



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"
SERVICIO DE DERMATOLOGÍA

**CORRELACION DEL EXAMEN DIRECTO FIJADO CON
NITROCELULOSA-TOLUENO-FORMALDEHIDO Y TEÑIDOS
CON ACIDO PERYODICO DE SCHIFF CON EL EXAMEN
DIRECTO CON KOH-NEGRO DE CLORAZOL Y CULTIVO PARA
EL DIAGNÓSTICO DE ONICOMICOSIS EN MUESTRAS DE
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLINICO DE ONICOMICOSIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

DERMATOLOGÍA

P R E S E N T A

DRA. TAMAR HAJAR SERVIANSKY



DIRECTOR DE TESIS:
DR. ROBERTO ARENAS GUZMÁN

MÉXICO, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en la Secretaría de Salud, Hospital General Dr. Manuel Gea González; División de Dermatología: Sección de Micología. En colaboración con el Departamento de Investigación, por la Dra. Tamar Hajar Serviansky con la dirección y supervisión de el Dr. Roberto Arenas Guzmán y el Dr. Ramón Felipe Fernández Martínez.

Este trabajo de Tesis con No. PROT 06-92-2011 presentado por el alumno Tamar Hajar Serviansky se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Roberto Arenas Guzmán, y la División de Enseñanza e Investigación a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez con fecha de agosto del 2012, para su impresión final.

Dirección de Enseñanza e Investigación

Dr. Octavio Sierra Martínez

Tutor principal

Dr. Roberto Arenas Guzmán

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Dirección de Enseñanza e Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra. María Elisa Vega Memije
Subdirección de Investigación Biomédica
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefatura de la División de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

CORRELACION DEL EXAMEN DIRECTO FIJADO CON NITROCELULOSA-
TOLUENO-FORMALDEHIDO Y TEÑIDOS CON ACIDO PERYODICO DE SCHIFF
CON EL EXAMEN DIRECTO CON KOH-NEGRO DE CLORAZOL Y CULTIVO PARA
EL DIAGNÓSTICO DE ONICOMICOSIS EN MUESTRAS DE PACIENTES CON
DIAGNÓSTICO CLINICO DE ONICOMICOSIS

Colaboradores:

Dra. Tamar Hajar Serviansky

Dr. Roberto Arenas Guzmán

Dr. Ramón Felipe Fernández Martínez

AGRADECIMIENTOS

A Sergio, la persona que mas amo en este mundo, mi compañero, mi apoyo, tu presencia ha sido y será siempre el motivo más grande que me ha impulsado para lograr todas mis metas; debo agradecer también por tu comprensión y tolerancia en todo momento.

A mi familia, porque gracias a su apoyo y consejos he llegado a realizar la más grande de mis metas: la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir. Porque me impulsaron a seguir siempre adelante aun cuando tuve algunas dudas y tropiezos. Hoy también gracias a ustedes me lleno de orgullo al dedicarles esta realidad tan hermosa que me han permitido alcanzar.

Al Dr. Arenas, quien ha sabido guiar mis pasos hacia el conocimiento y ha sembrado en mí la vocación de servir y de ser cada día mejor en todos los aspectos, siendo esta la etapa más importante de mi vida y agradeciendo todo el esfuerzo y dedicación que me ha brindado a lo largo de esta dura jornada.

Al Dr. Fernández, porque eres de esa clase de personas que todo lo comprende y da lo mejor de sí mismo sin esperar nada a cambio... muchas gracias por tu apoyo incondicional.

A Gaby y Elsitita, gracias por estar siempre ahí, por su apoyo incondicional sin pedir nada a cambio, por las largas horas de pláticas y consejos, por que me han enseñado mas que lo académico, las quiero mucho!!!

A mis compañeras Karen, Jisel, Aleja, Adriana, Priscilla, Patty No hay palabras para describir lo que una amistad representa; es la base de todo. Y eso es lo que ustedes me han hecho sentir, sobre todo, por su apoyo y estímulo que siempre me han brindado. Gracias por su amistad.

Al Dr. Domínguez, la Dra. Hjoyo, Verito, Dany, Dra. Lacy, Dra. Toussaint, Adán, Marcia, José, muchas gracias por formar parte de mi aprendizaje, gracias por su disposición y paciencia durante todo mi entrenamiento.

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------|------|
| RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS | viii |
| RESUMEN..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| 1. ANTECEDENTES..... | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 4 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 6 |
| 4. JUSTIFICACIÓN..... | 6 |
| 5. OBJETIVO..... | 8 |
| 6. HIPÓTESIS..... | 8 |
| 7. DISEÑO..... | 8 |
| 8. MATERIALES Y MÉTODO..... | 9 |
| 9. RESULTADOS..... | 16 |
| 10. DISCUSIÓN..... | 23 |
| 11. REFERENCIAS | 25 |

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Pacientes con y sin onicomicosis | 16 |
| Tabla 2: Comparación entre el ED-PAS y el ED-KOH | 16 |
| Tabla 3: Agentes aislados en el cultivo | 19 |
| Tabla 4: Resultados de la sensibilidad y especificidad del ED-PAS | 19 |
| Tabla 5: Concordancia entre ED-PAS y el ED-KOH | 20 |
| Tabla 6: Concordancia entre el ED-PAS y el cultivo | 21 |
| Tabla 7: Concordancia entre EDPAS con EDKOH y EDPAS con método de cultivo, varianzas, desviación estándar e intervalos de confianza al 95% | 21 |
| Figura 1: Laminilla marcada con el numero asignado | 12 |
| Figura 2: Colocación del esmalte para uñas | 12 |
| Figura 3: Aplicación de la escama tomada por medio de curetaje | 13 |
| Figura 4: ED-PAS: Filamentos a 10 aumentos | 17 |
| Figura 5: ED-PAS: Filamentos a 40 aumentos | 17 |
| Figura 6: ED-PAS: Filamentos a 100 aumentos | 17 |
| Figura 7: ED-KOH: Filamentos | 18 |

RESUMEN

Introducción: La onicomicosis es la enfermedad mas común que afecta las uñas y representa hasta el 50% de las enfermedades de las uñas. Es necesario realizar el diagnóstico correcto con suficiente evidencia en el laboratorio antes de iniciar el tratamiento. Los métodos diagnósticos actuales tienen baja sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de onicomicosis. Se necesita un nuevo método sencillo con alta sensibilidad.

Objetivo: Concordancia del diagnóstico con ED-KOH, cultivo y el ED-PAS para el diagnóstico de onicomicosis, en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis.

Material y Método: Se realizó un estudio observacional, analítico, abierto, prospectivo y transversal. Se tomaron 192 muestras con sospecha clínica de onicomicosis a las cuales se les realizó ED-PAS, ED-KOH y cultivo. Posteriormente se determinó sus sensibilidad, especificidad y concordancia por medio del método estadístico kappa.

Resultados: Se incluyeron 192 muestras. En 152 (79.2 %) se encontraron estructuras fúngicas en al menos una de las tres pruebas realizadas considerándose como casos de onicomicosis y 40 (20.8%) fueron negativas. Con el ED-PAS se observaron filamentos y/o esporas en 143 muestras (94 % de los casos de onicomicosis); 39 de estas fueron negativas al ED-KOH y positivas para el ED-PAS (25.6%). Con el ED-KOH se encontraron filamentos y/o esporas en 113 muestras, (73.8% de los casos de onicomicosis) y 79 negativas (26.2%). Se obtuvieron 35 cultivos positivos (23.02% de los casos de onicomicosis) y 157 cultivos negativos hubo 117 casos de onicomicosis con cultivo negativo (76.9%), de estos la mayoría fueron por *Trichophyton rubrum* (77%). ED-PAS mostró una

sensibilidad de 92.5%, una especificidad de 55.55%, un valor predictivo positivo, de 67.5% y un valor predictivo negativo de 81.6%. Los métodos de ED-PAS y el ED-KOH presentan una concordancia de 0.452537, es decir, coinciden en el 45.2537% de los casos, y con una confianza del 95% su valor teórico se encuentra entre 0.32802 y 0.577053.

Discusión: En la búsqueda de una manera de facilitar el diagnóstico, se ideó un nuevo método para visualizar las estructuras fúngicas, el cual es una fusión de las técnicas existentes para el diagnóstico de onicomycosis. Esta técnica demostró tener alta sensibilidad, además de ser rápida, fácil, de bajo costo. El ED-PAS nos permitió hacer el diagnóstico en 25.6% (39 casos) de los pacientes con onicomycosis, que constituirían falsos negativos si solamente hubieran sido estudiados con los métodos diagnósticos de rutina.

ABSTRACT

Introduction: Onychomycosis is the most common disease affecting nails and presently represents almost 50% of nail disorders. Proper diagnosis with enough sufficient references is necessary before starting any treatment. Current diagnostic methods to diagnose onychomycosis offer low specificity and sensitivity.

Objective: Diagnosis consistency with DE-KOH, culture and DE-PAS to be able to make a proper diagnosis of onychomycosis, in a sample of patients who have been clinically diagnosed with onychomycosis.

Material and Method: A transversal, prospective, open, analytical and observational study was carried out. One hundred and ninety two (192) samples with clinical suspicion of onicomycosis were taken and underwent DE-PAS, DE-KOH and culture testing. Later on sample sensitivity, specificity and concordance were measured using the kappa statistical method.

Results: 192 samples were included. In 152 (79.2 % of cases) fungi structures were found in at least one of the three tests performed and were considered onicomycosis cases; and 40 (20.8%) came out negative. Using DE-PAS, filaments and/or spores were observed in 143 samples (94 % of the onicomycosis cases); 39 of them were negative to DE-KOH and positive to DE-PAS (25.6%). Using DE-KOH filaments and / or spores were observed in 113 samples, (73.8% of the onicomycosis cases) and 79 negative (26.2%). Thirtyfive positive cultures were observed (23.02% of the onicomycosis cases) and in 157 of the negative cultures, 117 onicomycosis cases were found with negative culture (76.9%), of which most had *Trichophyton rubrum* (77%). DE-PAS showed 92.5% sensitivity, and 55.55% specificity, a 67.5% positive predictive value and an 81.6%negative productive value. DE-PAS and DE-KOH methods show 0.452537 concordance, in other words, there is concordance in 45.2537% of the cases, with 95% confidence interval levels, their theoretical value is between 0.32802 and 0.577053.

Discussion: Looking to simplify diagnosis, a new method was developed to visualized fungi structures, which ended up being a merger of existing methods to diagnose onicomycosis. This technique demonstrated having high sensitivity, aside from being fast, easy, and inexpensive. DE-PAS allowed us to diagnose 25.6% (39 cases) of patients suffering onicomycosis, who would have been false negative in case they would have been studied using routine diagnosis.

1. ANTECEDENTES

La onicomicosis es la enfermedad mas común que afecta las uñas y representa hasta el 50% de las enfermedades de las uñas. (2) Esta presente en el 2 al 13% de la población general que aumenta hasta el 40% de las personas a los 70 años. (1) Puede causar dolor y mal estar lo cual puede dar limitaciones físicas. (3) Los dermatofitos son la causa principal de las onicomicosis. El patógeno mas común es *Trichophyton rubrum*, seguido de *Trichophyton mentagrophytes* y *Epidermophyton floccosum*. (3) Conforme progresa la onicomicosis existe acumulo de hiperqueratosis subungueal la cual produce onicodistrofia u onicolisis. Las muestras para realizar el examen directo y el cultivo son tomadas de la hiperqueratosis subungueal. De hecho en la forma clínica de onicomicosis subungueal distal y distrofia total, las cuales son las más frecuentes, es más probable que los cultivos sean positivos si la muestra es tomada de la hiperqueratosis subungueal. (8,9)

Otras entidades que pueden dar cuadros clínicos similares de la onicomicosis incluyen psoriasis, liquen plano y trauma. (1)

Los factores predisponentes para la infección fúngica son el calor, la sudoración, la mala higiene, un secado inadecuado de los pies, el uso de calzado estrecho, de plástico o tenis, las enfermedades vasculares periféricas y depresión de la inmunidad (16). Gitte y cols. demostraron que los pacientes con psoriasis y alteraciones ungueales causadas por el padecimiento tienen una onicomicosis agregada con una frecuencia de hasta el 27.1% (17).

El dermatofito penetra en la lámina ungueal por la queratina blanda del hiponiquio, por el borde lateral de la uña o por la lúnula y afecta después el eponiquio (casi nunca lo hace por la superficie de

la lámina ungueal); posteriormente afecta el lecho y la uña misma por actividad enzimática, formando una red de túneles excavados en la queratina sin invadir la matriz (18).

Es necesario realizar el diagnóstico correcto con suficiente evidencia en el laboratorio antes de iniciar el tratamiento ya que es prolongado y pueden tener efectos adversos severos. (1,2)

En la actualidad los métodos diagnósticos más frecuentemente usados son el examen directo con hidróxido de potasio (ED-KOH) y el cultivo.(2) La biopsia puede realizarse por sacabocado de la lamina ungueal o se pueden procesar fragmentos de la porción distal de la lamina ungueal para observarse al microscopio. (4)

El examen directo con microscopía óptica consiste en la observación de las escamas obtenidas por raspado, colocadas en un portaobjetos con KOH a concentraciones del 10 al 30 %, solo o combinado con dimetilsulfóxido y/o negro de clorazol, y permite la identificación inmediata de los elementos fúngicos. Este es un estudio simple rápido, poco costoso, que requiere mínima infraestructura pero si requiere experiencia y es observador dependiente. Se debe tomar en cuenta que muchas estructuras como fibras, burbujas de aire y grasa pueden imitar estructuras fúngicas y por lo tanto dar falsos positivos. (4)

Las escamas obtenidas se siembran en los medios de cultivo, se incuban a temperaturas de 26 al 30° C por 2 a 4 semanas. Los hongos son identificados por su velocidad de crecimiento, las características de las colonias y el examen directo con azul de algodón. (18) Este método es el único que puede identificar a las especies que causan la onicomiosis. (2,4)

Cuando el ED-KOH y los cultivos son negativos pero la sospecha clínica es muy elevada se sugiere tomar una biopsia ya sea por sacabocado o por fragmentos de uña de la porción distal de la lámina ungueal para confirmar el diagnóstico, la biopsia por sacabocado es una técnica invasiva, dolorosa y puede dejar como resultado alteraciones permanentes en el lecho de la uña. (1) por esta razón actualmente se recomienda realizar el diagnóstico histopatológico analizando fragmentos de recorte de uña de la porción distal de la lamina ungueal teñido con PAS o con Gomori Grocott (1) La evaluación histopatológica de fragmentos de la porción distal de la uña teñida con PAS es un método sencillo en el cual se obtienen resultados en 24-48 horas. Este método se basa en tomar parte de la lamina ungueal, ya sea el borde libre o la queratina subungueal (biopsia de queratina) y se puede realizar sin trauma para el paciente.

Chang A. y cols (7). Reportan que en su experiencia el procesamiento de la lámina ungueal para estudio histológico es técnicamente demandante y consume mucho tiempo. Describen un abordaje modificado para la biopsia de la onicomycosis en donde se basan en el examen histológico de la hiperqueratosis subungueal en vez de tomar biopsia de la lamina ungueal para el diagnóstico de onicomycosis. Los componentes de la hiperqueratosis subungueal fueron procesados de rutina y fijados en parafina. Posteriormente se realizó tinción de PAS. Refieren que la hiperqueratosis subungueal pudo ser procesada de la misma manera en la que es procesada la piel sin las dificultades técnicas que conlleva procesar las laminas ungueales. La limitación de este estudio radica en la necesidad de tomar una suficiente cantidad de muestra de la hiperqueratosis para que pueda ser procesada y fijada en parafina. (7)

2. MARCO TEÓRICO

La sensibilidad de los cultivos para la identificación de dermatofitos se reporta en un 25-80% con falsos negativos de hasta un 30-60%, estos varían dependiendo de la experiencia del laboratorio, de la viabilidad del micro organismo en la muestra colectada, y de la cantidad de muestra tomada. (2,4)

La biopsia de fragmentos de la lámina ungueal se uso por primera vez por Sagher en 1948 (10) y Piper en 1957.

Las investigaciones realizadas por Jillsen y Piper sugieren que la toma de pequeños fragmentos de la porción distal de la lamina ungueal en comparación con la uña completa proveen información histopatológica equivalente para la comprobación de la existencia de estructuras fúngicas.

Existen numerosos estudios que confirman estos hallazgos, Reisberger E-M. y cols. estudiaron 387 uñas de las cuales 156 (40%) fueron positivas en el examen directo con KOH , encontraron cultivos positivos en 100 pacientes (25%), hallazgo histopatológico de la porción distal de la lámina ungueal teñido con PAS positivo en 182 (47%). En 66 de los casos solamente fue positivo el estudio histopatológico con PAS, esto hubiera reportado falsos negativos si solo hubiera sido estudiado con los otros métodos. (4) Weinberg y cols. estudiaron 105 pacientes con examen directo, cultivo y fragmentos de la porción distal de la lámina ungueal teñidos con PAS en donde encontraron una sensibilidad de 92% para PAS, 80% para ED-KOH y 59% para cultivo. (12) Lawry y cols. encontraron que la porción distal de la lámina ungueal teñida con PAS fue positivo en 85% vs ED-KOH 53%. (13) Manjunath M. y cols. Encontraron resultados similares PAS positivo en 76/101 (75%) vs 54/101 (53%) para ED-KOH. (2) Liu y cols encontraron PAS positivo 26/43 (61%) vs 19/43 (44%) para ED-KOH. (14) En un estudio realizado por Moreno-Coutiño y cols encontraron en el resultado

de biopsia de la lámina ungueal teñido con PAS fue positivo en el 100% de los pacientes vs 80% para ED-KOH. (15)

Como se dijo anteriormente una de las grandes desventajas de los estudios que se realizan de rutina para el diagnóstico de la onicomicosis es su falta de sensibilidad y especificidad. Por esta razón se usan en combinación para aumentar su sensibilidad diagnóstica. (6) en un estudio realizado por Karimzadegan-Nia M. y cols. Reportan una sensibilidad del ED-KOH 76.5%, sensibilidad del cultivo 53.2%, sensibilidad de la biopsia de la porción distal de la lámina ungueal teñido con PAS 80.8%. en combinación encontraron sensibilidad de ED-KOH + cultivo 78.8%, sensibilidad de ED-KOH + biopsia 97.8% y sensibilidad del cultivo + biopsia 93.6%. (6)

De acuerdo a lo reportado por Chang A. y cols (7) quienes tomaron biopsia de hiperqueratosis subungueal, fijados en parafina y teñidas con PAS se diagnosticaron 66 casos de onicomicosis de los cuales el 97% fueron positivos en la hiperqueratosis subungueal y el 3% negativos pero positivos en la lamina ungueal.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la concordancia entre el diagnóstico con ED-KOH, cultivo, y el examen directo teñido con PAS (ED-PAS) para el diagnóstico de onicomicosis, en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis?

4. JUSTIFICACIÓN

La onicomicosis es un problema común en la práctica clínica y representa hasta el 50% de las enfermedades de las uñas. (2) Una de las grandes desventajas de los estudios que se realizan de rutina para el diagnóstico de la onicomicosis es su falta de sensibilidad y especificidad. Por esta razón se usan en combinación para aumentar su sensibilidad diagnóstica. (6) La demostración de un agente infeccioso en onicomicosis por medio del examen directo y el cultivo está asociado al 30% de falsos negativos. (4) Por esta razón se necesita un estudio con mayor sensibilidad que también pueda dar un diagnóstico temprano. Se han empezado a usar nuevas técnicas de identificación de DNA para identificar un sinnúmero de patógenos; desafortunadamente estas técnicas son caras y no son accesibles en todos los centros. (2)

El retraso en el diagnóstico de la onicomicosis puede dar como resultado una distrofia ungueal total la cual pudiera en un futuro no recuperar su arquitectura normal a pesar del tratamiento adecuado. El diagnóstico temprano de esta entidad necesita un estudio de laboratorio simple que pueda ser realizado en un hospital con infraestructura común y que tenga una alta sensibilidad. (2)

Debido a que los métodos que se utilizan de rutina para realizar el diagnóstico de onicomicosis son poco sensibles y específicos y que el procesamiento de rutina de la lamina ungueal para estudio histológico es técnicamente demandante y consume mucho tiempo,(7) consideramos que se debe crear un nuevo método diagnóstico que sea más sensible y creemos que realizar un estudio histopatológico de fragmentos ungueales obtenidos por curetaje y fijados con nitrocelulosa-tolueno-formaldehído teñidos con ácido peryodico de Schiff (ED-PAS) para el diagnóstico de onicomicosis de la hiperqueratosis subungueal, puede ser un método diagnóstico, rápido, de bajo costo, sensible e innovador el cual se puede realizar en cualquier hospital que cuente con un departamento de histología.

Al igual que Manjunath M. y cols. se considera que la tinción con PAS puede ser considerada como un método diagnóstico invaluable ya que:

- 1.- Tiene alta sensibilidad
- 2.- Es sencillo y los resultados se pueden obtener en menos de 2 horas
- 3.- El resultado no se ve mermado por los métodos de toma de la muestra
- 4.- Es posible distinguir morfológicamente el grupo de patógenos
- 6.- Puede ayudar a evaluar la eficacia de los antifúngicos después del tratamiento
- 7.- Las laminillas pueden ser guardadas y utilizadas en el futuro

Este estudio se llevo a cabo en el servicio de Micología del Hospital General Dr. Manuel Gea González debido a que se conto con un número suficiente de pacientes que acudieron a realización de examen directo, y no tuvo sesgo de referencia por tratarse de un hospital general.

5. OBJETIVO

Concordancia del diagnóstico con ED-KOH, cultivo y el ED-PAS para el diagnóstico de onicomicosis, en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis.

6. HIPÓTESIS

Si la sensibilidad del cultivo es del 50 %, del ED-KOH del 75%, y de la biopsia de hiperqueratosis subungueal reportado por Chang y cols. es del 97%, el ED-PAS, tendrá una sensibilidad más elevada que el cultivo y que el ED-KOH para el diagnóstico de onicomicosis, por lo que no existirá una concordancia entre las tres pruebas en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis.

7. DISEÑO

Estudio observacional, analítico, abierto, prospectivo y transversal.

El observador del ED-PAS, se mantuvo ciego respecto a los resultados del ED-KOH y del cultivo.

8. MATERIALES Y MÉTODO

8.1 Universo de estudio.

Muestras de pacientes con sospecha clínica de onicomicosis referidos a la Sección de Micología de la División de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

8.2. Tamaño de la muestra. (Velasco-Rodriguez, et al. 2003)

$$n = \frac{\{Z\alpha\sqrt{(1+C)\bar{p}(1-\bar{p})} + Z\beta\sqrt{(Cp_1q_1 + p_2q_2)}\}^2}{(C)IC^2}$$

$Z\alpha$ = desviación normal estandarizada para un nivel de significación de 0.05: 1.64

$Z\beta$ = desviación normal estandarizada para un poder de 90 %: 1.28

C = relación entre los componentes de ambos grupos (1:1) = 1

$$\bar{p} = p_1 + p_2 / 2 = 0.5 + 0.97 / 2 = 0.735$$

p_1 = valor de sensibilidad del grupo 1 = 0.50

$$q_1 = 1 - p_1 = 1 - 0.50 = 0.50$$

p_2 = valor de la sensibilidad del grupo 2 = 0.97

$$q_2 = 1 - p_2 = 1 - 0.97 = 0.03$$

IC = amplitud del intervalo de confianza = 0.1

$$n = \frac{\{1.64\sqrt{(1+1)0.735(1-0.735)} + 1.28\sqrt{(1 \times 0.5 \times 0.5 + 0.97 \times 0.03)}\}^2}{(1)0.1^2}$$

$$n = 189.66 \approx 190$$

Características del grupo de estudio: muestras de pacientes con sospecha clínica de onicomicosis, referidos a la Sección de Micología de la División de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y que sean en una cantidad suficiente para la realización de los tres estudios (ED-KOH, ED-PAS y cultivo).

8.3. Criterios de selección

8.3.1. Criterios de Inclusión.

Muestras con suficiente material para el ED-KOH, cultivo y ED-PAS, obtenidas de pacientes que sean referidos a la Sección de Micología con sospecha clínica de onicomicosis.

8.3.2 Criterios de exclusión

Pacientes con tratamiento sistémico al menos 3 meses y tópico 1 mes antes de realizada la muestra.

Pacientes con otros dx como liquen plano ungueal, psoriasis, distrofias debidas a otras causas.

8.3.3. Criterios de eliminación.

Pérdida de la muestra durante el procesamiento para el ED-KOH, cultivo y ED-PAS.

8.4. Definición de variables

| Variable | Escala |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Cultivo | Nominal: Positivo Negativo |
| Examen directo | Nominal: Positivo Negativo |
| Examen directo teñido con PAS | Nominal: Positiva Negativa |

8.5 Descripción de variables.

Cultivo: una parte de la muestra se sembró en agar micobiótico (con cicloheximida y cloranfenicol). Se dejó incubar de 2 a 4 semanas. Se analizaron las características macroscópicas de la colonia, como superficie, extensión, textura, color y producción de pigmento. Se tomó una muestra de la colonia para realizar un examen directo con azul de lactofenol con microscopía óptica y se registraron las características de las estructuras de reproducción, con lo que se determinó el género y especie del agente causal. Se considero positivo si se encontraban estructuras fungicas y negativo si no los hay.

Examen directo con KOH (ED-KOH): una parte de la muestra se colocó en un portaobjetos con KOH al 20 % y se observó con microscopía óptica, en búsqueda de estructuras micóticas como filamentos, esporas y levaduras. Se considero positivo si se encontraban las estructuras señaladas y negativo si se encontraban ausentes.

Examen directo teñido con PAS (ED-PAS): Una parte de la muestra se colocó en un portaobjetos fijado con esmalte para uñas (nitrocelulosa, tolueno y formaldehído), este se envió al laboratorio de patología para teñir con Acido peryódico de Schiff. Se observó con microscopía óptica por un micólogo experto y cegado a los resultados del ED-KOH y cultivo, en búsqueda de estructuras micóticas como filamentos, esporas y levaduras. Se consideró positivo si se encontraban las estructuras señaladas y negativo si se encontraban ausentes.

8.6. Descripción de procedimientos.

Las muestras de pacientes con sospecha clínica de onicomicosis conservadas entre dos portaobjetos esterilizados serán procesadas de la siguiente manera:

Una parte de la muestra fue empleada para la realización del ED-KOH al 20 %.

Otra parte de la muestra fue sembrada en agar micobiótico. Los cultivos se mantuvieron por 2 a 4 semanas. Se observaron las características de las colonias y se realizó examen directo con azul de lactofenol con el fin de determinar la especie del agente causal.

Otra parte de la muestra fue utilizada para realizar ED-PAS:

Se tomó una laminilla marcada con el número asignado por el departamento de micología



Figura 1

a. Se aplicó esmalte para uñas sobre la laminilla (Figura 2)



Figura 2

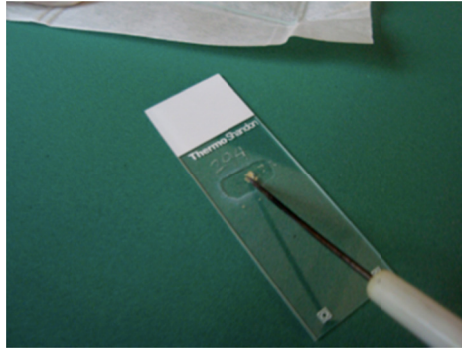


Figura 3

- b. Se aplicó sobre el esmalte la escama tomada de la hiperqueratosis subungueal (Figura3)
- c. Se dejó secar
- d. Se envió al laboratorio de patología para teñir con Acido Peryódico de Schiff
- e. Las laminillas fueron revisadas por un microscopio de luz a 10x, 40x y 100x por un micólogo experto, el cual desconocía los resultados del examen directo con KOH y cultivo, por lo que permaneció ciego durante todo el estudio.

8.7 Captura de datos

Con el objeto de evaluar la sensibilidad y especificidad del PAS se tomó como estándar de oro el cultivo más el examen directo con KOH.

Se realizó la prueba de especificidad y sensibilidad del ED-PAS. (Fisher y Van Belle, 1993).

Se aplicó el teorema de Bayes con el objeto de evaluar el valor predictivo positivo del ED-PAS, es decir, asignar una medida de probabilidad de que un individuo tenga onicomycosis, dado que éste paciente presente en el ED-PAS un resultado positivo y en forma simétrica, con el objeto de evaluar la negatividad del ED-PAS, tal como lo define Fisher y Van Belle; es decir la probabilidad de un individuo sea sano y que el ED-PAS indique que es sano. Este resultado es un método para revisar una probabilidad dada información adicional. Se consideró como probabilidad del evento de que un paciente presente onicomycosis como la prevalencia de este padecimiento en la población, la que fue de 0.02 (2%).

En el proceso de evaluar la concordancia que existe entre el ED-PAS y ED-KOH y ED-PAS y Cultivo la idea es que en la concordancia de los métodos pueden encontrarse casos en que coinciden en un mismo sujeto por causas aleatorias, de forma aleatoria.

El estadístico kapa (k) mide la proporción de casos que coinciden por ambos métodos y esta proporción es ajustada por la proporción de los casos en que los métodos se esperarían que coincidan de forma aleatoria.

La máxima coincidencia de los dos métodos proporcionaría un valor de k igual a uno y si las coincidencias entre los métodos fueran debido al azar entonces el valor de k sería cero. El primero de estos valores indica una concordancia total mientras que valores de cero significan ausencia de concordancia entre ambos métodos. (Fisher and Van Belle Op. Cit.).

A fin de realizar inferencia estadística mediante intervalos de confianza para el valor teórico de concordancia k , se obtuvo la varianza y desviación estandar de este estadístico. (Fisher and Van Belle , Op. Cit.).

El procesamiento de la información se realizó en Excel de Microsoft Office 2003.

8.8 VALIDACIÓN DE DATOS.

Los resultados se refirieron por estadística descriptiva: porcentajes y proporciones, para la caracterización de la población de estudio (muestras de pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis), con sus respectivas variables.

Se realizó prueba con *kappa* para establecer la concordancia entre las muestras de pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis, el resultado del ED-PAS, ED-KOH y el cultivo.

9. RESULTADOS

Se incluyeron 192 muestras de pacientes con sospecha clínica de onicomicosis. A todas las muestras se les realizó ED-PAS, ED-KOH y cultivo. En 152 (79.2 %) se encontraron estructuras fúngicas en al menos una de las tres pruebas realizadas considerándose como casos de onicomicosis y 40 (20.8%) fueron negativas. (Tabla1)

| | | |
|-------------------------|------------|--------------|
| Total de Muestras | 192 | |
| Con onicomicosis | 152 | 79.2% |
| Sin onicomicosis | 40 | 20.8% |

Con el ED-PAS se observaron filamentos a 10x (Figura 4), 40x (figura 5) y 100x (figura 6) y/o esporas en 143 muestras que corresponde 74.4% del total y el 94 % de los casos de onicomicosis; en 49 no encontramos estructuras fúngicas, solamente 9 muestras fueron negativas para el ED-PAS y positivas para el ED-KOH (5.9%); mientras que 39 fueron negativas al ED-KOH y positivas para el ED-PAS (25.6%). (Tabla2)

| | KOH + | KOH- | Total |
|--------------|------------|-----------|------------|
| PAS + | 104 | 39 | 143 |
| PAS - | 9 | 40 | 49 |
| | 113 | 79 | 192 |

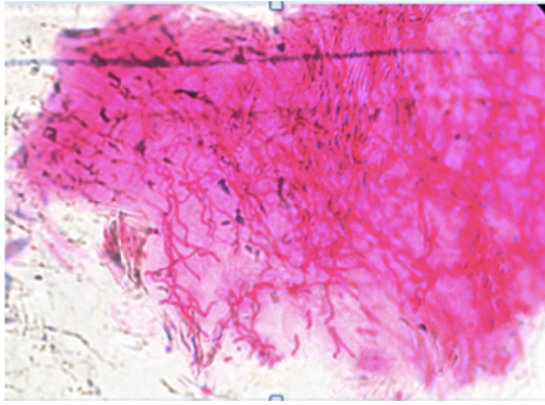


Figura 4

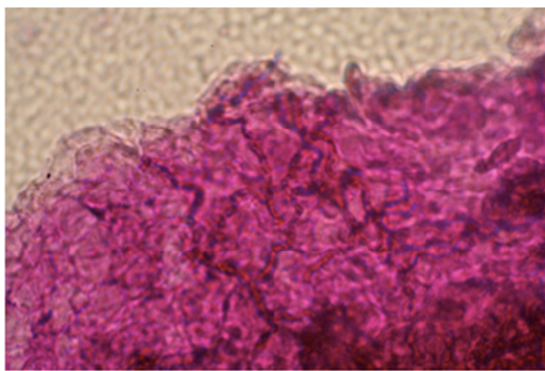


Figura 5

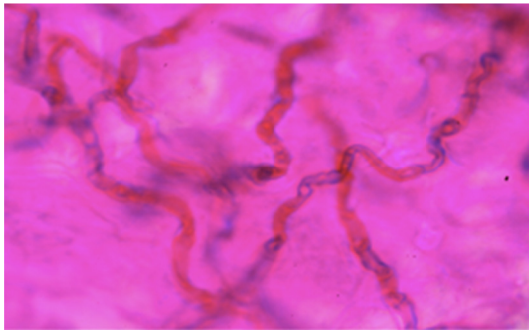


Figura 6

Con el ED-KOH se encontraron filamentos y/o esporas (Figura 7) en 113 muestras, que corresponde al 58.8% del total y al 73.8% de los casos de onicomicosis y 79 negativas que corresponden al 41% del total de la muestra, de las cuales 39 fueron exclusivamente positivas con el ED-PAS que corresponden al 20.8% del total de la muestra y a 26% de los pacientes con onicomicosis.

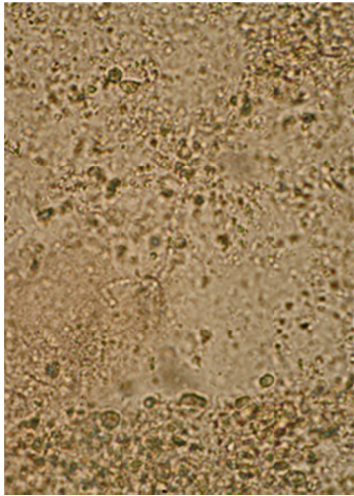


Figura 7

En cuanto a los cultivos se obtuvieron 35 cultivos positivos que corresponde al 18.22% del total de la muestra y al 23.02% de los casos de onicomicosis y 157 cultivos negativos que corresponden al 81.77% del total de la muestra y de los cuales hubo 117 casos de onicomicosis con cultivo negativo (76.9%).

De los casos positivos en 26 (74.28%) muestras se aisló *Trichophyton rubrum*, en 2 muestras (5.71%) se aisló *Trichophyton mentagrophites*, en 6 muestras (17.14%) se aisló *Candida sp.*, en 1 muestra (2.85%) se aisló *Trichophyton rubrum* mas *Candida sp.* (Tabla 3)

Tabla 3
Agentes aislados en cultivo

| Agente Aislados | Numero de pacientes | |
|---|---------------------|--------|
| <i>Trichophyton rubrum</i> | 26 | 74.28% |
| <i>Trichophyton mentagrophytes,</i> | 2 | 5.71% |
| <i>Candida sp</i> | 6 | 17.14% |
| <i>Trichophyton rubrum + Candida sp</i> | 1 | 2.85% |

9.1 Sensibilidad y especificidad del ED-PAS

La sensibilidad del ED-PAS se refiere en la tabla 4

Tabla 4: Resultados de la sensibilidad y especificidad del ED-PAS

| | | ED-KOH + Cultivo | |
|-----|-------|------------------|----|
| | | + | - |
| PAS | PAS+ | 111 | 32 |
| | PAS- | 9 | 40 |
| | Total | 120 | 72 |

De acuerdo a la tabla 13.1 el ED-PAS mostró una sensibilidad de 92.5% y una especificidad de 55.55%.

En cuanto a la capacidad del ED-PAS para evaluar un valor predictivo positivo, es decir, asignar una medida de probabilidad de que un individuo tenga onicomicosis, dado que éste paciente presente un resultado positivo en el ED-PAS, y considerando que la prevalencia de dicha entidad es de un 2% en la población (probabilidad de 0.02), esta resultó de .675, lo que equivale a 67.5% de los casos.

En forma simétrica, con el objeto de evaluar el valor predictivo negativo del ED-PAS, tal como lo define Fisher y Van Belle; es decir la probabilidad de un individuo sea sano y que el ED-PAS indique que es sano es igual a 0.816, lo que equivale a 81.6% de los casos.

9.2 Análisis de concordancia del ED-PAS

La concordancia k de dos pruebas es el grado en que coinciden tanto en los casos positivos como en los negativos. Una concordancia perfecta es igual a uno y ausencia de concordancia es un valor negativo.

9.2.1 Concordancia de ED-PAS con ED-KOH y cultivo

En la Tabla 5 se presenta los resultados de clasificación de los pacientes que cursan con onicomicosis de acuerdo al ED-PAS y el ED-KOH.

Tabla 5 Concordancia entre ED-PAS y el ED-KOH

| | | KOH | | Total |
|-----|-------|------|------|-------|
| | | KOH+ | KOH- | |
| PAS | PAS+ | 104 | 39 | 143 |
| | PAS- | 9 | 40 | 49 |
| | Total | 113 | 79 | 192 |

En cuanto a los resultados de concordancia del ED-PAS y el cultivo obtenidos, en la Tabla 6 se presenta los resultados de clasificación de los pacientes que cursan onicomycosis de acuerdo al ED-PAS y el cultivo.

Tabla 6 Concordancia entre el ED-PAS y el cultivo

| | | Cultivo | | Total |
|-----|-------|-----------|------------|------------|
| | | Cultivo + | Cultivo - | |
| PAS | PAS+ | 34 | 109 | 143 |
| | PAS- | 1 | 48 | 49 |
| | Total | 35 | 157 | 192 |

Los valores de concordancia entre ED-PAS con ED-KOH y ED-PAS con método de cultivo así como sus varianzas, desviación estándar e intervalos de confianza al 95% se muestran en la Tabla 7

Tabla 7 Concordancia entre EDPAS con EDKOH y EDPAS con método de cultivo, varianzas, desviación estándar e intervalos de confianza al 95%

| Métodos | Concordancia | Varianza | Desviación estándar | Intervalo de confianza al 95% | |
|------------------|--------------|----------|---------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | | | Límite de confianza inferior | Límite de confianza superior |
| ED-PAS y ED-KOH | 0.452537 | 0.004036 | 0.063529 | 0.32802 | 0.577053 |
| ED-PAS y cultivo | 0.12604 | 0.00084 | 0.028975 | 0.069253 | 0.182836 |

De acuerdo a la Tabla 7 se aprecia que los métodos de ED-PAS y el ED-KOH presentan una concordancia de 0.452537, es decir, coinciden en el 45.2537% de los casos, y con una confianza del 95% su valor teórico se encuentra entre 0.32802 y 0.577053.

En cambio, entre el PAS y el método de cultivo existe una concordancia pequeña de 0.12604, es decir, coinciden en el 12% de los casos; y con una confianza del 95% su valor teórico se encuentra entre 0.069253 y 0.182836

10. DISCUSIÓN

La onicomicosis es un problema común en la práctica clínica y representa hasta el 50% de las enfermedades de las uñas.(2) El cuadro clínico de la onicomicosis puede ser muy sugestivo pero es insuficiente para realizar un diagnóstico de certeza. La confirmación micológica con técnicas como el ED-KOH y el cultivo es lo que se usa de rutina en nuestro hospital para el diagnóstico. El ED-KOH tiene una sensibilidad de 75-80% (6,12) pero se ha demostrado que es observador dependiente. El cultivo tiene una baja sensibilidad para la identificación de dermatofitos, con falsos negativos de un 30-60%; (2,4) es una técnica no fácilmente disponible, y a pesar de que es el único que identifica el agente causal no se realiza de rutina en muchos centros. La alta frecuencia de resultados falsos negativos nos hace estar en constante búsqueda de un nuevo método diagnóstico que sea fácil, rápido, de bajo costo y con alta sensibilidad.

Existen múltiples trabajos que argumentan que la biopsia de uña ya sea por sacabocado o por toma de fragmentos de la porción distal de la lamina ungueal es un método muy confiable para el diagnóstico, con una sensibilidad del 80.8% al 92% (6,12) sin embargo es técnicamente difícil, tiene morbilidad elevada y consume mucho tiempo.

En el estudio realizado por Chang A. y cols (7) tomaron biopsia de hiperqueratosis subungueal, fijados en parafina y teñidas con PAS de los cuales el 97% fue positivo.

En la búsqueda de una manera de facilitar el diagnóstico, se ideó un nuevo método para visualizar las estructuras fúngicas, el cual es una fusión de las técnicas existentes para el diagnóstico de onicomicosis. Esta técnica demostró tener alta sensibilidad, además de ser rápida, fácil, de bajo costo y que permite que las laminillas puedan ser guardadas.

En este estudio encontramos que el ED-PAS tiene una sensibilidad del 92.5% y una especificidad del 55.55%, su valor predictivo positivo es del 67.5% y su valor predictivo negativo es del 81.6% (tomando en cuenta que la prevalencia es del 2%). Comparado con el ED-KOH en donde encontramos una sensibilidad del 75%.

El ED-PAS nos permitió hacer el diagnóstico en 25.6% (39 casos) de los pacientes con onicomycosis, que constituirían falsos negativos si solamente hubieran sido estudiados con los métodos diagnósticos de rutina; se debe hacer notar que se necesita una observación prolongada y cuidadosa. Representa un beneficio para dichos pacientes ya que sin este método los casos se hubieran quedado sin confirmación diagnóstica y sin tratamiento, permitiendo así que la infección fúngica se extendiera dentro de la misma uña o a otras uñas.

El ED-PAS, tiene una sensibilidad más elevada que el cultivo y que el ED-KOH para el diagnóstico de onicomycosis, por lo que no existe una concordancia entre las tres pruebas en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de onicomycosis. Se encontró concordancia de 45% con el método de *kappa*, con una confianza del 95%, y su valor teórico se encuentra entre 0.32802 y 0.577053.

Las limitantes de este estudio son que se debe contar con un laboratorio de histopatología para el procesamiento de las muestras, se debe contar con un histotecnólogo capacitado y un observador entrenado.

Esta técnica tiene alta sensibilidad, pero al tener limitantes, se recomienda su uso solamente en los casos en los que el ED-KOH y el cultivo sean negativos y la sospecha clínica sea muy alta.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Hussein M, Shaheen IMI, Abdo HM, El-Shafey HAM. Comparative study for the reliability of potassium hydroxide mount versus nail clipping biopsy in diagnosis of onychomycosis. *The Gulf Journal of Dermatology and Venereology* Volume 18, No.1, April 2011
- 2.- Shenoy MM, Teerthanath S, Karnaker VK, Girisha BS, Krishna Prasad MS, Pinto J. Comparison of potassium hydroxide mount and mycological culture with histopathologic examination using periodic acid-Schiff staining of the nail clippings in the diagnosis of onychomycosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* | May-June 2008 226 | Vol 74 | Issue 3
- 3.- D'Hue Z, Perkins SM, Billings SD. GMS is superior to PAS for diagnosis of onychomycosis. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 745–747
- 4.- Reisberger EM, Abels C, Landthaler M, Szeimies RM. Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid– Schiff-stained nail clippings. *British Journal of Dermatology* 2003; 148: 749–754.
- 5.- Lilly KK, Koshnick RL, Grill JP, Khalil ZM, Nelson DB, Warshaw EM. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: A repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests. *J Am Acad Dermatol* 2006;55:620-6.
- 6.- Karimzadegan-Nia M, Mir-Amin-Mohammadi A, Bouzari N, Firooz A. Comparison of direct smear, culture and histology for the diagnosis of onychomycosis. *Australasian Journal of Dermatology* (2007) 48, 18–21

- 7.- Chang A, Wharton J, Tam S, Kovich OI, Kamino H. A modified approach to the histologic diagnosis of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2007;57:849-53.
- 8.- Harvey CK, Richardson A. Techniques for obtaining specimens for culture to confirm onychomycosis. *J Am Podiatr Med Assoc* 2000;90:394-6.
- 9.- Hull PR, Gupta AK, Summerbell RC. Onychomycosis: An evaluation of three sampling methods. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:1015-7.
- 10.- Sagher F. Histologic examinations of fungous infections of the nails. *J Invest Dermatol* 1948; 11: 337-57.
- 11.- Jillson OF, Piper EL. The localization of fungi within human nails. *J Invest Dermatol* 1957; 28: 137-46.
- 12.- Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49:193-97.
- 13.- Lawry MA, Haneke E, Strobeck K, Martin S, Zimmer B, Romano PS. Methods for diagnosing onychomycosis: A comparative study and review of the literature. *Arch Dermatol* 2000; 136:1112-16.
- 14.- Liu HN, Lee DD, Wong CK. KONCPA: a new method for diagnosing tinea unguium. *Dermatology* 1993; 187:166-68.
- 15.- Moreno-Coutino G, Toussaint-Caire S, Arenas R. Clinical, mycological and histological aspects of white onychomycosis. *Mycoses* 2010; 53(2):144-47.

- 16.- Arenas R. Las onicomycosis. Aspectos clínicos, epidemiológicos, micológicos y terapéuticos. Gac Med Mex 1990;126:84-91.
- 17.- Gitte KL, Merete H, Svejgaard E. The prevalence of onychomycosis in patients with psoriasis and other skin diseases. Acta Derm Venereol 2003;83:206-209.
- 18.- Arenas R. Micología Médica Ilustrada 3era Edición, McGraw Hill México D.F. 2008, pp: 61-94.

Este documento fue editado e
impreso en los talleres de



Centro de Impresión Digital

**"EXPERTOS EN IMPRESIÓN Y
ENCUADERNACIÓN DE DOCUMENTOS"**

www.mitesis.mx



19-42-11-62

5619-4378

IUSACELL
04455 5508-1404
copilco@mitesis.mx