

EVALUACIÓN DE LA BIOPSIA UNGUEAL COMO HERRAMIENTA DE APOYO EN EL DIAGNÓSTICO DE ONICOMICOSIS EN UN LABORATORIO DE REFERENCIA DE LA CIUDAD DE MEDELLIN, COLOMBIA.

Verónica Velásquez Agudelo (1), Catalina de Bedout Gómez (2), Jaiberth Antonio Cardona Arias (3) y Luz Elena Cano Restrepo (4)

(1) Microbióloga y Bionalista, Estudiante MSc en Microbiología. Analista de la IPS-CIB Salud, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Grupo de investigación Micología Médica y Experimental, CIB. Medellín, Colombia.

(2) Bacterióloga. Coordinadora del servicio diagnóstico de micología de la IPS CIB-Salud de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Grupo de investigación en Micología Médica y Experimental, CIB. Medellín, Colombia.

(3) Microbiólogo y Bioanalista, MSc Epidemiología. Docente Escuela de Microbiología Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina Universidad Cooperativa de Colombia. Grupo de investigación en Salud y Sostenibilidad, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

(4) PhD en inmunología. Profesora titular, Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia. Jefe del Grupo de investigación en Micología Médica y Experimental, CIB. Medellín, Colombia.

Correspondencia.

Verónica Velásquez Agudelo. Carrera 72 A # 78 B 141, Laboratorio de Micología Médica, IPS CIB-Salud, Medellín, Colombia. Teléfono (57 4) 6051808. Fax (57 4) 4415514. Correo electrónico: veveagu@gmail.com.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La onicomycosis es una enfermedad micótica en uñas, tiene una alta prevalencia, afectando hasta a un 30% de la población mundial. Sus agentes causales se dividen en tres grandes grupos, a saber: dermatofitos, levaduras y mohos no dermatofitos (MND), estos últimos incluyen algunos hongos ambientales. Para su diagnóstico existen pruebas de laboratorio que permiten detectar la presencia de hongos en las uñas y la identificación del agente etiológico implicado. En diferentes reportes de la literatura se propone la inclusión de la biopsia ungueal como una herramienta de apoyo para el diagnóstico de las onicomycosis, debido a la buena sensibilidad que ha demostrado, además de ser una técnica capaz de diferenciar entre invasión y colonización.

OBJETIVO: Evaluar la validez y el desempeño diagnóstico de la biopsia ungueal, en comparación con el KOH, cultivo y la combinación de ambas pruebas, para el diagnóstico de onicomycosis, en un laboratorio de referencia de la ciudad de Medellín, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se le tomaron muestras de uñas a 66 pacientes con sospecha clínica de onicomycosis, a las que se les realizó examen directo (KOH), cultivo y biopsia ungueal con coloración de PAS, a esta última se le evaluó el desempeño, la validez y la eficiencia diagnóstica en comparación con las otras dos pruebas, tomando como estándar el KOH, el cultivo y la combinación de ambas. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y el índice de J. Youden; así mismo, se determinó el grado de correlación entre las pruebas calculando el índice Kappa y el valor Phi.

RESULTADOS: De los 66 pacientes estudiados, el 76% (n=50) fueron mujeres y el 24% (n=16) hombres, con un promedio de edad de 55 años \pm 16 años. El diagnóstico de onicomycosis se confirmó micológicamente en 48 de ellos. La positividad de las pruebas para el KOH, el cultivo y la biopsia ungueal fue de 91,7% (n=44), 85,4% (n=41) y 77,1% (n=37), respectivamente. Hubo 13/41 (31,7%) cultivos con infecciones mixtas y se recuperaron en total 55 aislamientos. En cuanto al agente etiológico: el grupo con mayor número de aislamientos fue el de los MND (24/55 aislamientos, 43,6%) con alta frecuencia de *Neoscytalidium dimidiatum* (11/24, 45,8%); el género con mayor número

de aislamientos fue *Candida* spp (18/55, 32,7%) y la especie más aislada fue *Candida parapsilosis* (13/55, 23,7%), seguida de cerca por *Neoscytalidium dimidiatum* y *Trichophyton rubrum* (11/55, 20,0%). Del 77,1% (n=37) de las muestras positivas para biopsia, el 91,9% (n=34), mostraron presencia de trauma y el 89,2% (n=33) de infección bacteriana. Los análisis estadísticos mostraron una sensibilidad de la biopsia frente al KOH, el cultivo y la suma de ambos de 75%, 76% y 71%, respectivamente, y una especificidad de 82%, 76% y 83%, respectivamente, mostrando una mejor sensibilidad cuando se relacionó con cultivo y una mejor especificidad con la combinación de las otras pruebas.

CONCLUSIÓN: Si bien, los resultados de este estudio muestran un desempeño, validez y eficiencia relativamente bajos para la biopsia ungueal al ser comparada con los otros dos métodos de rutina, es importante resaltar que, a diferencia del KOH y del cultivo, la biopsia si nos permite discriminar entre colonización e invasión. También permite confirmar la presencia del agente etiológico aislado en el cultivo y fortalecer su valor diagnóstico, especialmente en el caso de los hongos no dermatofitos (MND y levaduras). Razones éstas por las cuales, la biopsia sigue siendo considerada una herramienta muy útil como apoyo en el diagnóstico de onicomicosis en un laboratorio de referencia de la ciudad de Medellín, Colombia.

SUMMARY

INTRODUCTION: Onychomycosis is a fungal nail disease of high prevalence, affecting up to 30% of the world population. Its causal agents are divided into three groups, namely: dermatophytes, yeasts and non-dermatophyte molds (NDM), the latter including some environmental fungi. For diagnosis, there are laboratory tests that detect the presence of nail fungus and identify the etiological agent involved. Several studies suggest including nail biopsy as a complementary diagnostic test for onychomycosis due to its high sensitivity and its shown capability of differentiating between invasion and colonization.

OBJECTIVE: To evaluate the validity and diagnostic performance of nail biopsy, as compared to KOH, culture, and the combination of both these tests, for the diagnosis of onychomycosis, in a reference laboratory in the city of Medellin, Colombia.

MATERIALS AND METHODS: Nail samples were taken from 66 patients with clinical suspicion of onychomycosis, which underwent direct examination (KOH), culture and PAS stain nail biopsy. The latter was assessed for diagnostic performance, validity and efficiency, as compared to the other two tests, using KOH, culture and the combination of both these tests as standards. Sensitivity, specificity, predictive values, and the J. Youden index were calculated. Likewise, the degree of correlation between the tests was determined by calculating the Kappa index and Phi value.

RESULTS: Of the 66 patients studied, 76% (n = 50) were women and 24% (n = 16) were men, with an average age of 55 ± 16 years. The diagnosis of onychomycosis was confirmed in 48 of them. Mycological tests results were positive for KOH: 91.7% (n=44), culture: 85.4% (n=41), and nail biopsy: 77, 1% (n=37), respectively. There was 13/41 (31.7%) cultures with mixed infections and a total of 55 isolates were recovered. As for the etiologic agent: the group with the highest number of isolates was the NDM (24/55 isolates, 43.6%) with a high frequency of *Neoscytalidium dimidiatum* (11/24, 45.8%); the genre with the highest number of isolates was *Candida* spp (18/55, 32.7%) and the species with most isolates was *Candida parapsilosis* (13/55, 23.7%), followed closely by *Neoscytalidium dimidiatum* and *Trichophyton rubrum* (11/55, 20.0%). From the 77.1% (n=37) of the positive samples for biopsy, 91.9% (n=34) showed the presence of trauma and 89.2% (n= 33) of bacterial infection. Statistical analysis showed a sensitivity of biopsy against KOH, culture, and the combination of the latter two tests of 75%, 76% and 71%, respectively, and a specificity of 82%, 76% and 83%, respectively, showing better sensitivity when compared to culture and better specificity when compared with the combination of two other tests.

CONCLUSION: Although the results of this study show a relatively low performance, validity and efficiency for nail biopsy when compared to the other two routine tests, it is

important to note that, unlike KOH and culture, biopsy does allow us to discriminate between colonization and invasion. It also allows us to confirm the presence of the etiologic agent isolated by culture and strengthen its diagnostic value, especially in the case of non-dermatophyte fungi (NDM and yeasts). These are the reasons why biopsy is still considered a very useful support tool for the diagnosis of onychomycosis in a reference laboratory in the city of Medellin, Colombia.

Palabras Clave: onicomycosis, biopsia ungueal, KOH, cultivo, evaluación de pruebas diagnósticas.

INTRODUCCIÓN

La onicomycosis es una infección de las uñas que se presenta por la invasión de estructuras micóticas en la lámina ungueal. Corresponde aproximadamente al 50% de los desórdenes ungueales (Zuluaga *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2010; Relloso *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2012) y una distribución mundial que varía entre el 2% y el 30% (Mendoza *et al.*, 2012; Gupta & Simpson, 2013; Fernández *et al.*, 2014), demostrando una amplia variabilidad en su ocurrencia, la cual está influenciada por factores como el género, la edad, la ocupación, la actividad física y las enfermedades de base del hospedero (Thomas *et al.*, 2010; Gupta & Simpson, 2013; Mejía *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014 y Ameen *et al.*, 2014).

La presentación clínica de la onicomycosis es variada y está clasificada según el sitio anatómico de la lámina ungueal afectado en:

a) Onicomycosis subungueal distal: Se caracteriza por un desprendimiento (onicolisis) de la lámina ungueal, con cambio de color que va desde blanco hasta café o negro, una producción excesiva de células ungueales (hiperqueratosis) y, en casos crónicos, hay un engrosamiento de dicha lámina ungueal, esta es la presentación clínica más frecuente.

b) Subungueal proximal: En esta forma clínica, la onicolisis se presenta en la zona proximal de la uña, y generalmente hay perionixis (inflamación de tejidos blandos

alrededor de la uña), esta forma clínica se ha descrito en estudios anteriores como marcador de HIV.

c) Endonix: Esta presentación demuestra la aparición de una mancha blanca difusa, donde no hay hiperqueratosis ni onicolisis.

d) Superficial blanca: Se caracteriza por una distribución del hongo en la superficie de la lámina en cualquier punto, se observan manchas blancas bien delimitadas.

e) Onicodistrofia total: Esta presentación es la fase final de todas las presentaciones, con un compromiso total de la lámina ungueal, generalmente con engrosamiento y pigmentación, masas queratósicas y destrucción de la uña (Ballestee *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2010; Relloso *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2012).

Los agentes causales de la onicomycosis se dividen en tres grandes grupos, a saber: Grupo I, conformado por los hongos dermatofitos; Grupo II, corresponde a las levaduras y Grupo III que incluye los mohos no dermatofitos (MND) y hongos ambientales. Las especies más frecuentes en el grupo de los dermatofitos son: *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*; dentro de las levaduras se incluyen diferentes especies de *Candida* y los géneros de MND incluyen especies de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Scytalidium*, *Neoscytalidium dimidiatum*, entre otros (Zuluaga. *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2010; Relloso *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2012; Mejía *et al.*, 2013).

Las levaduras y los MND presentan dificultad en el diagnóstico, ya que pueden tratarse de microorganismos colonizadores transitorios o contaminantes del cultivo, en su mayoría no poseen actividad queratinolítica como los dermatofitos y generalmente no se comportan como patógenos primarios, por lo que es difícil darles un valor diagnóstico (Del Palacio *et al.*, 2001; Cavallera *et al.*, 2006; Ameen *et al.*, 2014). Para el caso de los mohos ambientales es importante cumplir algunos criterios como aislar el agente en dos cultivos diferentes, estar presente en más de 5 puntos de siembra, en medios de cultivo diferentes, y no tener aislamientos de un patógeno primario, aunque cabe la posibilidad de aislar tanto dermatofitos como hongos no dermatofitos, dando lugar a una infección mixta (Del Palacio *et al.*, 2001; Cavallera *et al.*, 2006). En relación a

las levaduras es importante determinar la cantidad para darle el adecuado valor diagnóstico (Daniel *et al.*, 1998; Cavallera *et al.*, 2006).

La biopsia ungueal es una herramienta en la que es posible observar la presencia de estructuras fúngicas, así como el grado de invasión de las mismas (Roderick & Baran, 2012); también puede sugerir si se trata de invasión por dermatofitos, levaduras o MND (Chang *et al.*, 2007; André *et al.*, 2013). Es por esto que ha sido considerada como un apoyo importante en el diagnóstico de onicomicosis, pues permite demostrar, de forma visual, si el aislamiento corresponde a un microorganismo colonizador o invasor. Otra característica de la biopsia ungueal es el incremento de la sensibilidad que aporta al diagnóstico tradicional de las onicomicosis, hay estudios que reportan un incremento de la sensibilidad hasta un 97% cuando se combinan la biopsia ungueal con el KOH y el cultivo (Campbell & Adam, 2012).

A pesar de las ventajas que ofrece la biopsia ungueal en términos de: detección de agentes etiológicos, diferenciación entre colonización e invasión y el incremento de la sensibilidad en combinación con KOH y cultivo, en la literatura científica persisten limitaciones relacionadas con la evaluación de su validez, desempeño y eficiencia diagnósticas, dado que algunas de las publicaciones disponibles en este tópico presentan limitaciones como la falta de una evaluación diagnóstica completa, en la medida que solo se presentan datos de sensibilidad, especificidad o valores predictivos (Gianni *et al.*, 2001; Reisberger *et al.*, 2003; Lilly *et al.*, 2006; Zanardi *et al.*; 2008), obviando parámetros de evaluación más robustos, como los cocientes de probabilidad, el índice de J de Youden y la eficiencia global de la prueba. Además de incluir esta prueba dentro de la prueba de referencia, lo que permite la obtención de resultados sesgados (Abraira., 2006).

Sumado a lo anterior, en Latinoamérica y en el mundo en general, son exiguos los estudios que hacen una evaluación completa y no sesgada de la biopsia ungueal para el diagnóstico de la onicomicosis; por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la validez, el desempeño y la eficiencia de la biopsia ungueal en el diagnóstico de onicomicosis en un laboratorio de referencia de la ciudad de Medellín, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio:

Evaluación de pruebas diagnósticas.

Población de pacientes:

A los pacientes con sospecha clínica de onicomicosis que asistieron al servicio diagnóstico especializado de Micología Médica y Experimental de la IPS CIB-Salud de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), entre los meses de julio y septiembre de 2015, se les invitó a participar en el estudio y se les explicó en qué consistía el procedimiento; aquellas personas que aceptaron participar, diligenciaron un consentimiento informado.

Una vez el paciente aceptaba participar del estudio, se le tomaron las muestras biológicas para realizar: examen directo con KOH, cultivo para hongos y biopsia de uña. La toma de muestra y los procedimientos para el procesamiento de las mismas se hicieron siguiendo los protocolos preestablecidos en la CIB.

Examen directo con KOH:

Se realizó un raspado con bisturí estéril para recolectar los detritus ungueales de la zona subungueal; este material fue depositado en una lámina y se le adicionó hidróxido de potasio (KOH) al 10% con tinta negra y azul Parker©, se observó al microscopio y se informó la presencia o ausencia de estructuras micóticas.

Cultivo para hongos:

Las muestras se sembraron en cuatro medios de cultivo diferentes, a saber: agar Mycosel (BBL), agar Sabouraud (BBL), agar hojuelas de papa y CHROMagar Candida®, con el fin de incrementar la posibilidad de aislar el (los) agente(s) infeccioso(s). Además, el CHROMagar en particular permite detectar infecciones mixtas producidas por más de una especie de *Candida*.

Una vez sembrados, los cultivos fueron incubados a 25°C, revisados macroscópicamente cada semana, durante 4 semanas, en busca de colonias sospechosas de hongos de importancia como agentes de onicomycosis y, en caso de ser positivos, se procedió a identificar el microorganismo a nivel de género y hasta donde fuese posible su especie. Es importante resaltar que al momento de tener un aislamiento por un MND o una levadura, se tuvieron en cuenta los criterios mencionados para estos grupos particulares, con el fin de dar un valor diagnóstico adecuado.

Biopsia de uña:

Para realizar la toma de la biopsia ungueal se hizo un corte de la uña en su porción más afectada con corta uñas estéril. Para el estudio patológico de la uña, se siguió el protocolo del servicio de Dermatopatología del Centro Hospitalario Universitario de Lieja (CHU), Bélgica, donde una de las autoras (CdeB) recibió entrenamiento en la realización de este protocolo, el cual fue transferido a la CIB. Para este proceso, se incluyó la uña en agar granuloso a una concentración de 1,5gm/100ml, marca Difco®, después se depositó en una solución de formol al 10%. El proceso de inclusión en parafina, corte, fijación y coloración con Ácido Periódico de Schiff (PAS), se realizó en un laboratorio de patología de la ciudad de Medellín, externo a la CIB.

Control de sesgos:

La lectura de las placas coloreadas se llevó a cabo de manera independiente por dos observadores diferentes (análisis de reproducibilidad intra e interobservador), para evitar errores de clasificación atribuibles al lector, de igual forma se desconocían los resultados de las otras dos pruebas, para reducir el sesgo de enmascaramiento en la interpretación de las pruebas, además la prueba evaluada no se incluyó dentro del estándar, esto evita sesgos de verificación parcial (Abraira., 2006).

Selección de variables a evaluar:

Las variables que se tuvieron en consideración al momento de la lectura fueron: la presencia de estructuras fúngicas (blastoconidias y/o hifas), presencia de bacterias, y

porción de la lámina ungueal afectada (interna, media, externa, compromiso total o negativo; con esta información fue posible interpretar si había colonización o invasión por parte del agente infeccioso) y la presencia de signos que denotaran trauma.

Elaboración de base de datos:

Para ello se tuvieron en cuenta variables sociodemográficas como: género, edad, presentación clínica de las lesiones ungueales que presentaban los pacientes y los resultados de los tres procedimientos micológicos. Adicionalmente, y con el fin de realizar los análisis estadísticos que permitieran hacer la comparación entre los tres métodos diagnósticos aquí empleados, se construyeron otras variables como: KOH positivo/negativo, cultivo positivo/negativo y PAS positiva/negativa, también el % de individuos que tuvieron KOH y/o cultivo positivo y el % de individuos que tuvieron las tres pruebas positivas.

Para la lectura de las biopsias se tuvieron en cuenta las siguientes variables: presencia o ausencia de hongos, invasión, colonización u onicodistrofia, presencia de bacterias y presencia de trauma, esto da cuenta del % de individuos que tenían infección con hongos y bacterias, el % de individuos que presentaron trauma, y la interpretación del compromiso invasivo.

En este estudio, se definió como un caso de onicomycosis, aquel paciente que presentara sospecha clínica de onicomycosis y tuviese KOH y/o cultivo positivo; sin embargo, los análisis estadísticos se calcularon evaluando biopsia ungueal frente a las otras dos pruebas, junto con la combinación de ambas.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó con los programas SPSS y Epidat versión 3.1, se hizo un análisis estadístico descriptivo de las variables sociodemográficas y microbiológicas, se determinó el índice Kappa y el valor Phi para determinar el índice de concordancia con cada una de las comparaciones posibles (KOH vs biopsia, cultivo vs biopsia, KOH

vs cultivo y biopsia vs KOH+cultivo). Para evaluar el desempeño, la validez y la reproducibilidad de la biopsia frente a cada prueba se determinó como estándar el KOH, el cultivo y la combinación de ambos, por lo que fue necesario realizar cada análisis cada vez que se varió el estándar. Para calcular la validez se determinó un valor de sensibilidad, especificidad, y el índice de J Youden. Para calcular su desempeño se determinó la prevalencia y los valores predictivos positivo y negativo.

RESULTADOS:

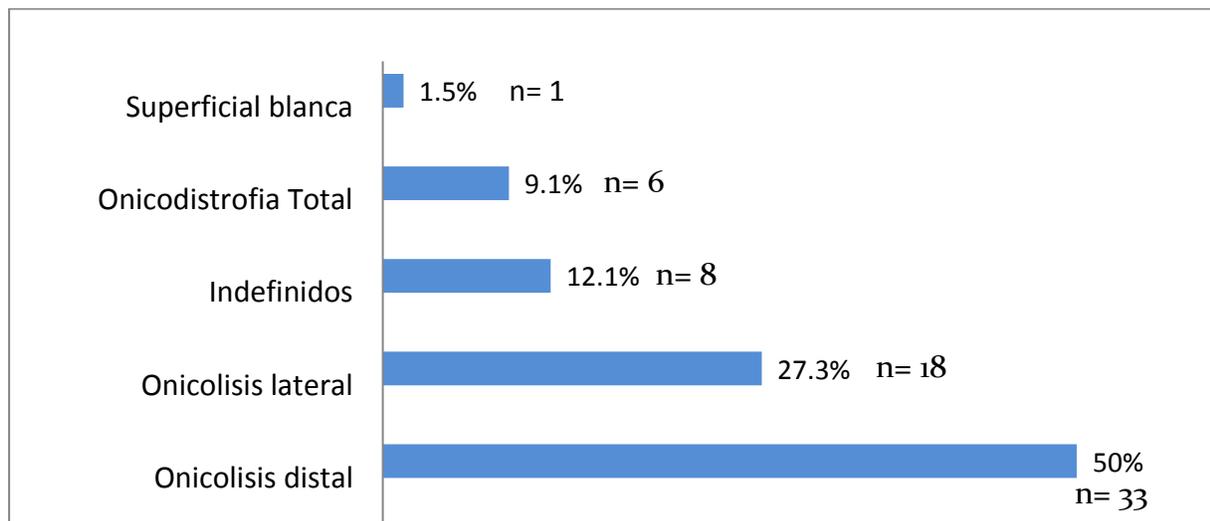
Se estudiaron 66 pacientes con sospecha clínica de onicomycosis a quienes se les realizaron los tres procedimientos diagnósticos. El 76% (n=50) de los pacientes correspondieron a mujeres y el 24% (n=16) a hombres, la edad promedio fue de 55 ± 16 años, con un mínimo de 19 y un máximo de 87 años.

El criterio de positividad para este estudio, fue tener cultivo y/o KOH positivos, por lo tanto se confirmó el diagnóstico en 48/66 pacientes (72,7%).

Tipo de onicomycosis:

Se observó que la presentación clínica más frecuente fue la subungueal distal con un 50% (n=33), seguida de la distal lateral con un 27% (n=18), la menos común fue la superficial blanca 1,5% (n=1) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribución de las formas clínicas de onicomycosis



En la figura 1 (a, b y c) se presentan tres formas clínicas de algunos de los pacientes que participaron en este estudio.



Figura 1: a) Onicomycosis subungueal distal. b): Onicodistrofia total, y c): Onicomycosis superficial blanca, (Corresponden a imágenes tomadas en la Corporación para Investigaciones Biológicas CiB).

Positividad de las pruebas diagnósticas empleadas:

De los 66 pacientes evaluados, 48 (72,7%) presentaron cultivo y/o KOH positivo. En la tabla 1, se puede observar la positividad de las pruebas diagnósticas realizadas. La prueba con mayor positividad de manera independiente fue el KOH con un 91,7% (n=44) y la biopsia ungueal con un 77,1% (n=37), mostró la menor positividad.

TABLA 1. Frecuencia de resultados positivos para cada prueba diagnóstica

Prueba evaluada	Número de muestras positivas	Porcentaje (%) del total de muestras	Porcentaje (%) de muestras positivas
KOH	44	66,7	91,7
Cultivo	41	62,1	85,4
Biopsia	37	56,1	77,1
KOH y/o Cultivo	48	72,7	100
KOH y/o Biopsia	48	72,7	100
Cultivo y/o Biopsia	47	71,2	97,9

En la figura 2, se muestran algunas de las estructuras que se observaron en el examen directo.

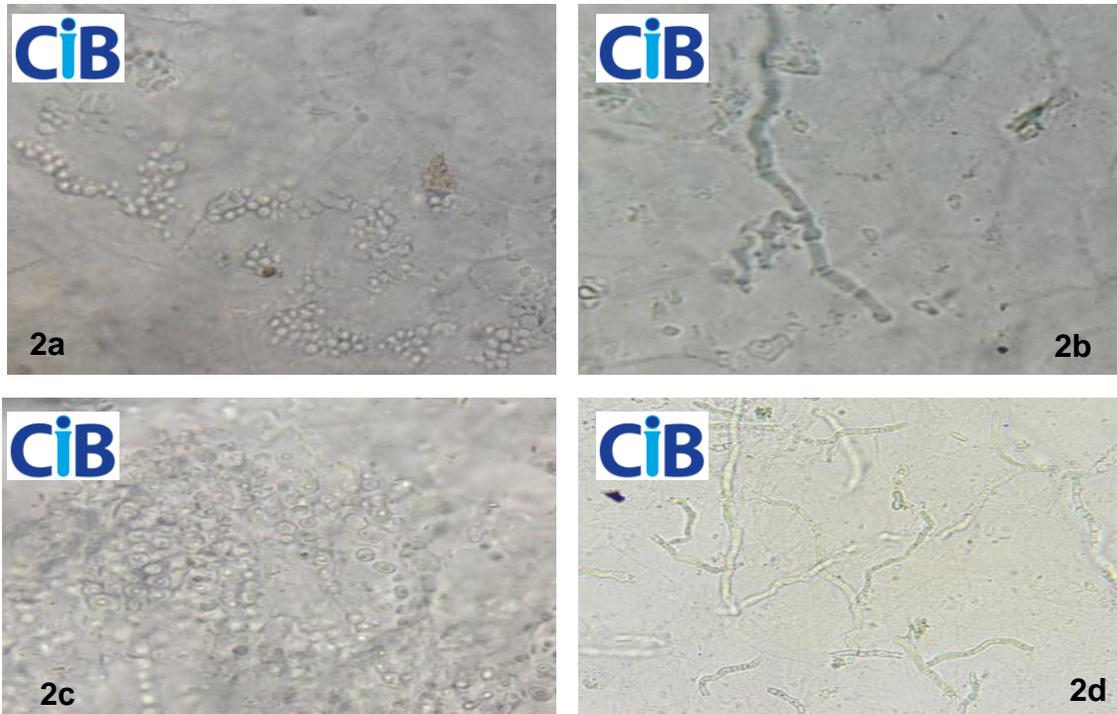


Figura 2: a) Blastoconidias. b) Arthroconidias. c) Clamidoconidias. d) Hifas/fragmentos de hifas. (Imágenes tomadas en la Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB).

Frecuencia de los agentes causales aislados:

Con base en los resultados de los cultivos se determinó que 41/66 (62,1%) pacientes tuvieron cultivo positivo, 13/41 (31,7%) de los cuales presentaron infecciones mixtas (se aisló más de un agente), para un total de 55 agentes micóticos aislados (gráfico 2).

En cuanto a la positividad por grupo de agente implicado, la mayor frecuencia la obtuvo el Grupo III (mohos no dermatofitos, MND), con 24/55 (43,6%), en segundo lugar estuvo el Grupo II (levaduras) con 18/55 (32,7%) y, por último, el Grupo I (dermatofitos) con 13/55 (23,6%) aislamientos.

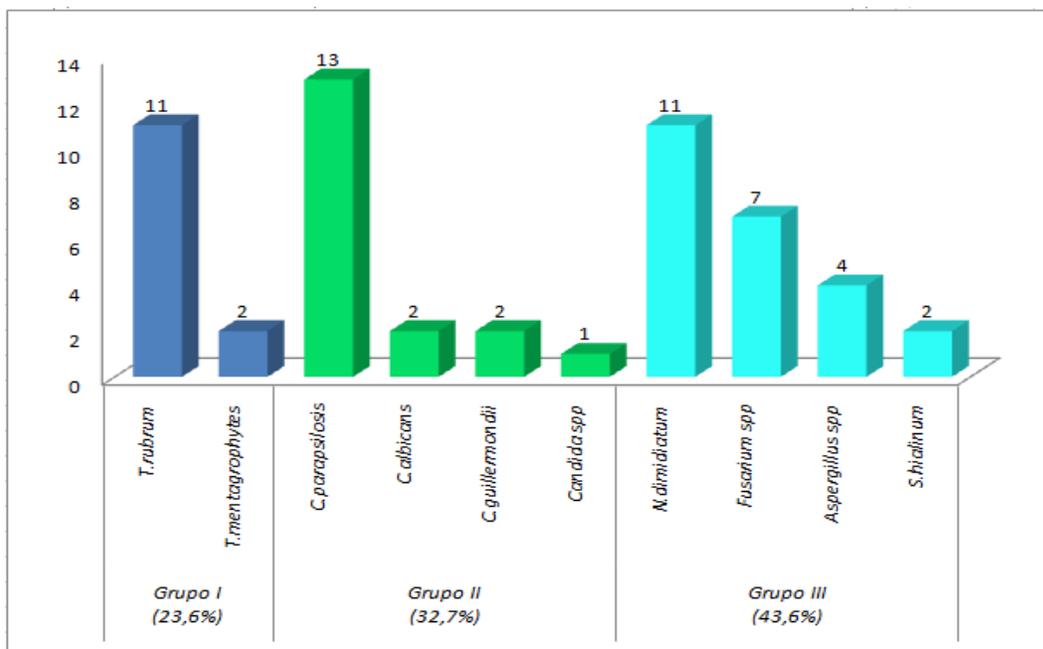
Analizado por género, el más frecuente fue *Candida spp* con 18/55 (32,7%) aislamientos, seguido por *Trichophyton spp* con 13/55 (23,7%), *Neoscytalidium spp* con

11/55 (20,0%), *Fusarium* spp con 7/55(12,7%), *Aspergillus* spp con 4/55 (7,3%) y *S. hialinum* con 2/55 (3,6%).

Al discriminar por especie, se destacan tres agentes, a saber: *Candida parapsilosis*, con 13/55 aislamientos (23,6%), *Neoscytalidium dimidiatum* con 11/55 (20,0%) y *Trichophyton rubrum* con igual número de aislamientos. Llama la atención la alta frecuencia de *C. parapsilosis*, siendo la especie del género *Candida* más recuperada 13/18 (72,2%) en mayor proporción que *C. albicans*, que solo tuvo 2/18 (11,1%) aislamientos.

En relación a las infecciones mixtas, tuvimos en total 13 pacientes, a los cuales se les aisló más de un agente micótico; y en 9/41(22%) casos se aisló *Candida* y otro agente etiológico.

Gráfico 2. Frecuencia de agentes etiológicos aislados en cultivo



En la Figura 3 (a, b, c y d) se observan algunos de los cultivos obtenidos.

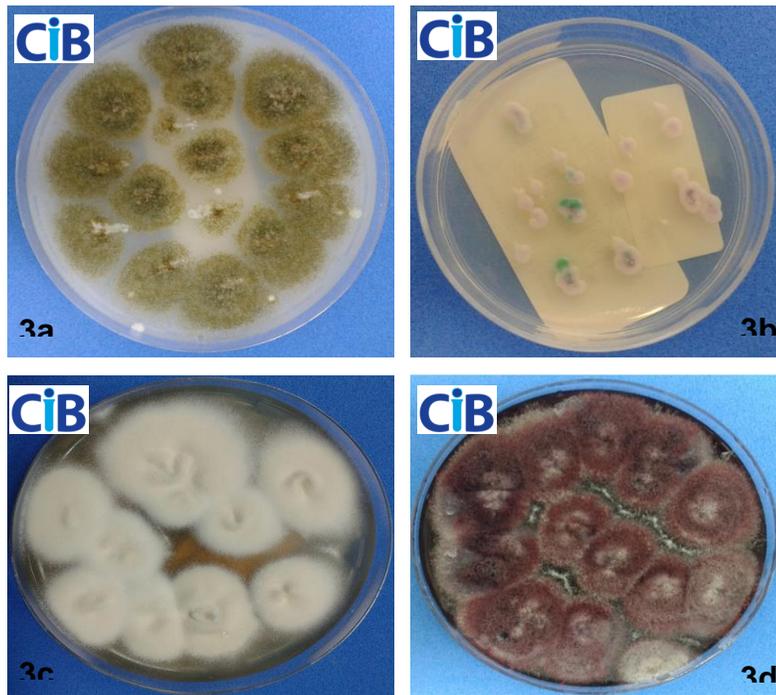


Figura 3: a) *Aspergillus flavus*. b) *Candida parapsilosis* y *C. albicans*. c) *Trichophyton mentagrophytes*. d) *Fusarium spp.* (Imágenes tomadas en la Corporación para Investigaciones Biológicas CIB).

En cuanto a las variables evaluadas en la lectura de la biopsia ungueal, se observa que el 91,9% (34/37) y 89,2% (33/37) presentaron trauma e infección bacteriana respectivamente. En cuanto al grado de invasión, solo el 5,4% (2/37) evidenció colonización, mientras que el 94,6% (35/37) restante presentó invasión por parte de las estructuras fúngicas.

En la figura 4 (a y b), se muestra una infección mixta, pues la distribución con respecto a las células ungueales y el grosor de las hifas presentes en 4a, son diferentes a las de 4b. En la figura 4c, hay una infección mixta por mohos y levaduras; la figura 4d muestra una colonización por levaduras, pues las estructuras están afuera de las células ungueales y no en el interior como si se observan en la figura 4e.

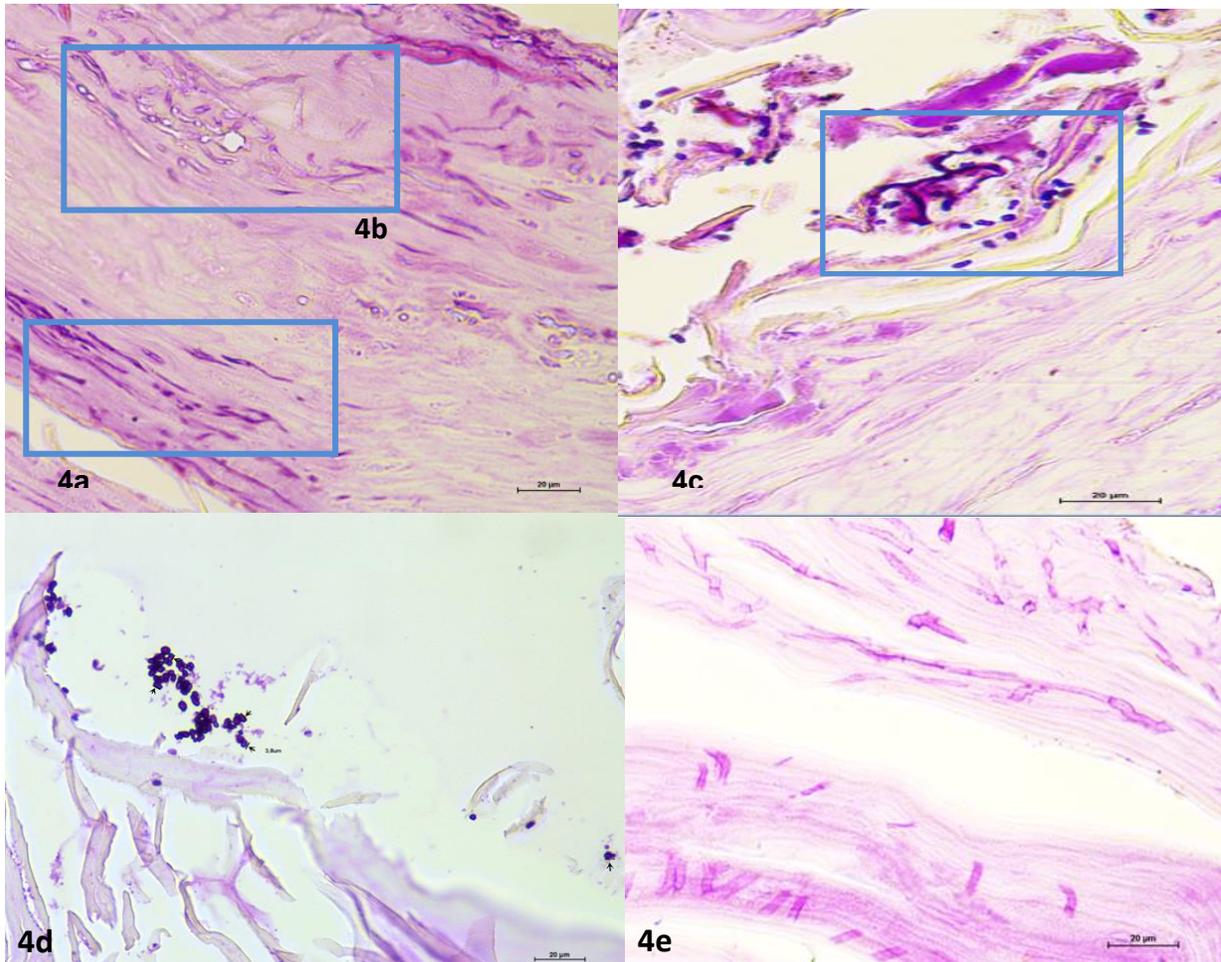


Figura 4: **a)** Hifas delgadas que siguen un orden con respecto a las células ungueales. **b)** Hifas gruesas, que atraviesan el curso longitudinal de las células. **c)** Blastoconidias con hifas (infección mixta). **d)** Acúmulo de blastoconidias afuera de las células ungueales. **e)** Hifas septadas invadiendo la lámina ungueal (Imágenes tomadas en la Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB).

Del total de 37 biopsias positivas, 31 obtuvieron cultivos positivos, con 45 aislamientos de hongos en general, de estos 32/45 correspondieron a hongos no dermatofitos (levaduras y MND). Para *Candida* se observó una positividad de 13/45 (28,9%), para los MND en general se observó positividad en 19/45, 42,2%. En cuanto a especies: 9/45, 20% aislamientos fueron positivos para *C. parapsilosis*; 9/45, 20% para *N. dimidiatum*; 7/45 (15,6%) para *Fusarium spp*; 2/45 (4,4%) para *Aspergillus spp* y 1/45 (2,2%) para *S. hialinum*.

Los análisis estadísticos se presentan en la Tabla 2 y revelaron un valor Kappa de la biopsia ungueal con respecto al KOH, el cultivo y KOH+cultivo de 53%, 50% y 45% respectivamente, lo que demuestra que hay poca relación entre la biopsia ungueal y el resto de pruebas. La sensibilidad fue de 75%, 76% y 71%, siendo mayor cuando se relacionó con el cultivo; la especificidad fue de 82%, 76% y 83%, mostrando un resultado mejor cuando se comparó con la combinación de pruebas. De igual forma, estos resultados están apoyados por el índice de J. de Youden que fue de 57%, 52% y 54% respectivamente.

TABLA 2: Análisis estadísticos de la biopsia ungueal

Estadísticos	KOH vs biopsia	Cultivo vs biopsia	Cultivo vs KOH	KOH+cultivo vs biopsia
Índice Kappa (IC 95%)	0,53 (0,32 - 0,73)	0,50 (0,29 - 0,71)	0,64 (0,44 - 0,83)	0,45 (0,25- 0,66)
Phi	0,54	0,50	0,64	0,49
Sensibilidad (IC 95%)	75,0 (61,1-88,9)	75,6 (61,3 - 89,9)	84,1 (72,2 - 96)	70,8 (56,9 - 84,7)
Especificidad (IC 95%)	81,8 (63,4 - 100)	76 (57,3 - 94,7)	81,8 (63,4 - 100)	83,3 (63,3 - 100)
Índice de Youden (IC 95%)	0,57 (0,36 - 0,77)	0,52 (0,30 - 0,73)	0,66 (0,47 - 0,85)	0,54 (0,33 - 0,76)
Prevalencia (IC 95%)	66,7 (54,5 - 78,8)	62,1 (49,7 - 74,6)	66,7 (54,5 - 78,8)	72,7 (61,2 - 84,2)
Valor predictivo + (IC 95%)	89,2 (77,8 - 100)	83,8 (70,6 - 97,01)	90,2 (79,9 - 100)	91,9 (81,8 - 100)
Valor predictivo - (IC 95%)	62,1 (42,7 - 81,5)	65,5 (46,5 - 84,5)	72 (52,4 - 91,6)	51,7 (31,8 - 71,6)

DISCUSIÓN:

A la fecha y desde nuestro conocimiento, este es el primer reporte en Colombia donde se evaluó y analizó, desde el punto de vista estadístico, la validez, el desempeño y la eficiencia de la biopsia ungueal como método diagnóstico de onicomycosis en comparación con el examen directo (KOH) y el cultivo. Así, se calculó la sensibilidad,

especificidad, valores predictivos y el índice de J. Youden de esta prueba; adicionalmente, se determinó el grado de correlación entre las pruebas calculando el índice Kappa y el valor Phi.

Si bien, los resultados de este estudio muestran un desempeño, validez y eficiencia relativamente bajos para la biopsia ungueal al ser comparada con los otros dos métodos de rutina (Tabla 2), es importante resaltar que, a diferencia del KOH y del cultivo, la biopsia si nos permite discriminar entre colonización e invasión. También permite confirmar la presencia del agente etiológico aislado en el cultivo y fortalecer su valor diagnóstico, especialmente en el caso de los hongos no dermatofitos (MND y levaduras). Razones por las cuales, la biopsia sigue siendo considerada una herramienta muy útil como apoyo en el diagnóstico de onicomycosis en un laboratorio de referencia de la ciudad de Medellín, Colombia.

Se estudiaron 66 pacientes con sospecha clínica de onicomycosis a los cuales se les realizaron los tres procedimientos micológicos a evaluar y se confirmó el diagnóstico en 48 de ellos.

Con respecto a la proporción de género del hospedero en este estudio, fue más común el género femenino, con una relación aproximada de 3 a 1; en varios estudios analizados, esta relación está invertida (Reisberger *et al.*, 2003; Wilsmann *et al.*, 2011; Nkondjo *et al.*, 2012, Haghani *et al.*, 2013; Ameen *et al.*, 2014); pero, los estudios de Zuluaga. *et al.* (2005), Relloso *et al.*, (2012), y Santibañez *et al.* (2016), presentan resultados similares a los nuestros y se explican, al menos en parte, por el interés mayor de las mujeres para acudir a la consulta médica y obtener un diagnóstico, así como el uso de zapatos abiertos, lo que favorece los traumatismos (Morales C., *et al.*, 2014). Otra razón probable es la falta de realizar un muestreo probabilístico, lo que puede favorecer que el fenómeno sea dado por el azar y por sesgos en la selección de los pacientes y no por el fenómeno mismo.

El rango de edad obtenido(55 años)y las presentaciones clínicas más frecuentes (onicomycosis subungueal distal), están acorde con varios reportes de la literatura como

los de Balleste *et al.*, 2003; Reisberger *et al.*, 2003, Shenoy *et al.*, 2008 ,Reloso *et al.*, 2012 y Mendoza *et al.*, 2012. Es importante mencionar que de las 37 muestras positivas para biopsia ungueal, 19 correspondieron a onicomicosis subungueal distal, 7 a subungueal lateral y 5 a onicodistrofia total, lo que permite inferir que la sensibilidad de la biopsia ungueal incrementa con el grado de compromiso que tenga la uña, es decir entre más amplia y profunda sea la infección, mayor será la sensibilidad de la biopsia ungueal. En algunos de estos estudios se concluye que la prevalencia de onicomicosis es mayor en adultos y su incidencia incrementa con la edad, debido al deterioro natural de la lámina ungueal, al incremento del riesgo a sufrir enfermedades del sistema circulatorio y a traumatismos repetidos en las uñas, que aumenta el riesgo de padecer onicomicosis (Balleste *et al.*, 2003; Mendoza *et al.*, 2012).

Los resultados de positividad en las pruebas evaluadas (KOH: 44/48, cultivo: 41/48 y biopsia: 37/48) son similares a los reportados en el estudio de Hsiao *et al.*, 2007 (KOH: 68/78, cultivo: 52/78 y biopsia: 63/78) y el estudio de Zanardiet *al.*, 2008 (KOH: 29/40, cultivo: 22/40 y biopsia: 14/40), donde la prueba con mayor positividad al momento de comparar KOH, cultivo y biopsia resulta ser el KOH, esto se puede explicar por el hecho de que la toma de muestra para el KOH es por raspado y los detritus obtenidos en este proceso pueden contener estructuras fúngicas que no necesariamente están asociadas a una infección por hongos, sino simplemente a una colonización transitoria (Del Palacio *et al.*,2001; Balleste *et al.*, 2003); esta podría ser la misma razón por la cual la biopsia ungueal fue la prueba menos sensible en comparación con las otras tres.

En cuanto a los aislamientos fúngicos, el grupo con mayor número de aislamientos, fue el de MND con 24/55 (43,6%), el género más frecuente fue *Candida* con 18/55 (32,7%) y las especies más frecuentes fueron *C. parapsilosis* con 13/55 (23,6%) seguida de *N. dimidiatum* y *T. rubrum* ambos con 11/55(20%).

En este sentido, Balleste *et al.*,2003 y Ameen *et al.*, 2014 indican el comportamiento de *N. dimidiatum* como patógeno primario, por la producción de keratinasas; en el estudio de Morales *et al.*, 2014, también fue la especie de MND más frecuente, sugiriendo una

incidencia de MND hasta de un 68%, demostrándose cada vez más, la importancia de detectar este grupo de microorganismos como agentes etiológicos de las onicomycosis. De igual forma, Cavallera & Asvati., 2006 en su estudio exponen que la incidencia de onicomycosis producidas por levaduras y MND va en aumento, Mendoza *et al.*,(2012) establecen que la etiología varía por condiciones geográficas y climáticas.

Otros estudios, por el contrario, indican el aislamiento de hongos dermatofitos como los agentes causales de onicomycosis más frecuentes (Lawry *et al.*, 2000; Gianni *et al.*, 2001; Hajar *et al.*, 2015; Jeelani *et al.*, 2015 y Jung *et al.*, 2015).

La especie más frecuentemente aislada en nuestro estudio fue *C. parapsilosis* lo cual coincide con otros estudios (López & Torres, 1999; Van Asbeck *et al.*, 2009); así mismo, en el estudio de Manzano *et al.*, 2011, los autores indican que el incremento de *C. parapsilosis* en las últimas dos décadas se ha hecho notorio y proponen como explicación a este fenómeno una capacidad adquirida de esta levadura para aprovechar los nutrientes disponibles en la lámina ungueal que puedan favorecer la colonización y posterior infección. Sin embargo, otros trabajos describen que es *C. albicans* la especie más aislada como agente causal de onicomycosis (Balleste *et al.*,2003; Mendoza *et al.*, 2012).

El resultado de este trabajo que ha sido más discordante con lo reportado en la literatura ha sido la baja positividad obtenida con la biopsia ungueal 37/48 contra KOH 44/48, cultivo 41/44 y la combinación de ambas 48/48. Como se ha mencionado con anterioridad, una posible explicación de esto sería la posibilidad de haber captado hongos que se hallaban colonizando la lámina ungueal, mas no invadiendo la misma, de igual forma en varios estudios la biopsia es incluida dentro del estándar, lo que incrementa la positividad, la sensibilidad y la especificidad, demostrando así la presencia de sesgos de verificación parcial (Weinberg *et al.*, 2003; Abaira 2006; Hsiao *et al.*, 2007; Shenoy *et al.*, 2008; Haghani *et al.*, 2013).

Como se muestra en los resultados, el grupo más frecuente dentro de las biopsias positivas, fueron los MND, con 19/37 (51,4%), seguidos de *Candida spp* con 13/37 (35,3%), pero del total de 66 pacientes, 29 fueron negativos para biopsia ungueal, de estas negativas, 10 obtuvieron cultivos positivos, y la distribución por grupos fue: 5/10 (50%) por MND y en el 50% restante se aisló *Candida spp*, todo esto fortalece la idea anterior, donde se expone que pudieron ser contaminación o colonización transitoria. En el estudio de Zanardi *et al.* 2008, también atribuye la baja sensibilidad de la biopsia al procedimiento para obtener la muestra, cabe anotar que la metodología aplicada por ellos para tomar las muestras fue la misma que en el presente estudio.

En cuanto a la validez, utilidad y desempeño, la biopsia ungueal demostró un comportamiento moderado, el índice de correlación entre pruebas (Kappa), fue moderado (biopsia vs cultivo: 0,50 vs KOH: 0,53y vs la combinación de ambas: 0,45) porque la biopsia no puede reemplazar el KOH ni el cultivo. Aunque la sensibilidad, especificidad y valores predictivos fueron menores a los datos del estándar y las pruebas relacionadas, como se ha mencionado anteriormente, es posible que la positividad de las otras pruebas se debiera a la presencia de agentes que colonizan o contaminan los medios de cultivos, además cabe mencionar que los estudios se realizan en población con alta sospecha de onicomicosis, en este estudio en particular, los pacientes fueron remitidos por especialistas, lo que también podría tener un efecto de sobreestimación de la enfermedad estudiada. Como se ha mencionado con anterioridad, los resultados de este estudio muestran una baja utilidad de la biopsia ungueal para el diagnóstico de onicomicosis como única prueba.

LIMITACIONES: El tamaño muestral fue bajo, ya que el número de pacientes se eligieron por conveniencia, de igual forma la selección de los individuos fue no probabilística, lo que disminuye la validez externa del estudio y se dejan algunos resultados a la influencia del azar, más allá de lo que puedan reflejar del plano real.

A pesar de que los índices estadísticos que determinan el desempeño y la utilidad diagnóstica de la biopsia ungueal como herramienta de apoyo en el estudio de onicomicosis no presentan resultados elevados como única prueba diagnóstica, cabe mencionar que se evaluó frente a las demás pruebas sin ser incluida dentro del estándar, controlando los sesgos de verificación parcial, y los sesgos de enmascaramiento de las pruebas (Abraria., 2006). La biopsia ungueal por sí sola no resulta ser la mejor elección, aunque en este estudio es importante resaltar que la mayoría de aislamientos corresponden a agentes etiológicos controversiales al momento de dar su valor diagnóstico, como lo es *Cándida*, y los MND, lo que podría explicar en cierta medida la baja positividad de la biopsia ungueal, en donde la positividad del cultivo y el KOH pudieran ser resultados de una colonización.

CONCLUSIÓN: No es posible excluir la biopsia ungueal como herramienta de apoyo en el servicio de diagnóstico especializado en la ciudad de Medellín, pues es una herramienta que discrimina entre colonización e invasión y sirve de apoyo en aquellos casos en los que el cultivo y KOH son positivos por agentes etiológicos que pueden estar colonizando la uña o contaminando los cultivos. De igual forma, los resultados de este estudio permiten sugerir la indicación de la biopsia ungueal, cuando el compromiso sea superior al 50% de la lámina ungueal y en presentaciones clínicas como la onicolisis distal subungueal y onicodistrofia total, con el fin de incrementar la sensibilidad de la técnica y la probabilidad de tener un diagnóstico más certero.

Se sugiere realizar un estudio con un tamaño muestral superior y la combinación de técnicas de toma de muestra que permitan esclarecer el rol de las mismas en la positividad de la biopsia ungueal.

Agradecimientos: A la universidad CES, a la Doctora Lina María Salazar, al Doctor Rodrigo Restrepo Molina, al Doctor Leonardo Uribe, al Bacteriólogo Camilo Muñoz, a la Universidad de Antioquia y a los pacientes que participaron en el estudio.

Financiación: Este estudio fue financiado en parte por el Programa de Sostenibilidad de Grupos de Investigación de la Universidad de Antioquia, periodo 2015.

BIBLIOGRAFIA

- Abraira V. Sesgos en los estudios sobre pruebas diagnósticas. SEMERGEN. 2006;32(1):24-26.
- Ameen M, Lear J, Madan V, Mohd M and Richardson M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. Br J Dermatol. 2014;171(5):937-958.
- André J, Sass U, Richert B, Theunis A. Nail pathology. Clin Dermatol. 2013;31(5):526-539.
- Araiza S, Tirado A, González A, Vázquez L, Ponce R, Bonifaz A. Onychomycosis in the elderly. A 2-year retrospective study of 138 cases. Rev Med Hosp Gen Méx. 2016; 79(1):5-10.
- Arango M, Santa C, Cadavid M, Vélez L, Colmenares L, Restrepo B, y Cardona N. Estudio etiológico y epidemiológico de las micosis cutáneas en un laboratorio de referencia – Antioquia Colombia. Rev CES Med 2013; (27):7-19.
- Balleste R., Mousques N., Gezuele E. Onicomycosis. Revisión del tema. Rev Med Uruguay 2003; (19): 93-106.
- Campbell L. & Adam I.R. Update: nail unit dermatopathology. Dermatologic Therapy, 2012; (25): 551–556.
- Cavallera E & Asbati M. Onicomycosis por hongos filamentosos no dermatofitos. Dermatología Venezolana. 2006.(44): 4-10.
- Chang A, Wharton J, Tam S, Kovich O, and Kamino H. A modified approach to the histologic diagnosis of onychomycosis. J Am Acad Dermatol. 2007; (57):849-853.
- Daniel CR 3rd, Gupta AK, Daniel MP, Sullivan S. *Candida* Infection of the nail: role of *Candida* as a primary or secondary pathogen. Int J Dermatol. 1998; 37 (12):904-907.
- Del Palacio A, Pazos C y Cuétara S. Onicomycosis por hongos filamentosos no dermatofitos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2001; 19(9): 439-442.
- Fernandez A., Saeb M., Martínez A. Histopathology of the nail unit. Rom J Morphol Embryol, 2014; 55(2):235–256.

- Gianni C, Morelli V, Cerri A, Greco C, Rossini P, Guiducci A, Braidotti P, Calcaterra R, and Papini M. Usefulness of Histological Examination for the Diagnosis of Onychomycosis. *Dermatology* 2001;202(4):283–288.
- Gupta AK & Simpson FC. Diagnosing onychomycosis. *Clinics in Dermatology* 2013; 31(5): 540–543.
- Haghani I, Shokohi T, Hajheidari Z, Khalilian A, and Reza S. Comparison of Diagnostic Methods in the Evaluation of Onychomycosis. *Journal Mycopathologia*. 2013;(175):315–321.
- Hajar T, Fernández R, Moreno G, Vázquez E, and Arenas R. Modified PAS stain: A new diagnostic method for onychomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2016 (33): 34-37.
- Hsiao Y, Lin H, Wu T, Shin H, Wei S, Wang Y, Lin K, Chiou H, and Yang J. A comparative study of KOH test, PAS staining and fungal culture in diagnosis of onychomycosis in Taiwan. *J Dermatol Sci*. 2007;45(2):138-140.
- Jeelani S, Ahmed Q, Lanker A, Hassan I., Jeelani N. and Fazili T. Histopathological examination of nail clippings using PAS staining (HPE-PAS): gold standard in diagnosis of Onychomycosis. *Mycoses*. 2015, 58 (1): 27–32.
- Jung M, Shim J, Lee J, Lee J, Yang J, Lee D, Jang K, Lee N, Lee J, Park J, and Park K. Comparison of diagnostic methods for onychomycosis, and proposal of a diagnostic algorithm. *Clin Exp Dermatol*. 2015;40(5):479-484.
- Lawry M, Haneke E, Strobeck K, Martin S, Zimmer B, and Romano P. Methods for Diagnosing Onychomycosis: a Comparative Study and Review of The Literature. *Arch dermatol*. 2000; 136 (9):1112-1116.
- Lilly K, Koshnick R, Grill J, Khalil Z, Nelson D, and Warshaw E. 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(4):620-626.
- López O y Torres J. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomicosis. *Rev Iberoam Micol* 1999; (16): 11-15.
- Manzano P, Méndez L, Arenas R, Hernández F, Millán B, Torres J, Cortés E, Fernández R, y López R. Levaduras causantes de onicomicosis en cuatro

- centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. *Rev Iberoam Micol.* 2011;28(1):32–35.
- Mendoza N, Palacios C, Cardona N, y Gómez L. Onicomycosis: afección común de difícil tratamiento. *Asoc. Colomb. Dermatol.* 2012; 20 (2):149-158.
 - Morales C, Valbuena M, Alvarado Z and Solorzano A. Non-dermatophyte mould onychomycosis: a clinical and epidemiological study at a dermatology referral centre in Bogota, Colombia. *Mycoses.* 2014 May;57(5):284-293.
 - Nkondjo S, Fabrizi V and Papini M. Onychomycosis in Cameroon: a clinical and epidemiological study among dermatological patients. *Int J Dermatol.* 2012; 51(12): 1474-1477.
 - Reisberger E, Abels C, Landthaler M. and Szeimies R. Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid–schiff-stained nail clippings. *British Journal of Dermatology* 2003; 148:749–754.
 - Relloso S., Arechaval A, Guelfand L, Maldonado I, Walker L, Agorio I, Reyes S, Giusiano G, Rojas F, Flores V, Capece P, Posse G, Nicola F, Tutzersy Bianchi M. Onicomycosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. *Rev. Iberoam. Micol.* 2012; 29(3):157–163.
 - Roderick J. and Baran R. Fungal (Onychomycosis) and Other Infections Involving the Nail Apparatus. *Baran & Dawber's. Diseases of the Nails and their Management*, Fourth Edition. 2012; (5): 211-255.
 - Shenoy M, Teerthanath S, Karnaker V, Girisha B, Krishna M, and 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* 2008;74:226-229.
 - Thomas J, Jacobson G, Narkowicz C, Peterson G, Burnet H and Sharpe C. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2010; (35):497–519.
 - Van Asbeck E, Clemons K, and Stevens D. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical Reviews in Microbiology*, 2009; 35(4): 283–309.

- Weinberg J, Koestenblatt E, Tutrone W, Tishler H, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*, 2003; 49 (2): 193-197.
- Wilsmann D, Sareika F, Bieber T, Schmid M, Wenzel J. New reasons for histopathological nail-clipping examination in the diagnosis of onychomycosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology (JEADV)* 2011;25 (2):235–237.
- Zanardi D, Holthausen D, Da Silva A, Quirino M, De Souza J. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. *An Bras Dermatol*. 2008;83(2):119-124.
- Zuluaga de C, De Bedout C, Tabares A, Cano L, Restrepo A, Arango M, Hurtado H, Manrique R. Comportamiento de los agentes etiológicos de las onicomicosis en un laboratorio de micología de referencia (Medellín 1994-2003) *Med Cutan IberLat Am*. 2005; (33): 251-256.