y equinulados, con un promedio de largo de 7 μm y un ancho de 5.2 μm en los cultivos de *S. brevicaulis* y un largo de 6.6 μm y ancho 5.8 μm en los cultivos de *S. alboflavescens* (**Figura 17**).

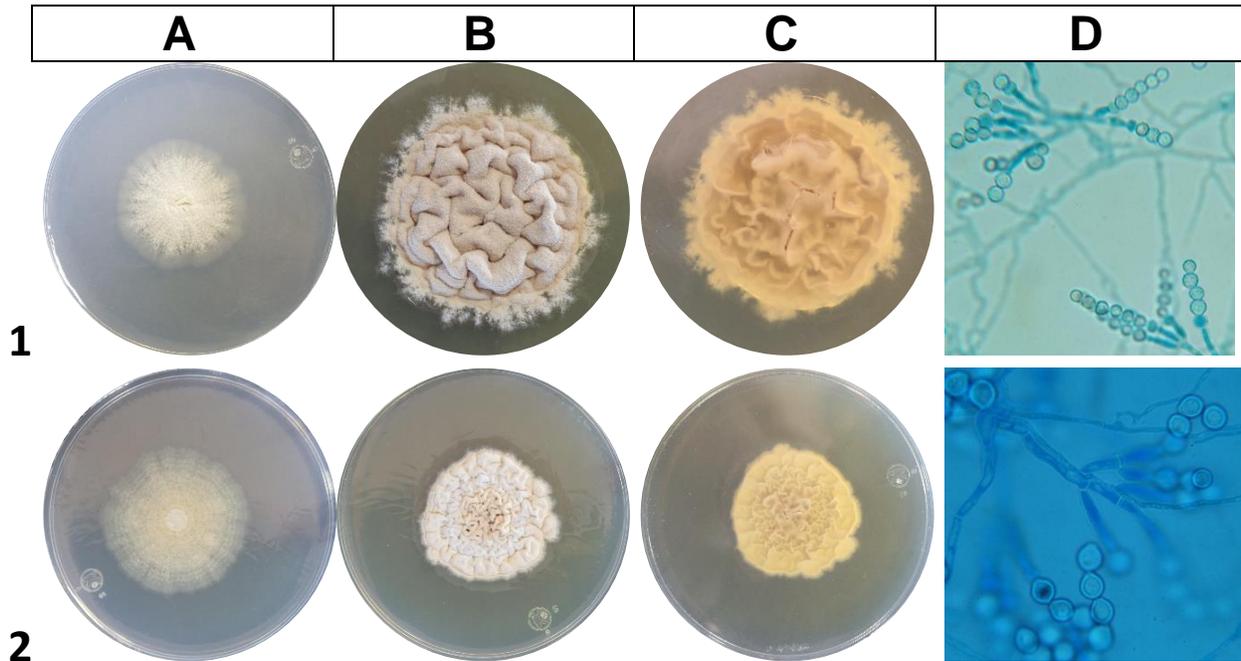


FIGURA 17. Morfología macroscópica y microscópica de diferentes aislados de *Scopulariopsis*. Fila 1 corresponde al aislado 021 de *Scopulariopsis alboflavescens*, fila 2 aislado 009-1 de *Scopulariopsis brevicaulis*. La columna A: cultivos en ADS; B: anverso ADSa; C: reverso ADSa y D: microcultivo en ADSa (100X).

La morfología macroscópica del género *Fusarium* fue similar en las dos especies aisladas. En Agar Harina de maíz la colonia de *Fusarium equiseti* alcanzó un diámetro de 4.5 cm después de 7 días de incubación a 28°C; de aspecto algodonoso, color blanco y de margen regular; en ADS la colonia tuvo un diámetro de 5 cm, de superficie irregular, color crema y de aspecto algodonoso. *Fusarium oxysporum* en Agar Harina de maíz formó una colonia de 4.9 cm de diámetro, color blanco, margen regular y aspecto pulverulento; en ADS el diámetro fue de 4 cm, de aspecto algodonoso, color blanco y margen regular. El estudio microscópico de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium equiseti* mostró conidios en esporoquios de longitud variable, falciformes, de pared lisa y delgada, hialinos y con un tamaño promedio de 6.58 μm de largo y 1.8 μm de ancho (**Figura 18**).

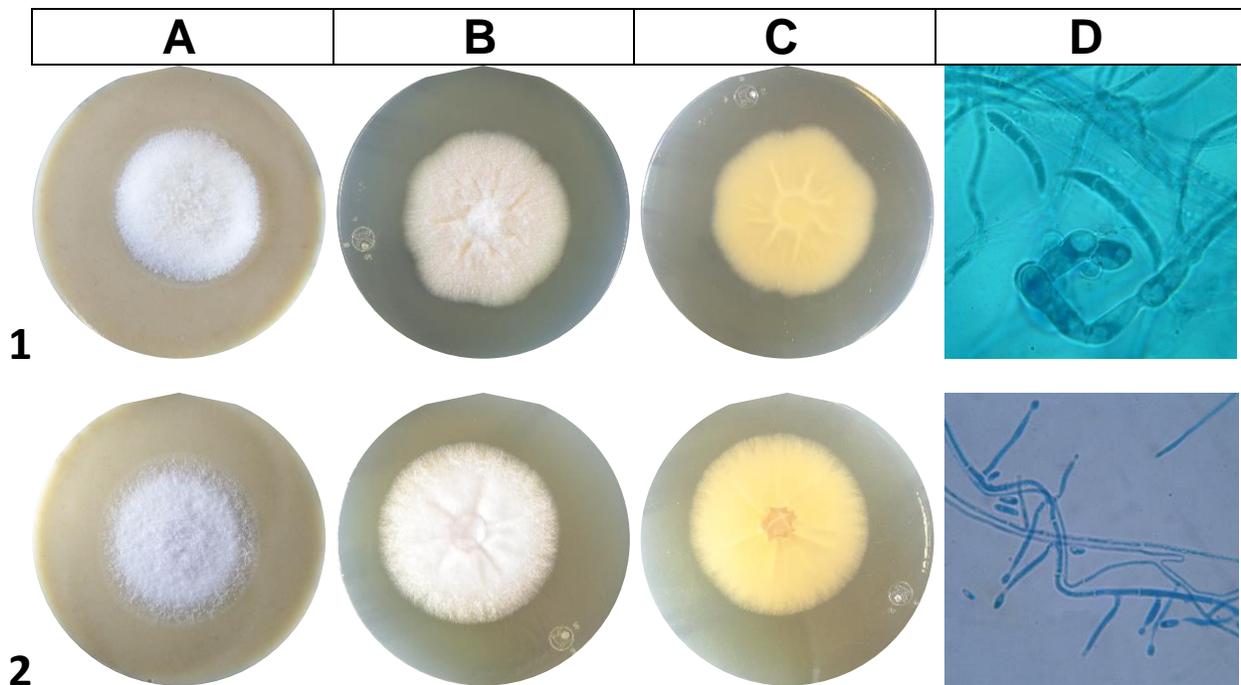


FIGURA 18. Morfología macroscópica y microscópica de diferentes aislados de *Fusarium*. Fila 1 corresponde al aislado 040-2 de *Fusarium equiseti*, fila 2 aislado 049-2 de *Fusarium oxysporum*. La columna A: cultivos en Agar Harina de Maíz; B: anverso en ADS; C: reverso ADS y D: microcultivo en agar ADS (100X; 40X).

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Se extrajo el ADN de 62 aislados (**Anexo 3, Figura 19**). De la mayoría de aislados se logró obtener un ADN de alto peso molecular y muy poco barrido, por lo que lo consideramos de buena calidad y adecuado para realizar la amplificación por PCR de las regiones pre-establecidas. Para todos los aislados se amplificó un fragmento de las regiones ITS y LSU. Para los hongos de los géneros *Scopulariopsis spp.* y *Penicillium spp.* solo se usaron los cebadores para LSU. Para los dermatofitos se amplificó también el gen de la β -tubulina. En la electroforesis se observaron fragmentos de amplificación nítidos de aproximadamente 850 pb para ITS (**Figura 20**), de 1100 pb para LSU (**Figura 21**) y de 750 pb para β -tubulina (**Figura 22, Anexo 4**). Las secuencias fueron comparadas con las secuencias almacenadas en el GenBank, considerando que la identidad fuera >99% para la identificación de especies.

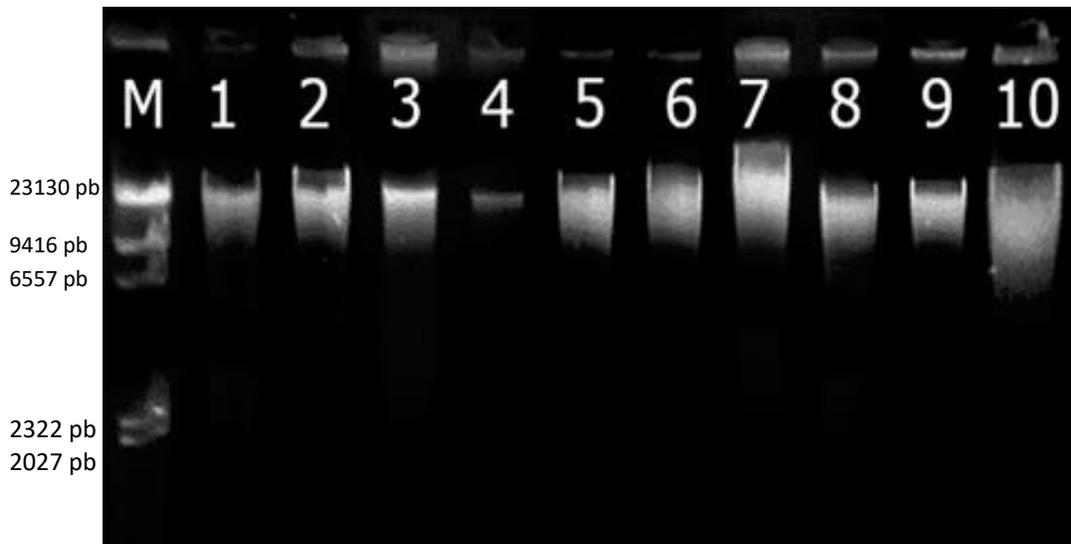


FIGURA 19. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN mediante fenol/cloroforno de algunos aislados de dermatofitos. M representa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 011, 030, 041, 047, 016, 026-2, 028-7, 044-1, 044-2 y 050-2 respectivamente.

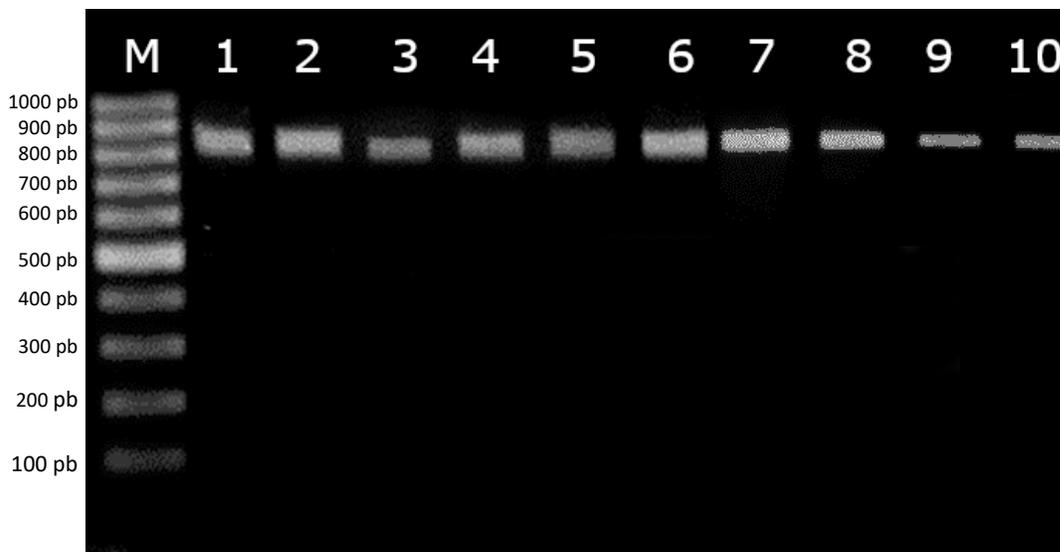


FIGURA 20. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región ITS (850 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 050-1, 058-2, 064, 068-1, 068-2, 070, 007-1, 028-7, 072-3 y 075 respectivamente.

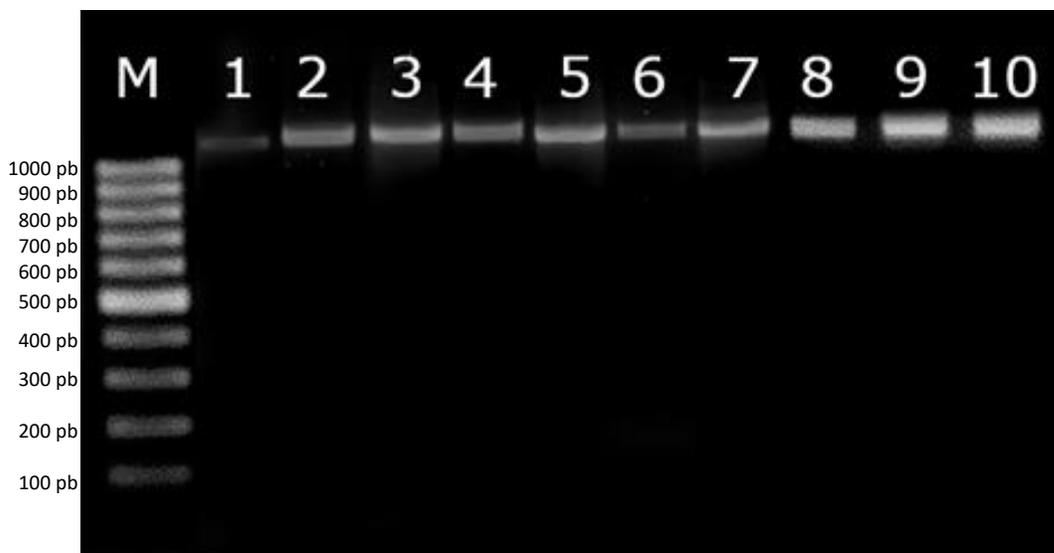


FIGURA 21. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región LSU (1100 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 010-2, 019-1, 029-1, 035, 062-1, 046, 050-2, 064, 068-1, 068-2.

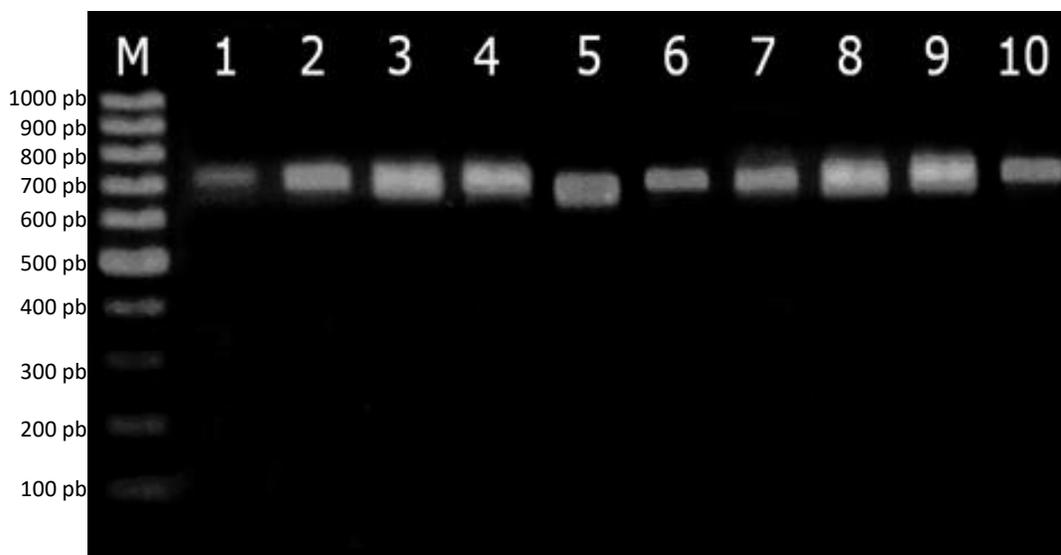


FIGURA 22. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región β -TUB (750 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 003, 007-1, 019-1, 019-2, 034-4, 044-1, 050-1, 048-1, 062-1, 068-1.

La identificación molecular de algunos dermatofitos difirió con la identificación previa basada en la morfológica: cuatro aislados clasificados como *Trichophyton rubrum*, molecularmente correspondieron a *Trichophyton interdigitale*; de siete aislados morfológicamente clasificadas como *Trichophyton tonsurans*, cinco correspondieron a *Trichophyton rubrum* y dos a *Trichophyton interdigitale*; y dos *Candida parapsilosis*

identificadas por CHROMagar Candida, finalmente fueron identificadas como *Candida haemulonii*.

Se identificaron a nivel de especie *Trichophyton rubrum* (n=3), *Spiromastigoides warcupii* (n=1), *Keratinophyton hubeiense* (n=1), *Scopulariopsis brevicaulis* (n=2), *Scopulariopsis alboflavescens* (n=2), *Aspergillus versicolor* (n=2), *Penicillium chrysogenum* (n=1), *Fusarium oxysporum* (n=3), *Fusarium equiseti* (n=1); también se identificó el microorganismo que no se pudo reconocer morfológicamente como *Botryotrichum piluliferum* (n=1) (**Figura 23**).

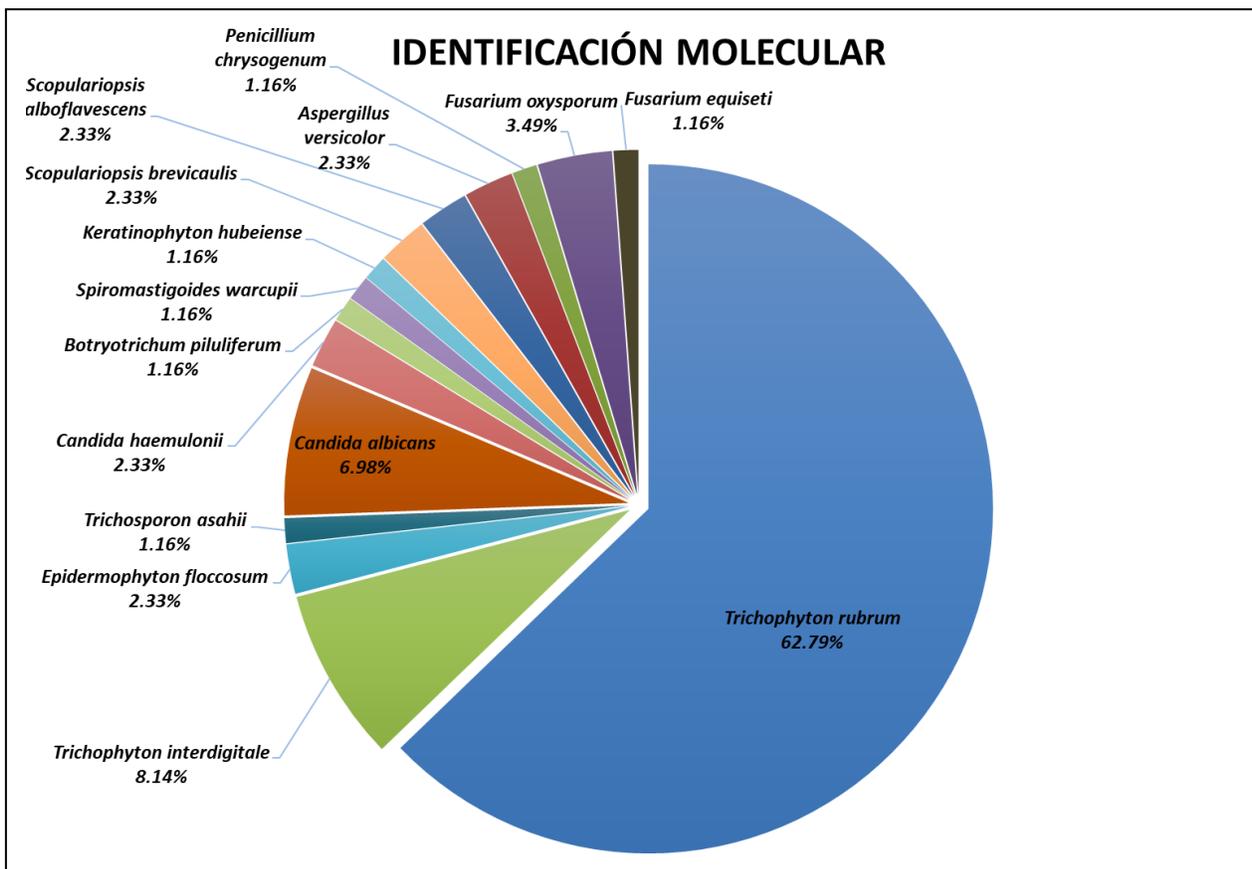


FIGURA 23. Porcentaje de especies de dermatofitos, levaduras y HFND identificadas mediante PCR-secuenciación.

Después de la identificación molecular de todos los hongos aislados, se observó que, en los tres grupos de pacientes, los dermatofitos fueron los principales agentes etiológicos de onicomicosis con una frecuencia del 39%. De los dos pacientes que se tuvieron muestras antes y después del trasplante, a pesar del tratamiento antifúngico, se aisló el mismo microorganismo en los dos momentos. De un paciente pre-trasplante

se obtuvo una infección mixta por dos dermatofitos *T. rubrum* y *E. floccosum*. En los tres grupos se observaron infecciones mixtas entre un dermatofito (*T. rubrum*) y diferentes HFND: *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium equiseti*, *Botryotrichum piluliferum*, y de un donador se aisló *T. rubrum* y la levadura *Trichosporon asahii* (Tabla 3).

TABLA 3. GRUPOS Y FRECUENCIA DE HONGOS CAUSANTES DE ONICOMICOSIS EN PACIENTES EN PROTOCOLO DE TRASPLANTE RENAL

Organismo aislado	Pre- Trasplante	Post- Trasplante	Donador	Frecuencia
Dermatofitos	13	14	3	39%
HFND	5	1	1	9%
Levaduras	2	1	0	4%
Mixto	2	3	2	9%
Negativo	14	11	5	39%
Total	36	30	11	100%

En relación con el sexo del paciente, la onicomicosis predominó en los pacientes masculinos, con un total de 64.4% pacientes positivos; los dermatofitos fueron los agentes causantes predominantes, seguido de las infecciones mixtas y después los HFND. La única levadura aislada en un paciente masculino fue en una infección mixta de *T. rubrum/T. asahii*.

En el caso de las mujeres, el 56.3% de las 32 pacientes incluidas en este estudio, fueron positivas a onicomicosis; igual que en los pacientes hombres, los dermatofitos fueron los principales agentes causales, seguidos de los HFND y las infecciones mixtas. En dos pacientes se aislaron levaduras del género *Candida*. Los dos pacientes a los cuales se les analizaron muestras tanto antes como después del trasplante fueron del sexo femenino, aislándose en un paciente *C. albicans* en todas las muestras; en la otra paciente se obtuvo una infección mixta de *T. rubrum/S. alboflavescens* antes del trasplante y después solo se aisló *T. rubrum* (Tabla 4).

TABLA 4: GRUPOS DE HONGOS IDENTIFICADOS POR SEXO DE PACIENTE

Organismo aislado	Masculino	Femenino
Dermatofitos	20	10
HFND	4	3
Levaduras	0	3
Mixto	5	2
Negativo	16	14
Total	45	32

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La filogenia de los dermatofitos se realizó con cada locus y con la alineación concatenada final que incluyó 53 aislados y constó de 1886 caracteres, 660 para ITS, 822 para LSU y 404 para TUB. Los árboles se construyeron considerando como base el género *Trichophyton* y como género externo *Epidermophyton* y se utilizaron dos cepas de referencia por cada especie. Los árboles individuales de los tres locus y el árbol concatenado proporcionaron una resolución satisfactoria que distinguió tres clados con alto grado de robustez correspondientes a *E. floccosum*, *T. rubrum* y *T. interdigitale*. (Figura 24-25-26-27).

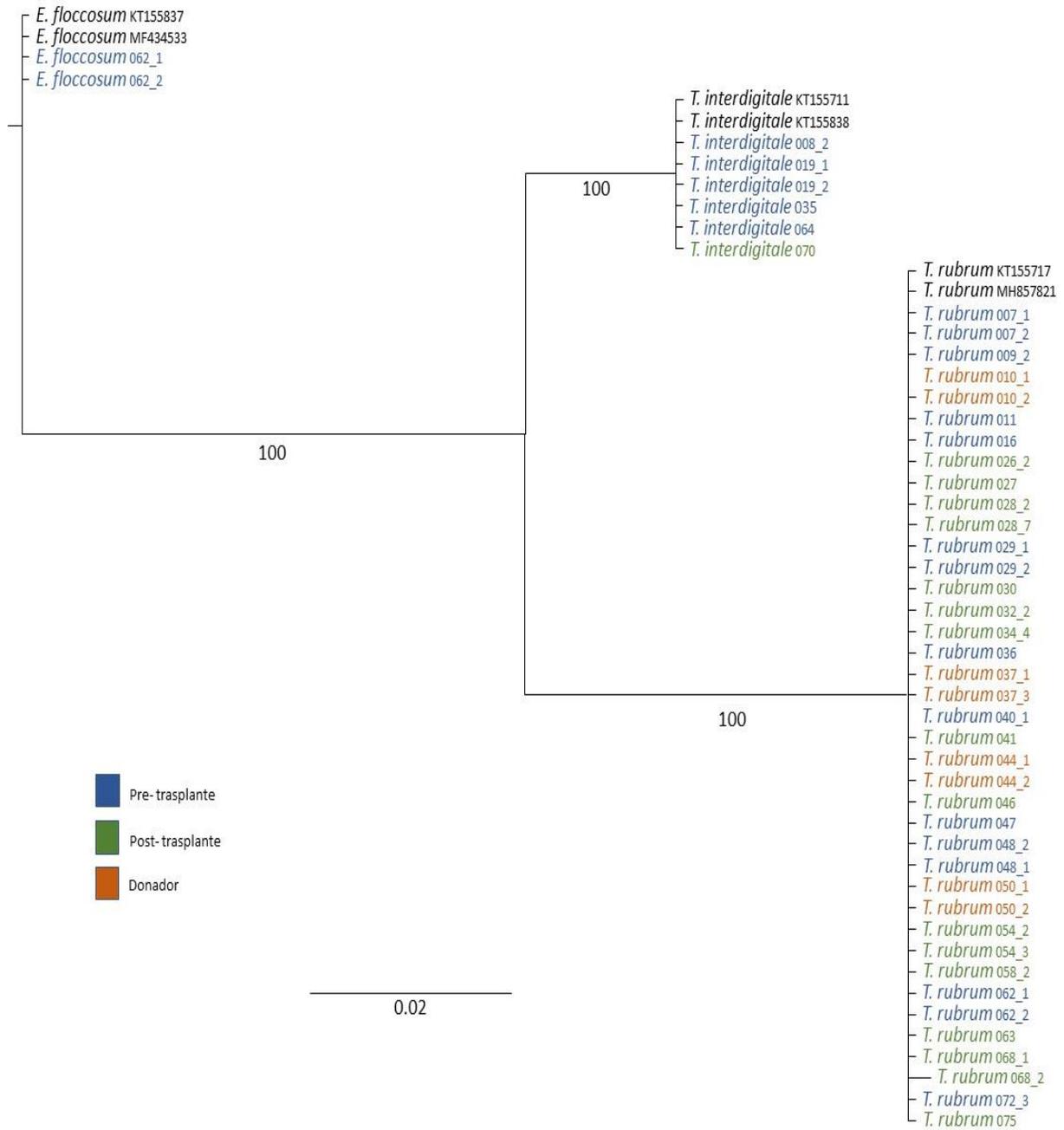


FIGURA 24. Árbol filogenético de dermatofitos construido a partir de la alineación de 53 secuencias de ITS, usando inferencia bayesiana.

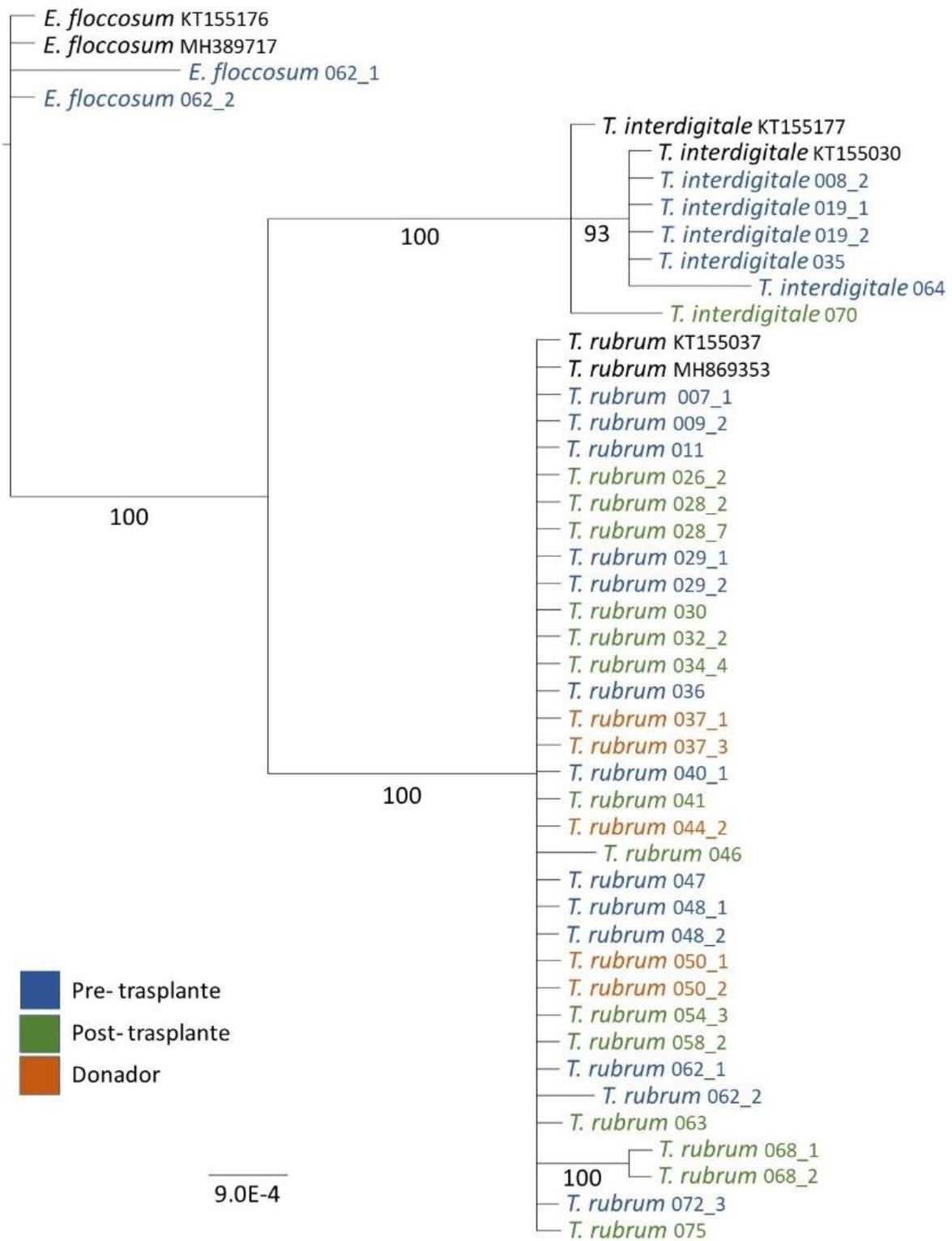


FIGURA 25. Árbol filogenético de dermatofitos construido a partir de la alineación de 46 secuencias de LSU, usando inferencia bayesiana.

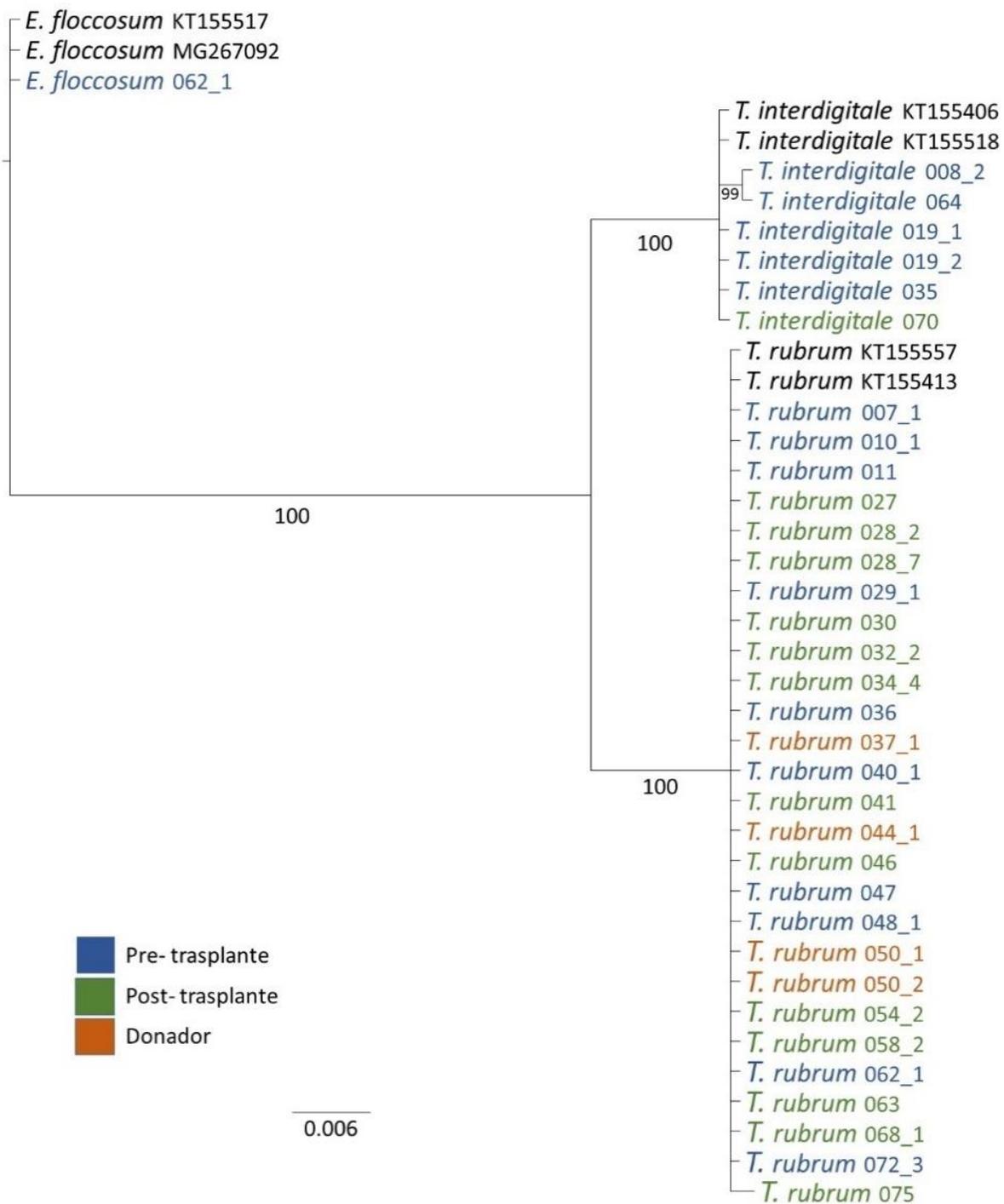


FIGURA 26. Árbol filogenético de dermatofitos construido a partir de la alineación de 40 secuencias de β -tubulina, usando inferencia bayesiana.

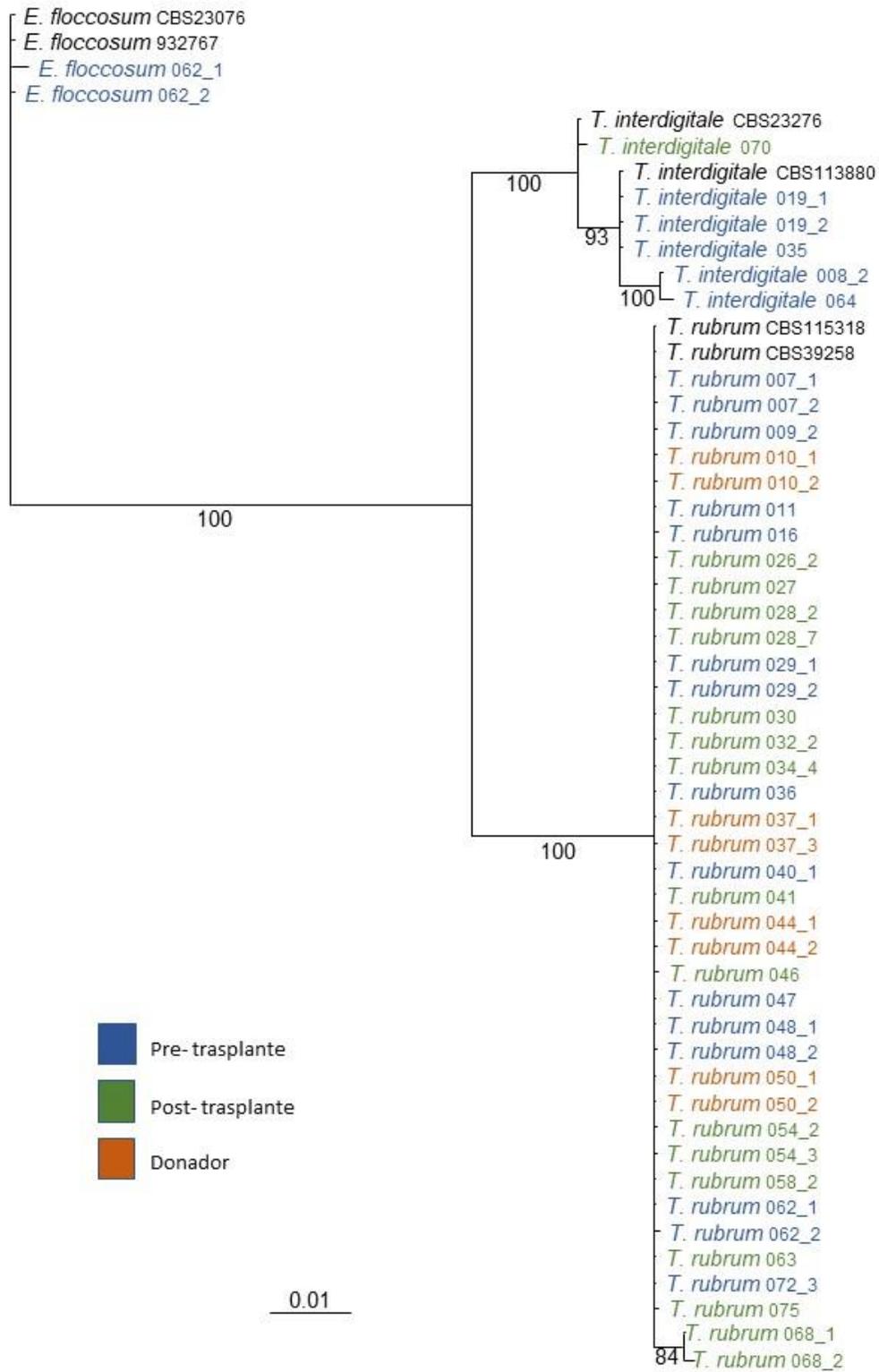


FIGURA 27. Árbol consenso a partir del análisis bayesiano resultante de la alineación conjunta de 53 secuencias de ITS, LSU y β -TUB, mostrando las relaciones filogenéticas de los aislados.

DISCUSIÓN

Este estudio coincide con otros autores en que el género masculino es el más afectado y en que la onicomycosis en los pies es predominante; se observa casi la misma frecuencia en el primer dedo del pie derecho que en el pie izquierdo, y una menor frecuencia en las manos (Leung et al., 2020; Moreno & Arenas, 2010; Vera-Díaz et al., 2015). En este estudio la prevalencia calculada fue del 79% para los pacientes de trasplante y del 69% para los donadores, similar al reporte de Magaña-Ramírez y colaboradores (2013) y por Vera-Díaz y colaboradores (2015). La diferencia de prevalencia entre los dos grupos sugiere que el padecimiento es más común en individuos inmunosuprimidos. La incidencia no se calculó, debido a que no se tiene registro de la enfermedad antes y después del trasplante en todos los pacientes.

El examen microscópico directo con KOH es un método rápido que permite identificar estructuras fúngicas y orienta a determinar si la causa es un hongo filamentosos o una levadura. La presencia de dermatofitomas es importante ya que sugiere alteraciones en la expresión genética y la actividad metabólica del agente causal, lo que provoca una baja tasa en la curación, ayuda en la evasión del sistema inmune e impide la penetración de antifúngicos (Gupta et al., 2022). Esta estructura fue descrita por primera vez en 1998 por Roberts y Evans y es una condición poco conocida, lo que provoca que sea subdiagnosticada al confundirse con onicólisis (Gupta et al., 2022; Martínez-Herrera et al., 2012).

Se presentaron 25 cultivos negativos de muestras con ED positivo. Las posibles causas incluyen: que la muestra se obtuvo inadecuadamente (de zonas poco o no infectadas), retraso en el procesamiento, la cicloheximida inhibió el crecimiento fúngico o el crecimiento de hongos fue inhibido por bacterias coexistentes (Gupta et al. 2003). Los exámenes directos negativos de las muestras con cultivos positivos pueden ser debido a que la sección de la uña utilizada para el examen directo no contenía estructuras fúngicas (Gupta et al., 2022).

El cultivo es básico para determinar la viabilidad e identificar al agente causal y llegar a un diagnóstico; este proceso lleva tiempo debido al lento crecimiento de algunas

especies (Mahoney et al., 2003). Zaias en 1972 determinó que en más del 10% de las uñas con onicomicosis el hongo causante no logra crecer en el primer intento de cultivo, por lo que es recomendable volver a sembrar la muestra o tomar una nueva de ser posible; En este estudio todas las muestras con examen directo positivo, pero cultivo negativo, se decidió volver a sembrar una segunda y hasta una tercera vez, dando resultados positivos a dermatofitos en varios casos.

La sensibilidad del ED fue del 97%, más alta del 48-60% reportada por Leung y colaboradores (2020) y su valor predictivo negativo fue del 92%; los dos valores entraron en el intervalo de confianza calculado para cada uno y fueron más altos de lo reportado por Karaman y colaboradores (2019) que fue una sensibilidad del 92% y un valor predictivo negativo del 82%. La sensibilidad del cultivo fue del 76%, más alta del 60-65% reportada en el mismo tipo de estudio de Leung y colaboradores y con un valor predictivo negativo del 53%, ambos valores están dentro del intervalo de confianza calculado; al igual que en el ED nuestros valores fueron más altos que los reportados por Karaman y colaboradores con una sensibilidad del 19% y un valor predictivo negativo del 45%. Estos valores indican que el cultivo es poco sensible como método de diagnóstico, pero a diferencia del ED, permite identificar al agente causal. La especificidad y el valor predictivo positivo fueron altos debido a que se consideró onicomicosis al tener positivo uno de estos estudios, por lo que no reportamos falsos positivos.

El crecimiento de bacterias en muestras de onicomicosis se ha reportado anteriormente. En 1972, Zaias reportó ED en los que se observaron bacterias y filamentos y en cuyos cultivos se aislaron únicamente bacterias. Este fue un fenómeno que también se observó en algunas de las muestras, lo que nos indica que las bacterias inhiben el crecimiento del agente etiológico. Joyce y colaboradores (2019) reportaron bacterias en el 50% de muestras de onicomicosis, identificando al género *Staphylococcus* en el 50% de ellas, siendo la más frecuente *S. epidermidis*. En el mismo estudio de Joyce y colaboradores no se reportó una relevancia en la infección debido a que las bacterias aisladas e identificadas forman parte de la microbiota.

En nuestro estudio de las 4 bacterias identificadas únicamente *Staphylococcus epidermidis* y *Kocuria kristinae* forman parte de la microbiota cutánea y gastrointestinal respectivamente; sin embargo, tanto estas dos especies como las otras dos identificadas causan infecciones que pueden llegar a bacteriemias en pacientes inmunocomprometidos (Bernshteyn et al., 2020; Ionescu et al., 2022; Joyce et al., 2019).

La identificación preliminar del género de un hongo cultivable, en particular de un dermatofito, empieza al observar las características de la colonia, el color, la textura o aspecto y la producción de pigmento (Petrucci et al., 2020). Para la identificación de las especies de dermatofitos es importante la visualización de las características microscópicas; sin embargo, la similitud morfológica y la escasa o nula esporulación dificultan la identificación. En este estudio utilizamos el medio ATPa que promueve la conidiación, por lo que contribuye a la identificación del género y la especie (Macura, 1993; Petrucci et al., 2020).

Las especies del género *Trichophyton* son muy parecidas, las colonias suelen ser blancas a amarillas con un aspecto algodonoso, producen microconidios redondos, piriformes o en forma de clava, de pared lisa, que se forman individualmente a lo largo de las hifas; suelen también formar macroconidios en cantidades variables, de pared lisa y tabicados (Borman & Summerbell, 2003; Macura, 1993;). Las colonias de *T. rubrum* suelen ser algodonosas y la mayoría producen pigmento rojo vino. Las colonias de *T. interdigitale* son más pulverulentas a granuladas, algunas producen pigmento marrón-rojo, no genera macroconidios, pero produce microconidios abundantes e hifas en espiral (Macura, 1993; Nenoff et al., 2007). Las colonias de *E. floccosum* son de aterciopeladas o ligeramente pulverulentas, de color blanco, amarillo o verde oliva y en algunas ocasiones produce pigmento; microscópicamente son fácilmente distinguibles ya que no producen microconidios y sus macroconidios son claviformes, de pared lisa y delgadas con dos a seis segmentos y dispuestos a lo largo de las hifas individualmente o en forma de racimo (Macura, 1993; Borman & Summerbell, 2003).

Los HFND encontrados en este estudio incluyeron *Spiromastigoides warcupii*, *Keratinophyton hubeiense*, *Botryotrichum piluliferum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium*

equiseti. Todos ellos forman colonias blancas muy similares entre sí, por lo que la identificación de género se realizó mediante las características microscópicas y la especie fue determinada por PCR-secuenciación (Motamedi et al., 2016; Stchigel et al., 2017; Wang et al., 2016 ; Veiga et al., 2018). *Spiromastigoides warcupii* macro y microscópicamente fue muy similar al género *Keratinophyton* por lo que la PCR-secuenciación nos reveló el género y especie correcta (Motamedi et al., 2016; Stchigel et al., 2017).

Botryotrichum piluliferum no es una especie común por lo que su morfología microscópica nos era desconocida lo que no nos permitió hacer una identificación preliminar (Wang et al., 2016). Mientras que los géneros *Aspergillus* y *Scopulariopsis* son muy comunes. *Aspergillus* forma colonias con pigmento verde y *Scopulariopsis* forma colonias color marrón, polvosas; la morfología microscópica fue útil para confirmar el género; la identificación de especie se realizó mediante PCR-secuenciación (Ramírez Hobak et al., 2017).

El medio diferencial CHROMagar Candida está ampliamente validado y tiene una sensibilidad del 97% y una especificidad del 92% para la identificación de *Candida albicans*; por esta confiabilidad para la determinación de esta especie no se utilizó secuenciación (Estrada-Barraza et al., 2011). *Candida haemulonii* fue identificada por PCR-secuenciación; al principio se había identificado como *C. parapsilosis* debido a que en CHROMagar las colonias tomaron un color rosa pálido y es considerada como patógeno frecuente causante de onicomicosis. Su crecimiento en ADSa, la ausencia de pseudohifas e hifas y los resultados ambiguos de las pruebas bioquímicas comerciales nos hizo dudar de la primera identificación, por lo que se optó por la identificación molecular de la región ITS. Diversos aislados de esta especie presentan diferentes rangos de asimilación de carbohidratos y de resistencia a antifúngicos, lo que hace difícil su identificación con métodos comerciales (Coles et al., 2020; Estrada-Barraza et al., 2011).

Otra levadura identificada fue *Trichosporon asahii*, esta levadura forma en ADS colonias color crema, cerebriformes, irregulares y genera hifas y pseudohifas. Esta levadura hidroliza urea, prueba que ayuda a diferenciarla de los géneros *Candida* y *Geotrichum*.

La identificación de esta especie se realizó por el método API 20X, considerado estándar de oro para la identificación de levaduras basado en la asimilación de carbohidratos y formación de hifas y pseudohifas (Estrada-Barrazar et al., 2011; Mehta et al., 2021).

La identificación de los hongos a nivel de especies permite el conocimiento de las especies predominantes y nuevos agentes patógenos lo que es importante desde el punto de vista ecológico, epidemiológico y terapéutico, posibilitando encontrar los factores de riesgo, tendencias epidemiológicas, rutas de infección y dar y crear tratamientos adecuados (Ameen, 2010; Rezaei-Matehkolaei et al., 2014; Faramarzi et al., 2021).

La secuenciación es un procedimiento que permite diferenciar especies fúngicas de forma precisa (de Hoog et al., 2017; Macura, 1993). En el estudio microscópico preliminar se habían identificado siete muestras como *T. tonsurans*; por el estudio molecular se determinó que correspondían a cinco *T. rubrum* y dos *T. interdigitale*. *T. tonsurans* es uno de los principales agentes etiológicos de *tiña de la cabeza* en México y América Latina, pero solo ocasionalmente es causante de onicomicosis; en este estudio no fue aislado en ninguna muestra (Arenas et al., 2010; Moreno & Arenas 2010).

T. rubrum fue el microorganismo aislado con mayor frecuencia (62.79%), seguido de *T. interdigitale* (8.14%), lo que coincide con estudios similares respecto a agentes causantes de onicomicosis (Joyce et al., 2019; Tapia-Amador et al., 2022). *C. albicans* fue el tercer hongo más frecuente con el 6.98% de los aislados y el 66% de las levaduras aisladas. Esta levadura fue aislada de una paciente femenina pre y post trasplante. Se ha reportado que *C. albicans* causa el 70% de las onicomicosis por levaduras y se ve principalmente en mujeres (Leung et al., 2020). En la mayoría de los estudios sobre onicomicosis se observa este orden de frecuencia en los agentes causales; *T. rubrum*, *T. interdigitale* y *C. albicans* (Gupta et al., 2022; Leung et al., 2020).

Los demás hongos aislados representaron el 22.9% de los cuales 2.33% fue el dermatofito *E. floccosum*, 2.33% la levadura *Candida haemulonii*, 1.16% *Trichosporon asahii* y el 16.27% correspondieron a los HFND que es un porcentaje más alto de lo reportado por Leung (2020) y por Moreno y Arenas en 2010 que reportan 2-14% para los HFND, dependiendo de la región geográfica y la población estudiada y una frecuencia del 1-4% por especie similar a lo encontrado en este estudio. De los HFND aislados los géneros *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium* y *Penicillium* se han reportado ampliamente en estudios anteriores siendo las especies *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus versicolor* y *Fusarium oxysporum* los más frecuentes con una amplia distribución en México (Moreno & Arenas, 2010).

Trichosporon sp. tiene una prevalencia como agente causante de onicomicosis en México del 2.51% a 42.8%, por lo que es común aislarla. Igual que *C. albicans*, la especie *T. asahii* puede ser endógena o exógena, ya que forma parte de la microbiota gastrointestinal, del tracto respiratorio, de la piel y de las mucosas (Colombo et al, 2011). *C. haemulonii* es una especie oportunista que puede causar onicomicosis. Hasta el 2017 no se había reportado *C. haemulonii* en México. En 2020 se reportó el primer caso como causa de sepsis en un niño con cirugía cardíaca previa (Ramos et al., 2015; Reséndiz-Sánchez et al, 2020).

El aislado del género *Spiromastigoides* no ha sido reportado como causante de onicomicosis. Este hongo comúnmente se encuentra en el estiércol y pocas veces ha sido aislado como causa de infecciones en animales y humanos con una baja virulencia. Este género es perteneciente al orden Onygenales por lo que es queratinofílico (Stchigel et al., 2017). El género *Keratinophyton*, antes conocido como *Chrysosporium* también pertenece al orden Onygenales; tiene una distribución mundial y se encuentra en restos de pelo o plumas; se ha reportado que este género causa onicomicosis, pero no se tienen reportes donde se haya identificado la especie *Chrysosporium hubeiense* (Motamedi et al., 2016; Summerbell, 2000).

Botryotrichum piluliferum es un hongo que se encuentra en el suelo. Este género se considera la forma asexual del género *Chaetonium* del cual se han tenido reporte en México y en otros países como agente etiológico de onicomicosis. No se tienen reportes

de onicomicosis por el género *Botryotrichum* o por la especie *Chaetomium piluliferum* (Martínez-Herrera et al., 2015; Wang et al., 2016).

La relación filogenética entre dermatofitos ha estado en constante cambio debido a que las especies de este grupo de hongos están relacionadas estrechamente, lo que ha llevado a unificar diferentes especies en una sola, determinar nuevas especies y géneros y proponer complejos de especies crípticas (García-Garces et al., 2018; Reséndiz-Sánchez et al., 2020).

La filogenia permite reconstruir la historia evolutiva de un microorganismo; comprender las relaciones entre las especies es clave para entender sus características morfológicas y moleculares que explican su comportamiento en la naturaleza, en este caso como patógenos de humanos dando idea de la epidemiología y de la relación de los aislados clínicos con otros aislados; esto permite desarrollar programas de control, programas de tratamiento efectivos a diferentes genotipos y diseñar nuevas técnicas de diagnóstico (Montes et al., 2003).

En este estudio se utilizaron tres regiones para construir árboles filogenéticos y realizar la identificación molecular. La región ITS es considerada el estándar de oro para la identificación de hongos patógenos, ayuda a ver relaciones entre parientes taxonómicos cercanos que son difíciles de diferenciar morfológicamente, dentro de esta región se encuentran las regiones 18S y 5.8S de rDNA que son altamente variables (Nenoff et al., 2007). TUB es la región que codifica para la proteína tubular monomérica que genera los microfilamentos, es utilizada para la determinación de especies ya que cuenta con intrones que permiten diferenciar especies estrechamente relacionadas (Rezaei-Matehkolaei et al., 2014). Dentro de la región LSU se tienen los dominios D1 y D2 que son divergentes, ayudan a discernir entre niveles filogenéticos y taxonómicos y delimitan taxones entre los hongos del orden Onygenales (Jagielski et al., 2016).

En pacientes de trasplante renal las micosis tienen una prevalencia del 7 al 73.6%, siendo las micosis superficiales (onicomicosis, tiña del pie y pitiriasis versicolor) las más comunes. En 2017 Gómez-Hernández y colaboradores reportaron una frecuencia de micosis superficiales del 53.6% en receptores de trasplante renal atendidos en el Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI; de estos pacientes el

37.1% presentaba onicomicosis. De acuerdo con algunos autores, las lesiones cutáneas pueden ser el primer hallazgo de una micosis sistémica (Lima et al., 2013; Vera Díaz et al., 2015). En México se calcula una mortalidad del 4.6% al 11.3% en pacientes de trasplante renal; 40% causadas por infecciones, siendo las infecciones virales la causa más frecuente, seguidas por las micosis invasivas (Ayala-García et al., 2020; Caruso Territoriale et al., 2018).

En México el tratamiento inmunosupresor de elección es ácido micofenólico, tacrolimus y prednisona. Estos fármacos inhibidores de la calcineurina están asociados con una mayor susceptibilidad a infecciones fúngicas recurrentes. Los estudios en México no han encontrado asociación entre las dermatomicosis y los esquemas farmacológicos. El riesgo no solo depende del estado de inmunosupresión crónica, sino también de factores predisponentes en el paciente (Tapia-Amador et al., 2022; Oliveira et al., 2019).

Los pacientes de trasplante renal tienen las menores tasas de micosis invasiva entre los pacientes de trasplante de órgano sólido. La mayoría de las micosis invasivas en este grupo de pacientes son causadas por *C. albicans* y *Aspergillus* spp.; entre los géneros más frecuentes también se encuentra *Pneumocystis*, *Cryptococcus* y *Fusarium*. En 2019 en Brasil se reportó un aumento de feohifomicosis en estos pacientes (Caruso Territoriale et al., 2018; Oliveira et al., 2019). Generalmente los dermatofitos solo ocasionan infecciones superficiales, pero se ha reportado que pueden invadir tejidos profundos manifestándose como abscesos subcutáneos o granulomas en pacientes inmunosuprimidos; de la invasión profunda se puede diseminar de forma hematogena volviéndose sistémica. *T. rubrum* es el dermatofito con mayor prevalencia de las dermatofitosis invasivas. Silva y colaboradores (2022) reportaron dos casos de pacientes con trasplante de órgano sólido, los cuales presentaban onicomicosis por la misma especie que les estaba causando la micosis invasiva (Novick, 1987; Silva et al., 2022).

La presencia de masas nodulares en pacientes inmunosuprimidos con antecedente de micosis crónica como la onicomicosis, puede ser un factor de riesgo para desarrollar una micosis diseminada, al ser la uña y la piel puertas de entrada para que los hongos

migren a otros sitios (Novick, 1987; Veiga et al., 2018). Algunos de los hongos aislados en este estudio pueden causar complicaciones en los pacientes de trasplante.

Las especies encontradas en este estudio de *Fusarium* y de *Scopulariopsis* comúnmente se encuentran en la materia orgánica; son oportunistas cuyos casos han ido en aumento infectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos en los que puede causar micosis subcutáneas, profundas y diseminadas (Jagielski et al., 2016; Ramírez Hobak et al., 2017). Las micosis profundas causadas por *Scopulariopsis* sp. han sido reportadas en pacientes con micosis superficiales e inmunosuprimidos principalmente por quimioterapia. Este género es altamente resistente a azoles (Kurata et al., 2018).

En receptores de trasplante las infecciones por *Fusarium* no son comunes; suelen presentarse después del trasplante de forma localizada y al diseminarse tiene una mortalidad de hasta el 33% (Silveira & Husain, 2007). *F. equiseti*, se considera una amenaza para la salud pública ya que se ha reportado que causa infecciones superficiales e invasivas que se disemina por vía hematológica con una alta mortalidad debido a que sus metabolitos producen citotoxicidad y *F. oxysporum* forma biopelículas y produce necrosis lo que hace difícil el tratamiento (Egbuta et al., 2017; Veiga et al., 2018).

Aspergillus versicolor puede causar aspergilosis invasiva y produce esterigmatocistina, una micotoxina que llega a ser cancerígena y hepatotóxica. Esta especie de *Aspergillus* no responde a azoles tópicos y es resistente a la griseofulvina, fluconazol y anfotericina B (Egbuta et al., 2017; Veraldi et al., 2010). *Penicillium chrysogenum* es un patógeno común, pero no es usual que cause micosis invasiva, aunque está asociado con falla terapéutica al ser resistente al itraconazol tópico (Egbuta et al., 2017).

Trichosporon es la segunda levadura más común causante de infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos después del género *Candida*; la mortalidad ha sido reportada entre el 50% y el 80% (Mehta et al., 2021). Este género puede causar infecciones cutáneas e invasivas; principalmente se ha reportado a *Trichosporon asahii* en pacientes inmunocomprometidos (Ortega-Springall et al., 2016). En el presente estudio esta especie fue aislada de un donador, desarrollando numerosas colonias, por

lo que se atribuyó importancia clínica. La identificación de las especies de *Trichosporon spp.* es importante debido a que los patrones de susceptibilidad antifúngica son variables; este género está ampliamente distribuido en la naturaleza y en ocasiones se encuentra en la microbiota gastrointestinal permanente, así como en la piel y el tracto respiratorio de forma transitoria (Capoor et al., 2013; Chagas-Neto et al., 2008).

Aunque las levaduras del género *Candida* son frecuentes, la especie *C. haemulonii* no es común y los reportes en México son pocos, por lo que su identificación en dos muestras del presente estudio llamó la atención. En 2020 Coles y colaboradores reportaron una incidencia de esta especie del 60% de micosis crónicas en el pie en pacientes con diabetes no controlada en Estados Unidos. *C. haemulonii* es multirresistente a anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol y puede llegar a causar candidosis invasiva dificultando su tratamiento (Ramos et al., 2015).

La exploración dermatológica periódica de los pacientes en protocolo para trasplante renal es importante para detectar y prevenir enfermedades dermatológicas que puedan aumentar su morbilidad y mortalidad posterior al trasplante. El diagnóstico de una micosis con su correspondiente identificación etiológica permite dar un tratamiento temprano y específico, contribuyendo a evitar el uso de medicamentos y sus reacciones adversas e interacciones con otros medicamentos; también contribuye a prevenir que estas micosis progresen a una infección sistémica (Ramírez et al., 2017).

CONCLUSIÓN

En este estudio encontramos que la onicomycosis es una patología frecuentemente presente en pacientes que van a ser sometidos a un trasplante renal. Por el riesgo de generar una infección invasiva durante la intervención quirúrgica, es preciso eliminar previamente cualquier foco infeccioso. Para esto se requiere realizar una revisión minuciosa, y de ser necesario realizar un estudio micológico, para detectar una onicomycosis incipiente.

Actualmente siguen siendo muy útiles los estudios tradicionales (examen microscópico y cultivo para hongos filamentosos; examen directo, cultivo y pruebas bioquímicas para

levaduras) para establecer el diagnóstico de cualquier infección fúngica, incluida la onicomycosis. Sin embargo, para la identificación precisa de los agentes causales, la morfología macro- y microscópica ya no es suficiente. Para esto es necesario recurrir a los procedimientos moleculares para definir sobre todo la especie involucrada en una onicomycosis, particularmente cuando se trata de géneros o especies poco frecuentes.

En este estudio se demostró que *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale* y *C. albicans* son los principales agentes causales de onicomycosis en pacientes que están en protocolo de trasplante renal. Este resultado no es sorprendente, ya que los dos dermatofitos son hongos antropofílicos y por lo tanto están perfectamente adaptados al humano, y *C. albicans* es una levadura que forma parte de la microbiota humana. Además, en cinco casos se observaron formaciones de masas fúngicas conocidas como dermatofitomas, lo que nos indica que la terapia antifúngica tendrá poca eficacia al no poder penetrar dicha masa y se tendrá que optar por un tratamiento que combine la avulsión de la uña con un antimicótico vía oral; de ser posible se deben realizar previamente pruebas de susceptibilidad.

El diagnóstico y el tratamiento de onicomycosis antes de un trasplante evita las reacciones adversas e interacciones entre antifúngicos e inmunosupresores. Algunos antifúngicos están contraindicados con el uso de inhibidores de calcineurina, porque existe un riesgo elevado de nefrotoxicidad para el paciente. También las dosis deben ser ajustadas dependiendo de otros riesgos y necesidades de cada paciente.

El estudio molecular fue muy útil para identificar las especies de hongos menos frecuentes que los dermatofitos (*C. haemulonii*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*) o incluso de hongos no reportados como causantes de onicomycosis (*Spiromastigoides warcupii*, *Botryotrichum piluliferum*).

Estudios adicionales al presente trabajo, como la sensibilidad a antifúngicos, son deseables particularmente en hongos comunes como *Scopulariopsis* o *Fusarium* de los que se conoce su resistencia, o de *Spiromastigoides warcupii* y *Botryotrichum piluliferum*, de los que se desconoce su grado de sensibilidad, para proponer un tratamiento efectivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ameen, M. (2010). Epidemiology of superficial fungal infections. *Clinics in Dermatology*, 28(2), 197–201.
- Arenas, R., Bonifaz, A., Padilla, M., Arce, M., Atoche, C., Barba, J., Campos, P., Fernández, R., Mayorga, J., Nazar, D., Ocampo, J. (2010). Onychomycosis. A Mexican survey. *Eur J Dermatol.*, 20:611-614.
- Ayala-García, M., Díaz-Chávez, E., Soel-Encalada, J., Orozco-Mosqueda, A., Balandrán-Ortiz, M., Ceja-Guzmán, S., Garcidueñas-Garcidueñas, S., Flores-Vargas, Gilberto., Guaní-Guerra, E. (2020). Supervivencia de los pacientes receptores de trasplante renal. *Gac. Méd.* , 156:34-39.
- Bernshteyn, M., Kumar, P., & Joshi, S. (2020). *Kocuria kristinae* pneumonia and bacteremia. *Proc (Bayl Univ Med Cent).*, 33:608-609.
- Borman, A., & Summerbell, R. (2003). Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton, and Agents of Superficial Mycoses. *Manual of Clinical Microbiology*, 2:1798-1819.
- Burstein, V., Beccacece, I., Guasconi, L., Mena, C., Cervi, L., & Chiapello, L. (2020). Skin Immunity to Dermatophytes: From Experimental Infection Models to Human Disease. *Front Immunol.*, 11:605-644.
- Capoor, M., Agarwal, S., Yadav, S., Saxena, A., & Ramesh, V. (2013). Trichosporon mucoides causing onychomycosis in an immunocompetent patient. *Int J Dermatol* , 54:704-707.
- Caruso Territoriale, A., Conesa, M., Mainardi, C., Kurpis, M., & Ruiz Lascano, A. (2018). Paniculitis por Candida en paciente trasplantado hepático. *Rev. argent. dermatol.*, 99.
- Chagas-Neto, T., Chaves, G., & Colombo, A. (2008). Update on the genus Trichosporon. *Mycopathologia*, 166:121-132.

- Cobos Lladó, D., Fierro Arias, L., Arellano Mendoza, I., & Bonifaz, A. (2016). La onicomycosis y su influencia en la calidad de vida. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 14(4), 318-327.
- Coles, M., Cox, K., & Chao, A. (2020). *Candida haemulonii*: An emerging opportunistic pathogen in the United States? *IDCases.*, 21:.
- Colombo, A., Padovan, A., & Chaves, G. (2011). Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev.*, 24:682-700.
- de Hoog, G., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., Kupsch, C., Stielow, J., Freeke, J., Göker, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H., Gräser, Y. (2017). Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, 182:5-31.
- Egbuta, M., Mwanza, M., & Babalola, O. (2017). Health Risks Associated with Exposure to Filamentous Fungi. *Int J Environ Res Public Health.*, 14:719.
- Estrada-Barraza, D., Dávalos Martínez, A., Flores-Padilla, L., Mendoza-De Elías, R., & Sánchez-Vargas, L. (2011). Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol.*, 28:36-42.
- Faramarzi, S., Motamedi, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Aboutalebian, S., Ansari, S., Didehd, M., Bahadoran, M., Mirhendi, H. (2021). A simple multiplex polymerase chain reaction assay for rapid identification of the common pathogenic dermatophytes: *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, and *Epidermophyton floccosum*. *Curr Med Mycol.*, 7:1-7.
- García Garces, H., Theodoro Cordeiro, R., & Bagagli, E. (2018). PRP8 intein in dermatophytes: Evolution and species identification. *Med Micol*, 56:746-758.
- García-Martos, P., Domínguez, I., Marín, P., Linares, M., Mira, J., & Calap, J. (2000). Onychomycoses caused by non-dermatophytic filamentous fungi in Cádiz. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 18:319-324.

- Gnat, S., Łagowski, D., & Nowakiewicz, A. (2021). Genetic Predisposition and its Heredity in the Context of Increased Prevalence of Dermatophytoses. *Mycopathologia*, 1-14.
- Güleç , A., Demirbilek, M., Seçkin, D., Can, F., Saray, Y., Sarifakioglu, E., & Haberal, M. (2003). Superficial fungal infections in 102 renal transplant recipients: a case-control study. *J Am Acad Dermatol.*, 49:187-192.
- Gupta, A., Ryder, J., & Summerbell, R. (2003). The diagnosis of nondermatophyte mold onychomycosis. *Int J Dermatol*, 42: 272-273.
- Gupta, A., Stec, N., Summerbell, R., Shear, N., Piguet, V., Tosti, A., & Piraccini, B. (2020). Onychomycosis: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(9), 1972-1990.
- Gupta, A., Wang, T., & Cooper, E. (2022). Dermatophytomas: Clinical Overview and Treatment. *J Fungi (Basel)*, 8:742.
- Haghani, I., Shams-Ghahfarokhi , M., Asl, A., Shokohi, T., & Hedayati, M. (2019). Molecular identification and antifungal susceptibility of clinical fungal isolates from onychomycosis (uncommon and emerging species). *Mycoses*, 62:128-143.
- Havlickova, B., Czaika, V., & Fried, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 4:2-15.
- Ionescu, M., Neagoe, D., Crăciun, A., & Moldovan, O. (2022). The Gram-Negative Bacilli Isolated from Caves—*Sphingomonas paucimobilis* and *Hafnia alvei* and a Review of Their Involvement in Human Infections. *Int J Environ Res Public Health*, 19:2324.
- Jagielski, T., Sandoval-Denis, M., Yu, J., Yao, L., Bakula, Z., Kalita, J., Skóra, M., Krzyściak, P., de Hoog, G., Guarro, J., Gené, J. (2016). Molecular taxonomy of scopulariopsis-like fungi with description of new clinical and environmental species. *Fungal Biol.* , 120:586-602.

- Joyce, A., Gupta, A., Koenig, L., Wolcott, R., & Carviel, J. (2019). Fungal Diversity and Onychomycosis An Analysis of 8,816 Toenail Samples Using Quantitative PCR and Next-Generation Sequencing. *J Am Podiatr Med Assoc*, 109:57-63.
- Kanbe, T. (2008). Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166:307-317.
- Karaman, B., Açıklın, A., Ünal, I., & Aksungur, V. (2019). Diagnostic values of KOH examination, histological examination, and culture for onychomycosis: a latent class analysis. *Int J Dermatol*, 58:319-324.
- Kaur, R., Kashyap, B., & Bhalla, P. (2008). Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. *Indian J Med Microbiol*, 108-116.
- Kurata, K., Nishimura, S., Ichikawa, H., Sakai, R., Mizutani, Y., Takenaka, K., Kakiuchi, S., Miyata, Y., Kitao, A., Yakushijin, K., Kawamoto, S., Yamamoto, K., Ito, M., Matsuoka, H., Tokimatsu, I., Kamei, K., Minami, H. (2018). Invasive Scopulariopsis albiflavescens infection in patient with acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*, 108:658-664.
- Leung, A., Lam, J., Leong, K., Hon, K., Barankin, B., Leung, A., & Wong, A. (2020). Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.*, 14:32-45.
- Lima, A. M., Roch, S. P., Reis Filho, E. d., Eid, D. R., & Matos, C. (2013). Study of dermatoses in kidney transplant patients. *Anais brasileiros de dermatologia*, 88(3), 361-367.
- López-Aguado Amador, K., Tejeda-Olán, J., & Bonifaz, A. (2021). Transformación epidemiológica de las dermatofitosis: ¿Está México en riesgo de ser la nueva India? *Dermatol Rev Mex*, 65:662-664.
- López-Martínez, R., Manzano-Gayosso, P., Hernández-Hernández, F., Bazán-Mora, E., & Méndez-Tovar, L. J. (2010). Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. *Medical Mycology*, 48:476-479.
- Macura, A. (1993). Dermatophyte infections. *Int J Dermatol*, 32:313-323.

- Magaña Ramírez, M., Hurtado Montiel, V., Fernández Martínez, R., & Arenas, R. (2013). Prevalencia de micosis superficiales en pacientes con trasplante renal. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 11:8-12.
- Mahoney, J., Bennet, J., & Olsen, B. (2003). The diagnosis of onychomycosis. *Dermatol Clin.*, 21:463-467.
- Manzano-Gayosso, P. (2008). Las micosis superficiales: su relevancia médica y socioeconómica. *Gac Méd Méx*, 144:123-124.
- Martínez-Herrera, E. O., Arroyo-Cama, S., Tejada-García, D. L., Porrás-López, C. F., & Arenas, R. (2015). Onychomycosis due to opportunistic molds. *Anais brasileiros de dermatologia*, 90, 334-337.
- Martínez-Herrera, E., Moreno-Coutiño, G., Fernández-Martínez, R., Finch, J., & Arenas, R. (2012). Dermatophytoma: description of 7 cases. *J Am Acad Dermatol*, 66:1014-1016.
- Mehta, V., Nayyar, C., Gulati, N., Singla, N., Rai, S., & Chandar, J. (2021). A Comprehensive Review of *Trichosporon* spp.: An Invasive and Emerging Fungus. *Cureus.*, 13:16.
- Mendoza, N., Palacios, C., Cardona, N., & Gómez, L. M. (2012). Onicomycosis: afección común de difícil tratamiento. *Rev Asoc Colomb Dermatol*, 20(2), 149-158.
- Montes, B., Restrepo, A., & McEwen, J. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su. *Biomédica*, 23:213-224.
- Moreno, G., & Arenas, R. (2010). Other fungi causing onychomycosis. *Clin Dermatol.*, 28:160-163.
- Motamedi, M., Ghasemi, Z., Shidfar, M., Hosseinpour, L., Khodadadi, H., Zomorodian, K., & Mirhendi, H. (2016). Growing Incidence of Non-Dermatophyte Onychomycosis in Tehran, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* , 9.

- Nenoff, P., Herrmann, J., & Gräser, Y. (2007). Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. *J Dtsch Dermatol Ges.*, 5:198-202.
- Novick, N., Tapia, L., & Bottone, E. (1987). Invasive trichophyton rubrum infection in an immunocompromised host. Case report and review of the literature. *Am J Med*, 82:321-325.
- Oliveira, W. R., Tirico, M. C., Souza, A. A., Codarin, F. R., Silva, L. L., & Neto, C. F. (2019). Skin lesions in organ transplant recipients: a study of 177. *International journal of dermatology*, 58(4), 440-448.
- Ortega-Springall , M., Arroyo-Escalante, S., & Arenas, R. (2016). Onycholysis and Chromonychia: A Case Caused by Trichosporon inkin. *Skin Appendage Disord*, 1:144-146.
- Pchelin , I., Zlatogursky , V., Rudneva , M., Chilina , G., Rezaei-Matehkolaei , A., Lavnikovich , D., Vasilyeva , N., Taraskina , A. (2016). Reconstruction of phylogenetic relationships in dermatomycete genus Trichophyton Malmsten 1848 based on ribosomal internal transcribed spacer region, partial 28S rRNA and beta-tubulin genes sequences. *Mycoses*, 59:566-575.
- Petrucelli, M. F., Abreu, M. H., Cantelli, B. A., Segura, G. G., Nishimura, F. G., Bitencourt, T. A., Tamires, A., Marins, M., Fachin, A. L. (2020). Epidemiology and Diagnostic Perspectives of Dermatophytoses. *Journal of Fungi*, 6(4), 310.
- Ramírez Hobak, L., Gómez-Sáenz, A., Vega Sánchez, D., & Arenas, R. (2017). Onicomycosis por mohos no dermatofitos. Una revisión. *DermatologíaCMQ*, 15:184-194.
- Ramos, L., Figueiredo-Carvalh, M., Barbedo, L., Ziccardi, M., Chaves, A., Zancopé-Oliveira, R., Pinto, M., Sgarbi, D., Dornelas-Ribeiro, M., Branquinha, M., Santos, A. (2015). Candida haemulonii complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. *J Antimicrob Chemother*, 70:111-115.

- Reséndiz-Sánchez, J., Ortiz-Álvarez, J., Casimiro-Ramos, A., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2020). First report of a catheter-related bloodstream infection by *Candida haemulonii* in a children's hospital in Mexico City. *Int J Infect Dis*, 92:123-126.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H., Makimura, K., de Hoog, G., Satoh, K., Najafzadeh, M., & Reza Shidfar, M. (2014). Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Med Mycol*, 52:674-688.
- Rouzaud, C., Chosidow, O., Brocard, A., Fraitag, S., Scemla, A., Anglicheau, D., Bouaziz, J., Dupin, N., Bougnoux, M., Hay, R., Lortholary, O., Lanternier, Fanny., French Mycoses Study Group. (2018). Severe dermatophytosis in solid organ transplant recipients: A French retrospective series and literature review. *Transpl Infect Dis*.
- Sánchez-Cárdenas, C., Vega-Sánchez, D., Vargas-Santana, S., Flores-Rivera, J., Arenas, R., & Corona, T. (2021). Onychomycosis in patients with multiple sclerosis: prevalence, clinical description, mycological, and dermoscopic study in a Mexican population. *Int J Dermatol.*, 60:1102-1108.
- Scher, R., Tavakkol, A., Sigurgeirsson, B., Hay, R., Joseph, W., Tosti, A., Fleckman, P., Ghannoum, M., Armstrong, D., Markinson, B., Elewski, B. (2007). Onychomycosis: diagnosis and definition of cure. *J Am Acad Dermatol*, 56:939-944.
- Silva, L., Sousa, J., Toscano, C., & Viana, I. (2022). Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* in immunocompromised patients. *An Bras Dermatol*, 97:223-227.
- Silveira, F., & Husain, S. (2007). Fungal infections in solid organ transplantation. *Med Mycol*, 45:305-320.
- Singal, A., & Khanna, D. (2011). Onychomycosis: Diagnosis and management. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 77(6), 659.

- Sistema Informático del Registro Nacional de Trasplantes*. (Octubre de 2022). Obtenido de http://cenatra.salud.gob.mx/transparencia/trasplante_estadisticas.html
- Stchigel, A., Sutton, D., Cano-Lira, J., Wiederhold, N., & Guarro, J. (2017). New Species *Spiromastigoides albida* from a Lung Biopsy. *Mycopathologia*, 182:967-978.
- Summerbell, R. (2000). Form and function in the evolution of dermatophytes. *Rev Ibero Mico.*, 30-43.
- Tapia-Amador, G. B., Reyes-Díaz, E., Espinoza-Pérez, R., Cruz-López, M., Cancino-López, J. D., Chacón-Pérez, M. J.-N., Rodríguez-Gómez, R., Anides-Fonseca, A. E. (2022). Dermatitis más frecuentes en pacientes con trasplante renal. *Cir Cir*, 90:644-652.
- Ungo-kore, H., Ehinmidu, J., Onaolapo, J., & Olonitola, O. (2021). Molecular Characterisation and Phylogenetic Analysis of Dermatophytic Fungi Isolated from Tinea Capitis in Northwest Nigeria Using Sequence of the 28S rRNA. *Microbiol. Res.* , 12:646-655.
- Veiga, F., de Castro-Hoshino, L., Sato, F., Bombassaro, A., Vicente, V., Mendes, V., Baesso, M., Negri, M., le Svidzinski, T. (2018). *Fusarium oxysporum* is an onychomycosis etiopathogenic agent. *Future Microbiol*, 13:1745-1756.
- Vera Díaz, E. C., Solano Vergara, M. A., & Ruiz, Á. (2015). Micosis superficiales en pacientes receptores de trasplante renal: Estudio clínico y epidemiológico. *Med Cutan Iber Lat Am*, 43:24-30.
- Veraldi, S., Chiaratti, A., & Harak, H. (2010). Onychomycosis caused by *Aspergillus versicolor*. *Mycoses*, 53:363-365.
- Vettorato, G., Esteves de Carvalho, A., Martinez Lecompte, S., Gobbato Trez, E., Duro Garcia, V., & Keitel, E. (2003). Frequency of infectious dermatosis in 208 renaltransplant recipients. *An bras Dermatol.*, 78:283-288.
- Virgili, A., Zampino, M. R., & Mantovani, L. (2002). Fungal skin infections in organ transplant recipients. *American journal of clinical dermatology*, 3(1), 19-35.

Wang, X., Houbraken, J., Groenewald, J., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K., Crous, P., Samson, R. (2016). Diversity and taxonomy of Chaetomium and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Stud Mycol*, 84:145-224.

Zaias, N. (1972). Onychomycosis. *Arch Dermatol*, 105: 263-274.

Zarei, F., Hashemi, S. J., Salehi, M., Mahmoudi, S., Zibafar, E., Ahmadinejad, Z., Foroushani, A., Ardi, P., Ghazvini, R. D. (2020). Molecular characterization of fungi causing colonization and infection in organ transplant recipients: A one-year prospective study. *Current Medical Mycology*, 6(1), 30-35.

ANEXOS

ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO

AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Digerido péptico de tejido animal	5.0 g
Dextrosa	40.0 g
Agar	15.0 g
H ₂ O destilada	1L

AGAR DEXTROSA SABOURAUD CON ANTIBIÓTICO

Se utilizó el medio comercial agar MYCOSEL

Peptona de soja	10.0 g
Dextrosa	10.0 g
Agar	15.0 g
Cicloheximida	0.4 g
Cloranfenicol	0.05 g
H ₂ O destilada	1L

AGAR LACTRIMEL DE BORELLI

Harina de arroz	14.0 g
Leche descremada en polvo	14.0 g
Miel de abeja	7.0 g
Agar	14.0 g
H ₂ O destilada	1L

AGAR PAPA DEXTROSA

Extracto de papa	4 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
H ₂ O destilada	1 L

AGAR TIERRA-PELOS CON ANTIBIÓTICO

Tierra estéril	20.0 gr
Extracto de levadura	0.9 gr
Glucosa	5.0 gr
Agar	15.0 gr
H ₂ O destilada	1 L
Dermasel Selective Supplement SR0075E...	6 ml

Cabello de niño prepúber cortado en fragmentos y esterilizado (lo necesario para cubrir la caja de Petri)

CALDO DEXTROSA SABOURAUD

Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Digerido péptico de tejido animal	5.0 g
Dextrosa	40.0 g
H ₂ O destilada	1L

ANEXO 2. SOLUCIONES

SOLUCIÓN DE AZUL DE ALGODÓN

Fenol líquido	20 ml
Ácido láctico	20 ml
Glicerol	40 ml
Azul de anilina	0.5 gr
H ₂ O destilada	20 ml

SOLUCIÓN SALINA

Cloruro de sodio	0.85 gr
H ₂ O destilada	100 ml

AGUA GLICERINADA AL 10%

Glicerol	10 ml
H ₂ O destilada	90 ml

BUFFER DE LISIS

Tris HCL 50 mM (pH 7.2)	2 ml
EDTA 50 mM (pH 8.0)	2 ml
SDS 3%	6 ml
Beta-mercaptoetanol 1%	200 µl
H ₂ O destilada estéril	2.8 ml

BUFFER DE CARGA

Azul de bromofenol	0.25%
Azul de xilencianol	0.25%
Glicerol en agua	30%

TAE (50X)

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100 ml
H ₂ O destilada	1

ANEXO 3. DATOS EPIDEMIOLOGICOS GENERALES

Paciente	Sexo	Número de muestras	Tipo de Paciente	Procedencia	Directo	Cultivos	BLAST NCBI	Procesamiento
001	M	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
002	F	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	Bacterias	No aplica	Negativo
003	F	3	Pre Trasplante	Pies	Negativo	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
					Filamentos Moderados	<i>Chrysosporium sp.</i>	<i>Spiromastigoides warcupii</i>	Procesado
					Negativo	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
004	M	2	Post Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
					Negativo	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
005	M	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	<i>Scopulariopsis sp.</i>	<i>Scopulariopsis alboflavescens</i>	Procesado
006	F	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	No aplica	No procesado
007	F	3	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
008	M	2	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Escasos	<i>T. rubrum</i>	No aplica	No procesado
					No realizado	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Procesado
009	F	5	Pre Trasplante	Pies	No realizado	<i>Scopulariopsis sp.</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
			Post Trasplante		Filamentos Escasos	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
					Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Escasos	<i>T. rubrum</i>	No aplica	No procesado
010	F	2	Donador/Familiar	Pies	Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					No realizado	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
011	M	1	Pre Trasplante	Pies	No realizado	<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
012	F	1	Pre Trasplante	Pies	Negativo	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
013	M	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Escasos	Sin crecimiento	No aplica	Negativo

Continúa en la página siguiente.

Paciente	Sexo	Número de muestras	Tipo de Paciente	Procedencia	Directo	Cultivos	BLAST NCBI	Procesamiento
014	F	2	Post Trasplante	Pies	Filamentos Escasos /Bacterias	Bacterias	No aplica	Negativo
					Filamentos Escasos /Bacterias	Bacterias	No aplica	Negativo
015	F	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>Chrysosporium sp.</i>	<i>Keratinophyton hubeiense</i>	Procesado
016	M	1	Pre Trasplante	Pies	Negativo	<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
017	M	1	Donador/Familiar	Pies	No realizado	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	No aplica	Negativo
018	F	1	Post Trasplante	Pies	No realizado	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
019	M	2	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Procesado
				Manos	Filamentos Escasos	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Procesado
020	F	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	Procesado
021	M	3	Donador/Familiar	Pies	Filamentos Escasos /Bacterias	Bacterias	No aplica	Negativo
					Filamentos Abundantes	<i>Scopulariopsis sp.</i>	<i>Scopulariopsis alboflavescens</i>	Procesado
					Filamentos Escasos /Bacterias	Bacterias	No aplica	Negativo
022	M	2	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
					Filamentos Moderados	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
023	F	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
024	F	2	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	Bacterias	No aplica	Negativo
					Negativo	Bacterias	No aplica	Negativo
025	F	1	Donador/Familiar	Pies	Negativo	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
026	F	2	Post Trasplante	Pies	Levaduras Escasas	Bacterias	No aplica	Negativo
					Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
027	F	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado

Continúa en la página siguiente.

Paciente	Sexo	Número de muestras	Tipo de Paciente	Procedencia	Directo	Cultivos	BLAST NCBI	Procesamiento
028	M	7	Post Trasplante	Pies	No realizado	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	No aplica	No procesado
					Filamentos Escasos	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
					Negativo	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
029	M	2	Pre Trasplante	Manos	Filamentos Escasos	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
				Pies	Filamentos Escasos	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
030	F	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
031	F	1	Post Trasplante	Pies	Levaduras Moderadas /Bacterias	Sin crecimiento	No aplica	Negativo
032	M	2	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	Desconocido	<i>Botryotrichum piluliferum</i>	Procesado
						<i>T. rubrum</i>	No aplica	No procesado
					Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
033	M	2	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
034	F	4	Post Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	Negativo	No aplica	Negativo
					Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
035	F	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Procesado
036	M	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado

Continua en la página siguiente.

Paciente	Sexo	Número de muestras	Tipo de Paciente	Procedencia	Directo	Cultivos	BLAST NCBI	Procesamiento
037	M	6	Donador/Familiar	Pies	Filamentos Levaduras	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Levaduras	<i>T. rubrum</i>	No aplica	No procesado
						Trichosporon asahii	No aplica	Procesado
					Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
					Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
Negativo	Negativo	No aplica	Negativo					
038	M	1	Post Trasplante	Pies	Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
039	M	1	Donador	Pies	Bacterias	<i>Kocuria kristinae</i>	No aplica	Negativo
040	M	2	Pre Trasplante	Pies	Negativo	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	Procesado
041	M	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
042	F	1	Pre Trasplante	Pies	Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
043	F	6	Pre Trasplante	Manos	Levaduras Abundantes	<i>Candida albicans</i>	No aplica	Procesado
					Levaduras Abundantes	<i>Candida albicans</i>	No aplica	Procesado
					Levaduras Abundantes	<i>Candida albicans</i>	No aplica	Procesado
			Post Trasplante		Levaduras Abundantes	<i>Candida albicans</i>	No aplica	Procesado
					Levaduras Moderadas	<i>Candida albicans</i>	No aplica	Procesado
					Levaduras Escasas	<i>Candida albicans</i>	No aplica	Procesado
044	M	2	Familiar	Pies	Filamentos Escasos	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
045	M	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Procesado
046	F	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Levaduras	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
047	M	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
048	F	3	Pre Trasplante	Pies	No realizado	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					No realizado	<i>T. rubrum</i>	No aplica	No procesado

Continúa en la página siguiente.

Paciente	Sexo	Número de muestras	Tipo de Paciente	Procedencia	Directo	Cultivos	BLAST NCBI	Procesamiento
049	M	4	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	Bacterias	No aplica	Negativo
					Filamentos Abundantes	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>Fusarium sp.</i>	No aplica	No procesado
				Manos	Filamentos Abundantes	<i>Fusarium sp.</i>	No aplica	No procesado
050	M	3	Donador/Familiar	Pies	Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
051	F	1	Donador/Familiar	Pies	Filamentos Abundantes	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	Procesado
						<i>T. rubrum</i>	No aplica	No procesado
052	F	2	Donador/Familiar	Pies	Filamentos Abundantes	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	No aplica	Negativo
					Filamentos Abundantes	Bacterias	No aplica	Negativo
053	M	1	Donador/Familiar	Pies	No realizado	Negativo	No aplica	Negativo
054	M	3	Post Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	No aplica	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
055	F	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	Bacterias	No aplica	Bacterias
056	M	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Escasos	Negativo	No aplica	Negativo
057	M	1	Post Trasplante	Pies	Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
058	M	3	Post Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	<i>Scopulariopsis sp.</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Procesado
					No realizado	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Negativo	Bacterias	No aplica	Negativo
059	M	1	Pre Trasplante	Pies	No realizado	Negativo	No aplica	Negativo
060	F	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Moderados	Bacterias	No aplica	Negativo
061	M	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Escasos	<i>Streptococcus iniae</i>	No aplica	Negativo

Continua en la página siguiente.

Paciente	Sexo	Número de muestras	Tipo de Paciente	Procedencia	Directo	Cultivos	BLAST NCBI	Procesamiento
062	M	2	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
						<i>E. floccosum</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
						<i>E. floccosum</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>	Procesado
063	M	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
064	M	1	Pre Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. tonsurans</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Procesado
065	M	1	Pre Trasplante	Pies	Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
066	M	1	Pre Trasplante	Pies	Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
067	F	1	Pre Trasplante	Pies	Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
068	M	2	Post Trasplante	Pies	No realizado	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
					Filamentos Abundantes	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
069	F	2	Pre Trasplante	Pies	Levaduras Moderadas	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida haemulonii</i>	Procesado
					Levaduras Escasas	<i>Candida parapsilosis</i>	No aplica	No procesado
070	M	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Abundantes	<i>T. interdigitale</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Procesado
071	M	1	Post Trasplante	Pies	Negativo	Bacterias	No aplica	Negativo
072	M	3	Pre Trasplante	Pies	Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
					Filamentos Escasos	Negativo	No aplica	Negativo
					Filamentos Moderados	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado
073	M	1	Post Trasplante	Pies	Bacterias	Negativo	No aplica	Negativo
074	M	2	Pre Trasplante	Pies	Negativo	Negativo	No aplica	Negativo
						Negativo	No aplica	Negativo
075	M	1	Post Trasplante	Pies	Filamentos Escasos	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Procesado

ANEXO 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE EXTRACCIONES DE ADN MEDIANTE FENOL/CLOROFORMO

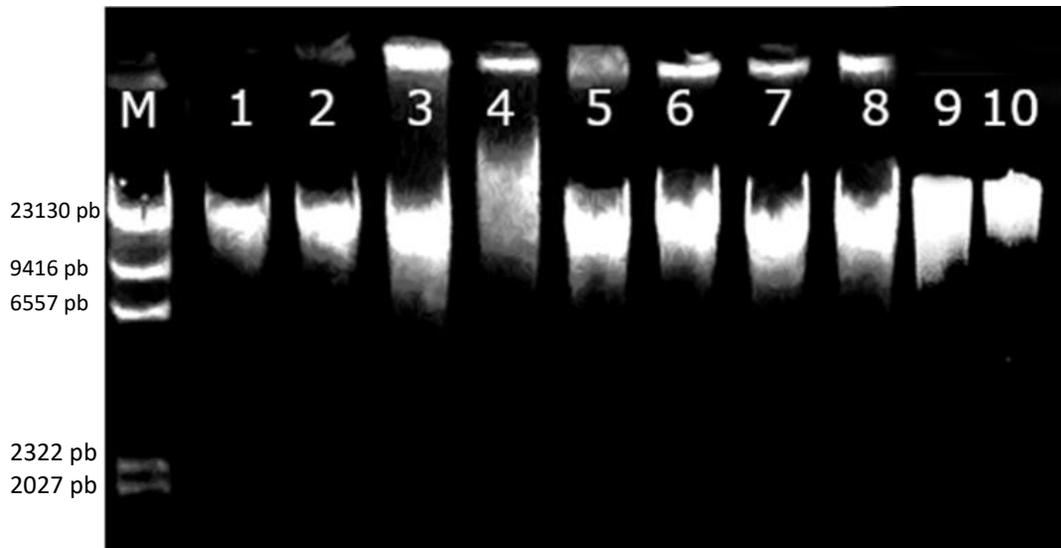


FIGURA 28. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN mediante fenol/cloroformo de algunos aislados de dermatofitos. M representa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 008-2, 009-2, 010-1, 010-2, 028-2, 029-1, 054-2, 054-3, 062.1 T.r. y 062-1 E.f. respectivamente.

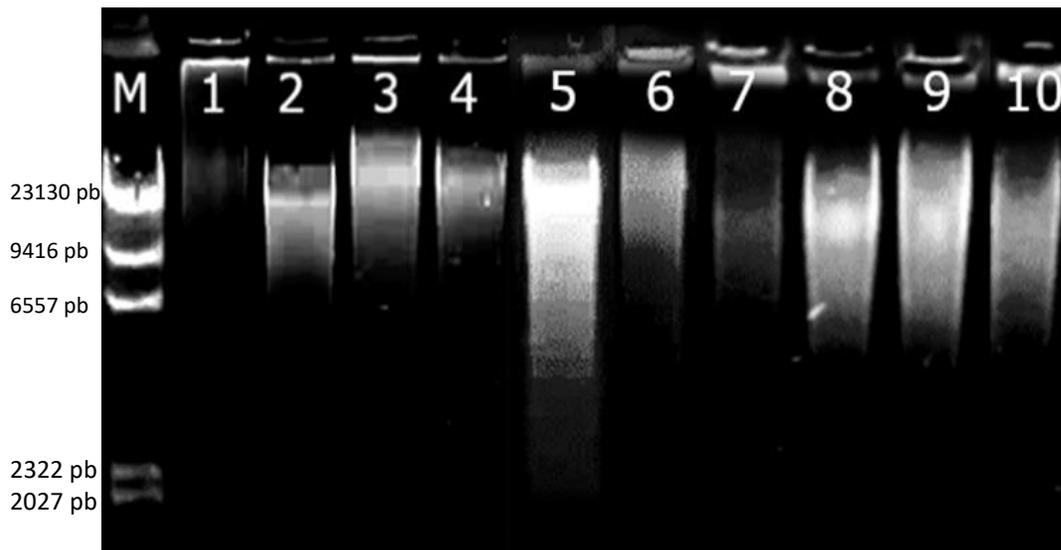


FIGURA 29. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN mediante fenol/cloroformo de algunos aislados de dermatofitos. M representa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 009-4, 034-4, 050-1, 063, 048-1, 048-2, 062-2 E.f., 032-2, 037-1 y 040-1 respectivamente.

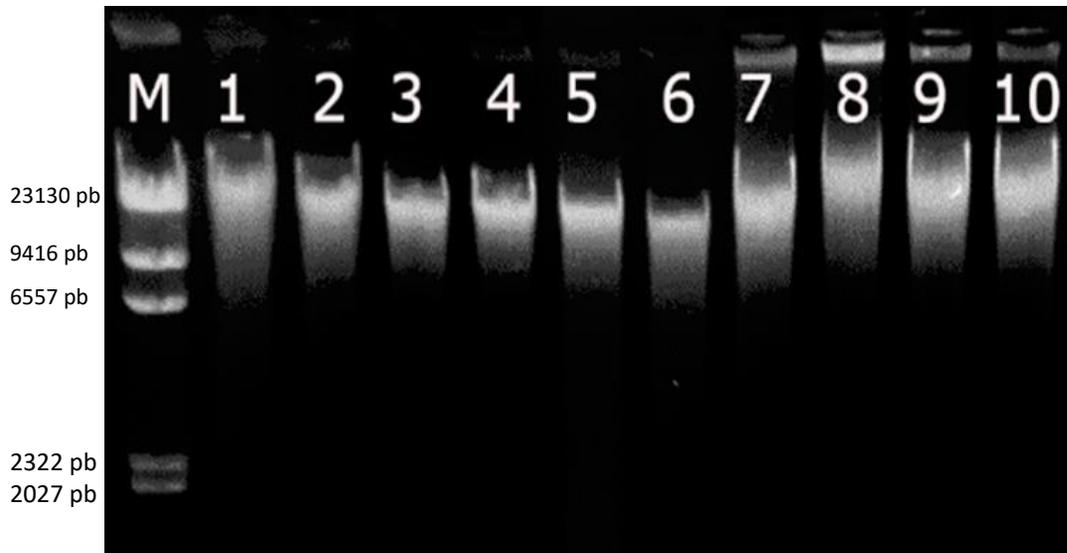


FIGURA 30. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN mediante fenol/cloroformo de algunos aislados de dermatofitos. M representa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 019-1, 019-2, 029-2, 033-1, 037-3, 062-2 T.r., 064, 068-1, 068-2 y 070 respectivamente.

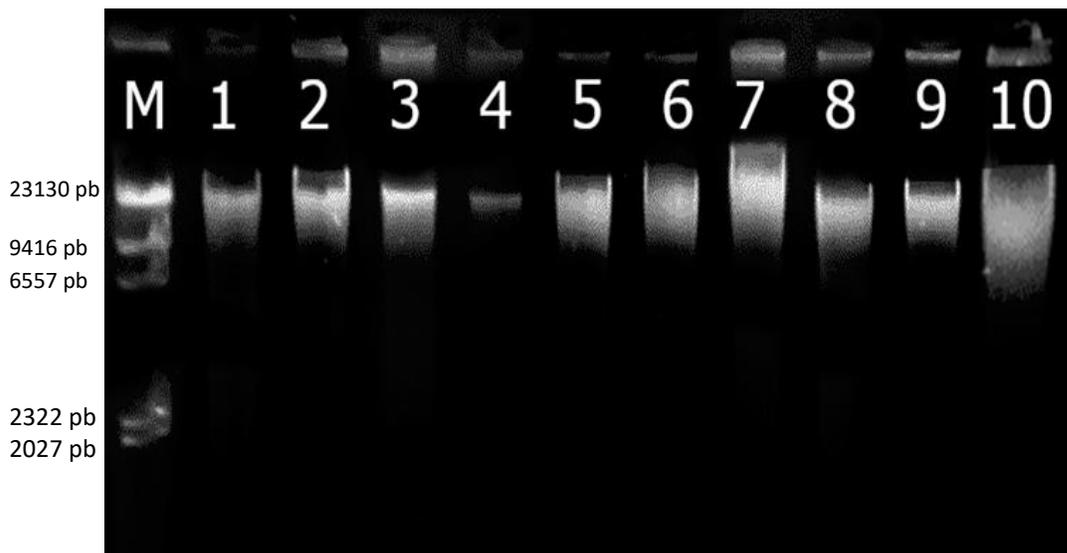


FIGURA 31. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN mediante fenol/cloroformo de algunos aislados de dermatofitos. M representa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 011, 030, 041, 047, 016, 026-2, 028-7, 044-1, 044-2 y 050-2 respectivamente.

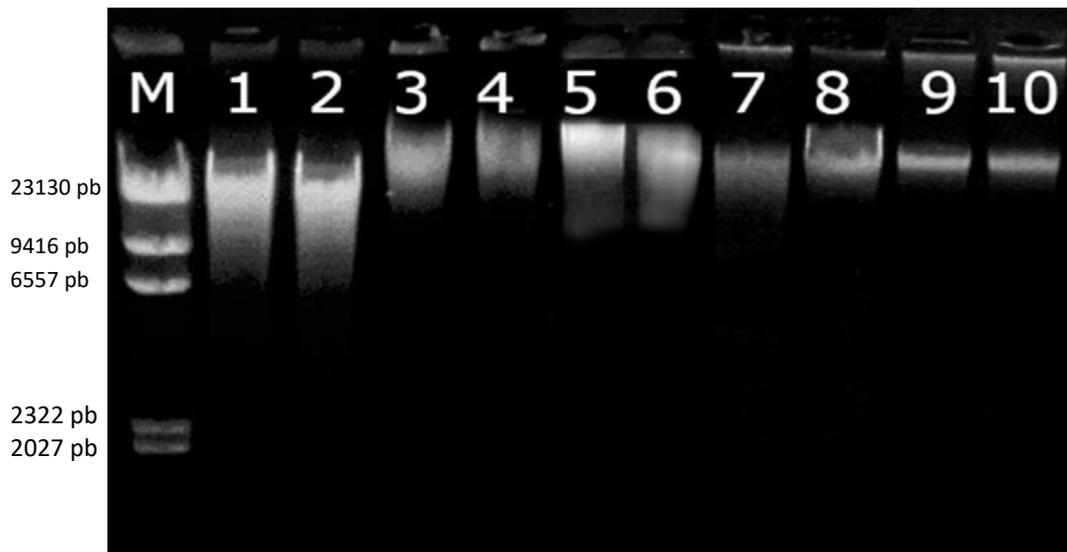


FIGURA 32. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN mediante fenol/cloroformo de algunos aislados de dermatofitos. M representa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 003-2, 007-1, 007-2, 075, 072-3, 027, 035, 036, 046 y 058-2 respectivamente.

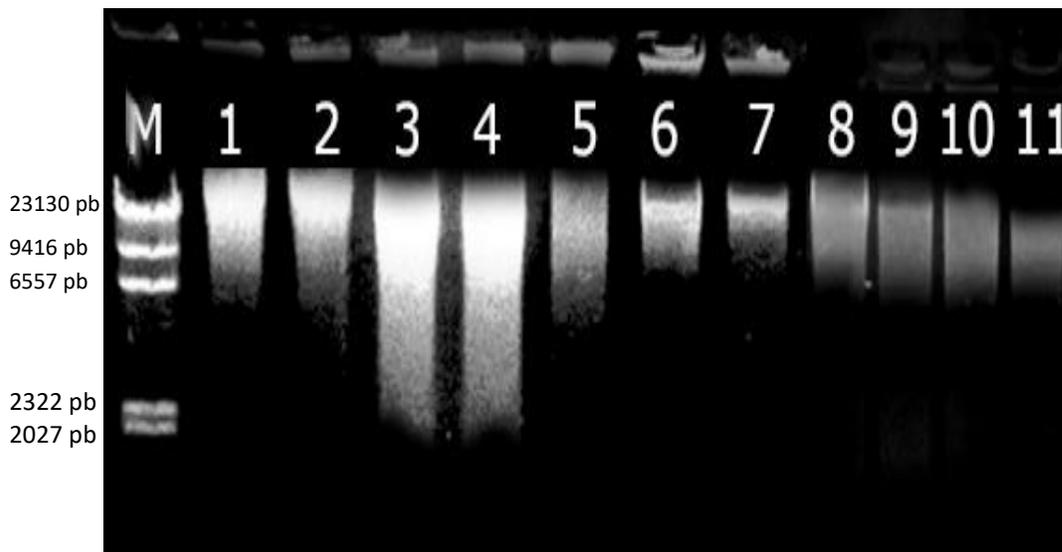


FIGURA 33. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones de ADN mediante fenol/cloroformo de algunos aislados de dermatofitos. M representa el marcador de peso molecular λ DNA/Hind III; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 015, 020, 032-1, 040-2, 045, 049-2, 069, 005, 009-1, 021-2 y 058-1 respectivamente.

ANEXO 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN ITS.

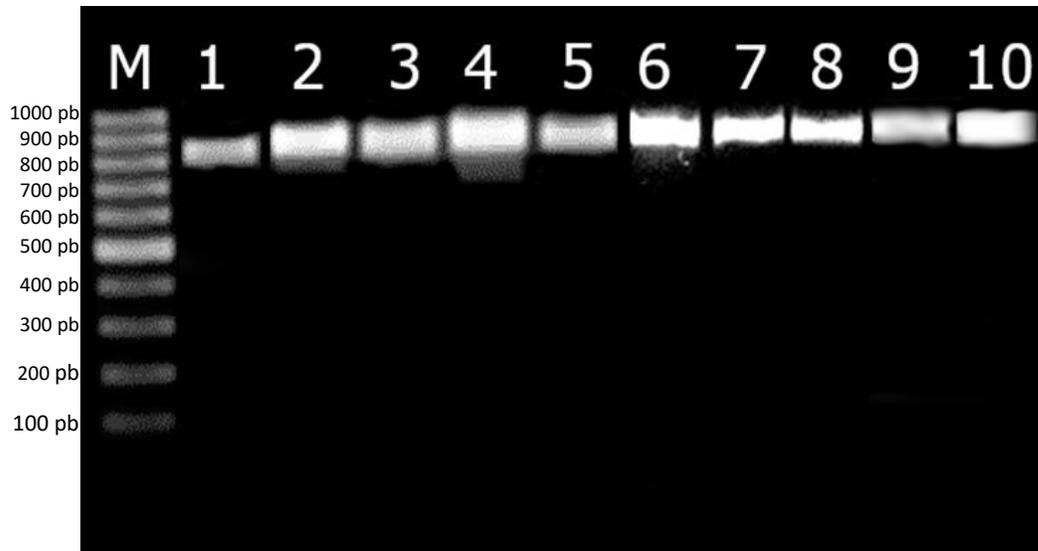


FIGURA 34. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región ITS (850 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 009-2, 010-1, 027, 029-1, 034-4, 008-2, 010-2, 019-1, 040-1, 062-1 E.f. respectivamente.



FIGURA 35. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región ITS (850 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 009-4, 019-2, 026-2, 028-2, 029-2, 030, 032-2, 036, 044-1 y 062-1 T.r. respectivamente.

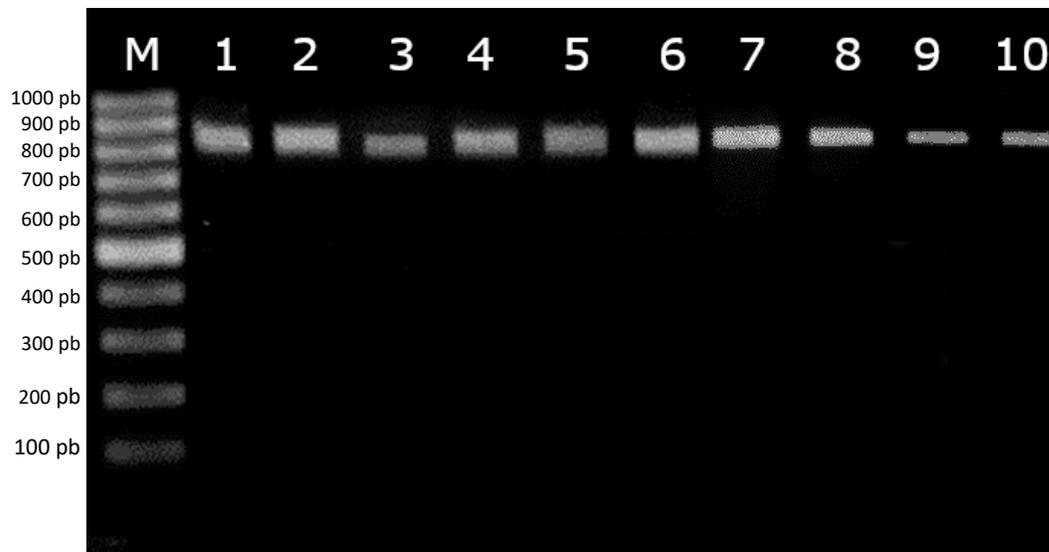


FIGURA 36. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región ITS (850 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 050-1, 058-2, 064, 068-1, 068-2, 070, 007-1, 028-7, 072-3 y 075 respectivamente.

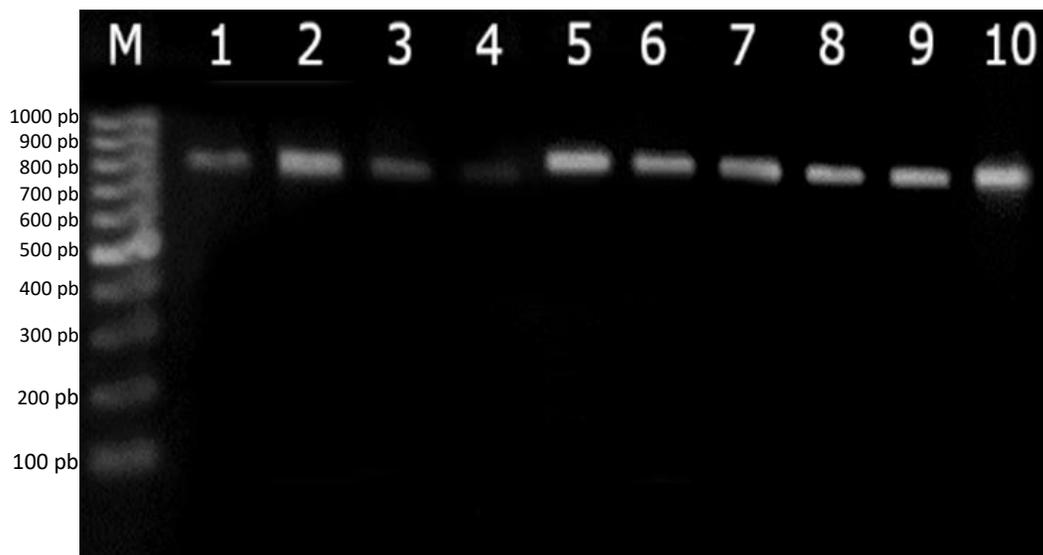


FIGURA 37. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región ITS (850 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 015, 032-1, 040-2, 049-2, 011, 016, 037-1, 041, 047 y 062-2 T.r. respectivamente.

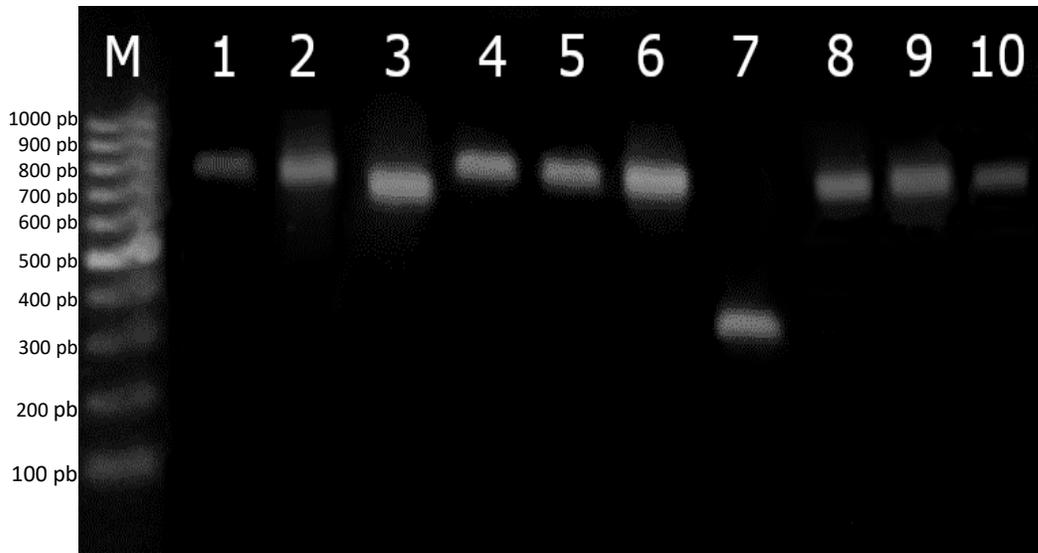


FIGURA 38. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región ITS (850 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 007-2, 035, 046, 048-2, 054-2, 054-3, 069-1, 003-1, 020 y 051-1 respectivamente.

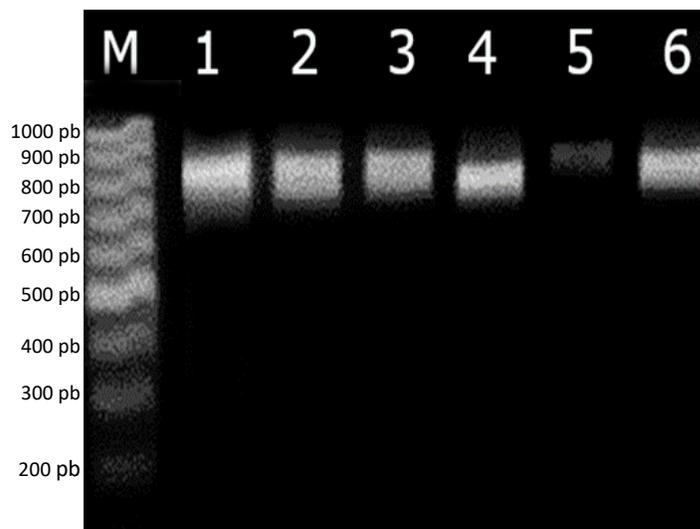


FIGURA 39. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región ITS (850 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 6 corresponden a los aislados: 037-3, 044-1, 048-1, 050-1, 062-2 E.f. y 063 respectivamente.

ANEXO 6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN LSU.

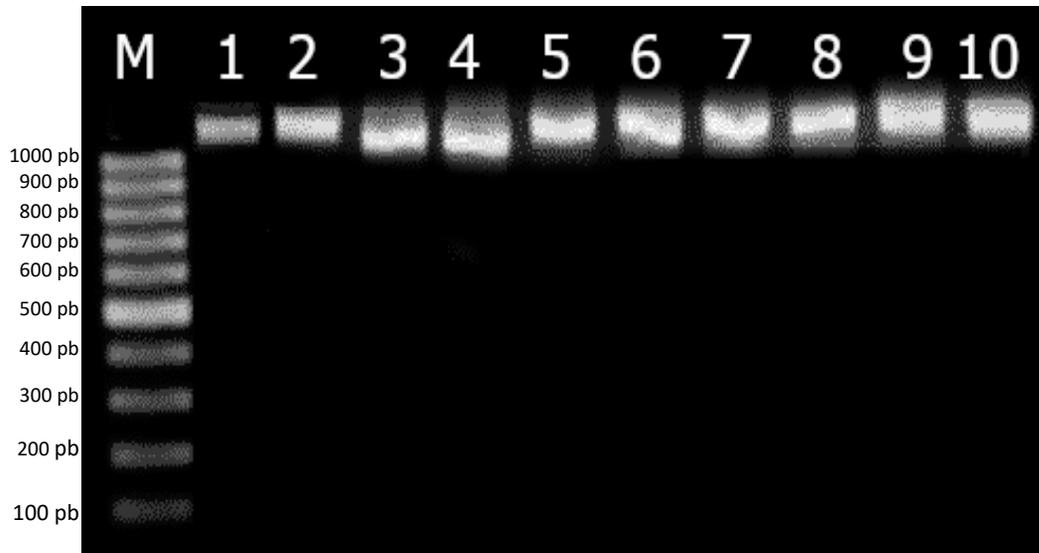


FIGURA 40. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región LSU (1100 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 016, 033-1, 034-4, 040-1, 044-1, 050-1, 058-2, 032-2, 063 y 070 respectivamente.



FIGURA 41. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región LSU (1100 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 008-2, 009-2, 010-1, 011, 030, 037-1, 037-4, 041, 048-1 y 062-1 T.r. respectivamente.

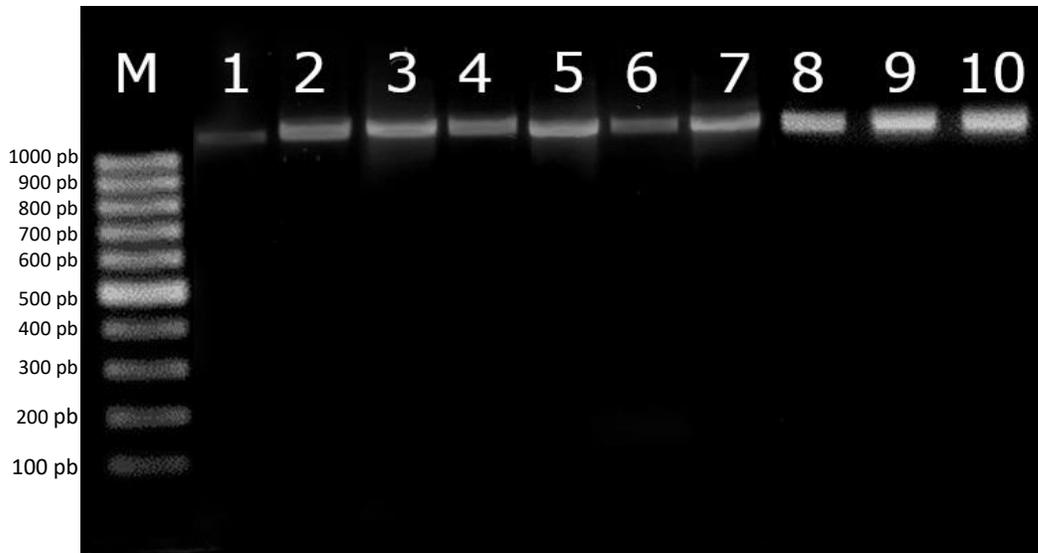


FIGURA 42. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región LSU (1100 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 010-2, 019-1, 029-1, 035, 062-1, 046, 050-2, 064, 068-1 y 068-2 respectivamente.

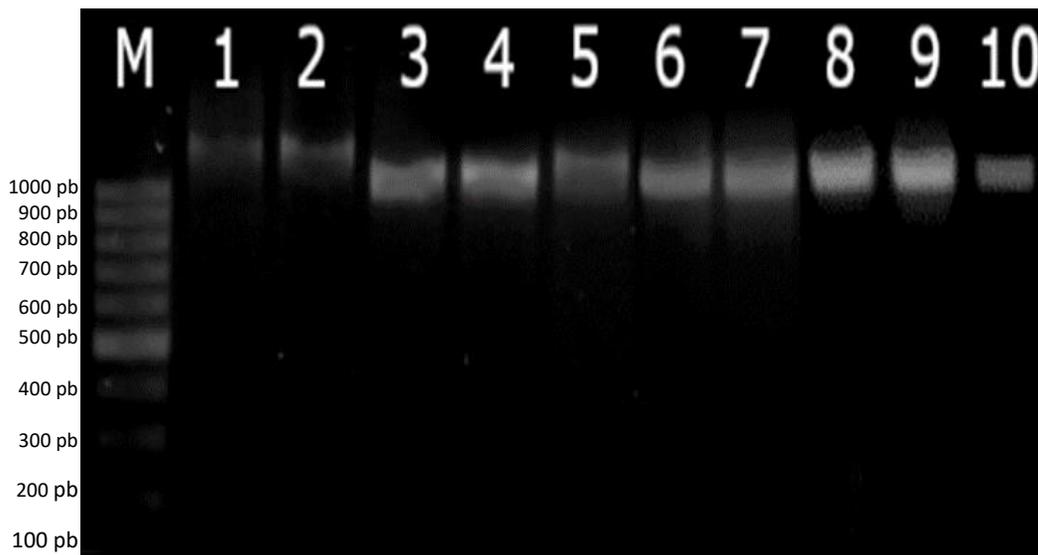


FIGURA 43. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región LSU (1100 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 019-2, 029-2, 054-2, 054-3, 009-4, 028-2, 026-2, 027 y 036 respectivamente.

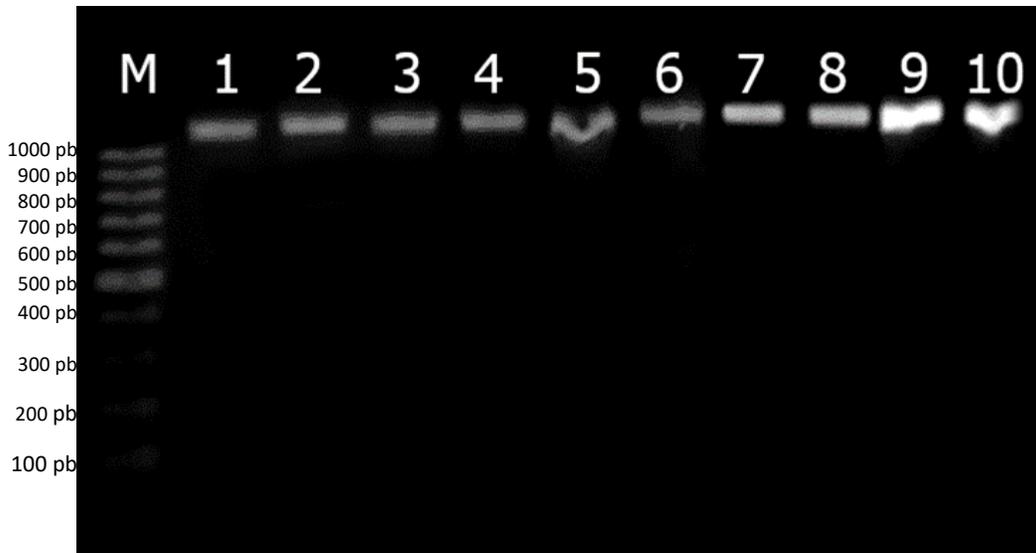


FIGURA 44. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región LSU (1100 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 003, 007-1, 007-2, 028-7, 062-2 T.r., 072-3, 044-2, 075, 048-2 y 062-2 E.f. respectivamente.

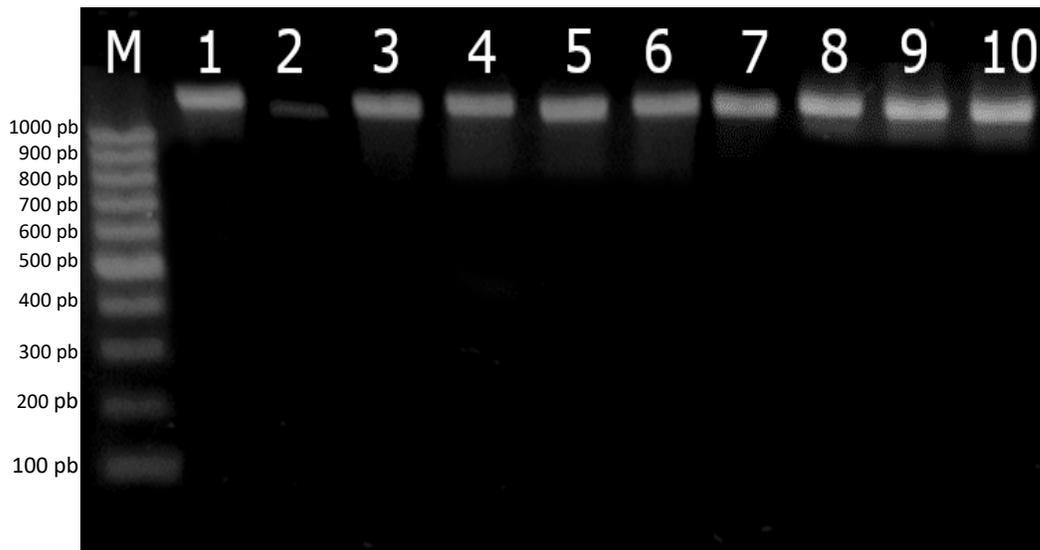


FIGURA 45. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región LSU (1100 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 015, 020, 032-1, 040-2, 045, 049, 058-1, 009-1, 021-2 y 058-1 respectivamente.

ANEXO 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE LA REGIÓN B-TUB.

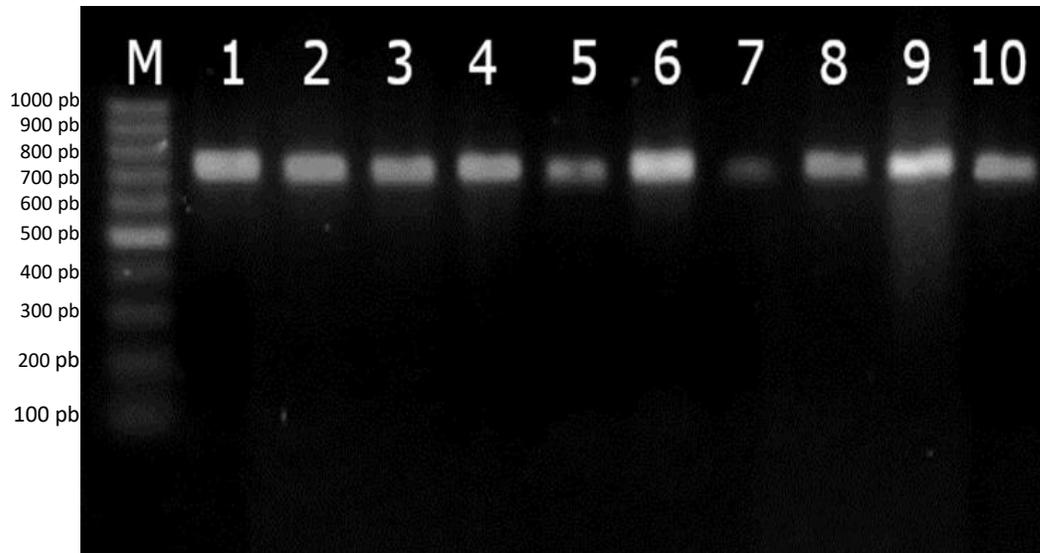


FIGURA 46. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región β -TUB (750 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados: 008-2, 009-2, 010-1, 011, 027, 028-2, 029-1, 030, 032-2 y 037-3 respectivamente.

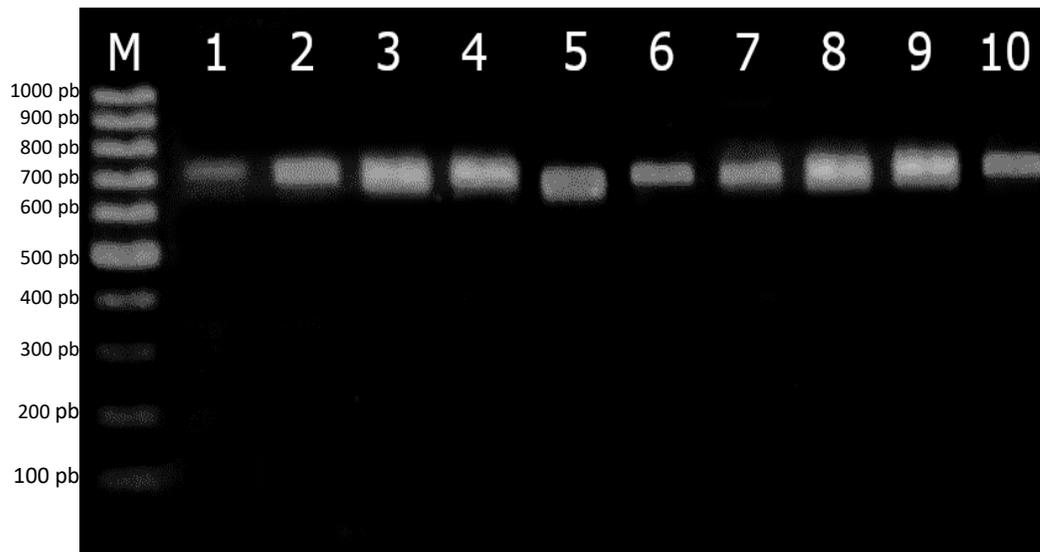


FIGURA 47. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región β -TUB (750 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados 003, 007-1, 019-1, 019-2, 034-4, 044-1, 050-1, 048-1, 062-1 y 068-1 respectivamente.



FIGURA 48. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región β -TUB (750 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados 033-1, 040-1, 041, 063, 070, 050-2, 058-2, 054-2, 062-1 E.f., 072-3 y 075 respectivamente.

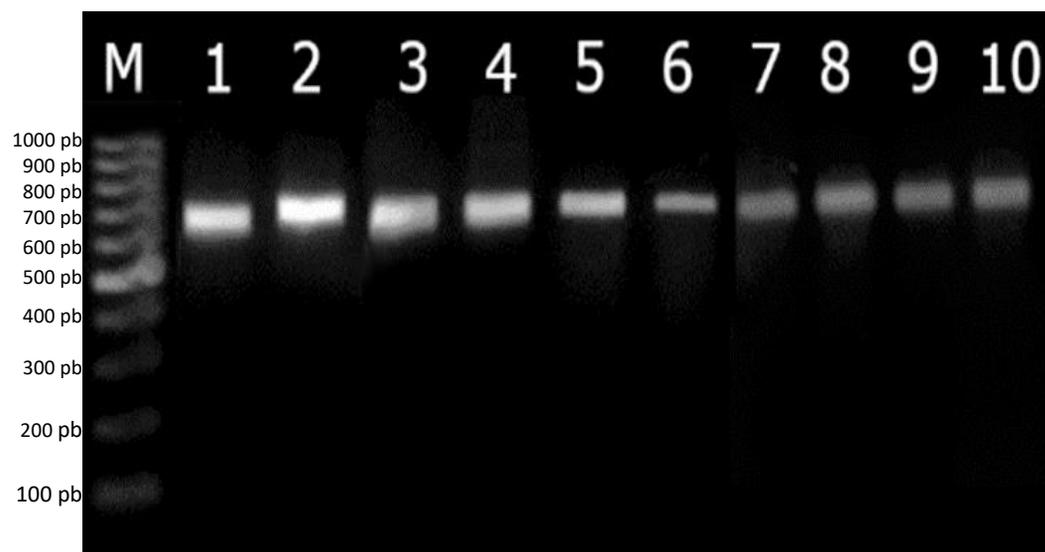


FIGURA 49. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región β -TUB (750 pb). M representa el marcador de peso molecular de 100 pb; Los carriles 1 a 10 corresponden a los aislados 015, 032-1, 040-2, 049-2, 028-7, 035, 041, 046, 047 y 064 respectivamente.