

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

CONCORDÂNCIA ENTRE O EXAME MICOLÓGICO DIRETO E
CULTURAL EM INFECÇÕES UNGUEAIS DOS PÉS POR
DERMATÓFITOS

Paulo Ricardo Martins Souza

Orientador: Dr. Ellis D'Arrigo Busnello

Co-orientador: Rodrigo Pereira Duquia

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, outubro de 2007.

AGRADECIMENTOS

À Angela, Arthur e Isabela, pelo amor, compreensão e apoio.

Ao amigo, colega e professor Rodrigo Pereira Duquia pelo incansável empenho e cuidado nesta difícil empresa. Seu envolvimento, esforço e parceria tornaram essa tarefa possível.

Ao estimado Professor Ellis D'Árrigo Busnello que tanto já realizou pela pós-graduação e pelo ensino; por sua amizade e disponibilidade, por sua demonstração de vontade e capacidade invejáveis de aprender e ensinar. Pela sabedoria e conduta exemplares nas horas adversas. Pelo esforço de aproximação entre especialidades tão cúmplices como são a psiquiatria e dermatologia.

Ao Serviço de Dermatologia da Santa Casa pelo apoio demonstrado, especialmente na pessoa do Prof. Roberto Lopes Gervini, que sempre oportunizou realização e crescimento profissional.

Ao Dr César Bernardi, pelo apoio durante minha carreira profissional e amizade fortalecida pelo amor comum pela dermatologia, cultura e arte.

Ao Professor Joel Schwartz pelos ensinamentos, amizade, incentivo e exemplo de conduta durante toda carreira profissional.

Ao Professor Gerson Vettorato, maestro da micologia e dermatologia, pelos ensinamentos, e por possibilitar e auxiliar na realização deste trabalho, por sua amizade e apoio.

Aos colegas preceptores e especialmente residentes com quem estou sempre aprendendo.

À equipe de funcionários do Serviço de Dermatologia da Santa Casa, sempre nos apoiando e assistindo, Jussara, Ismael, Tais,

Aos pacientes que permitiram a realização deste trabalho

ÍNDICE

1. RESUMO	5
2. INTRODUÇÃO	6
3. DEFINIÇÃO DE TERMOS E SIGLAS	9
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
4.1. PUBMED.....	11
4.2. LILACS	13
4.3. OUTRAS FONTES DE BUSCA	14
5. ASPECTOS HISTÓRICOS.....	15
6. OCORRÊNCIA DE ONICOMICOSSES	16
7. IMPORTÂNCIA DAS ONICOMICOSSES POR DERMATÓFITOS	18
8. ASPECTOS CLÍNICOS DAS ONICOMICOSSES POR DERMATÓFITOS.....	20
9. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ONICOMICOSSES	22
10. ARTIGO.....	32
11. ANEXOS	46
12. REFERÊNCIAS	50

1. RESUMO

As onicomicoses dos pés são doenças ungueais comuns e crônicas. Possuem como agentes etiológicos predominantes os dermatófitos. A identificação laboratorial deste grupo de fungos é feita principalmente através do exame micológico direto (EMD) e do exame cultural. Esses exames são solicitados simultaneamente na prática clínica, talvez como uma tentativa de aumentar a possibilidade de detectar o agente etiológico.

O objetivo do presente estudo é verificar a concordância entre o exame micológico direto e o exame cultural no diagnóstico de dermatófitos nas unhas dos pés, e, a partir destes achados, avaliar a necessidade de realização de ambos os testes. Em uma amostra de 890 indivíduos adultos encaminhados para exames micológicos no laboratório de micologia do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Santa Casa, em um período de 12 meses, foram realizados exames micológicos direto e cultural.

A concordância obtida entre o EMD e o cultural foi de 0,54 avaliada pelo índice Kappa. Em apenas 4% dos exames o cultural detectou dermatófitos que não foram identificados pelo EMD.

A concordância entre os exames micológicos direto e cultural foi moderada e o exame micológico direto fez mais diagnósticos de dermatófitos que o exame micológico cultural.

2. INTRODUÇÃO

As onicomicoses são as principais causas de doenças ungueais nos países ocidentais, correspondendo à metade dos transtornos ungueais e aproximadamente um terço das infecções fúngicas cutâneas^(1, 2). Um estudo realizado em diferentes países europeus demonstrou que quando o dermatologista diagnosticava clinicamente uma doença no pé, as onicomicoses estavam presentes em 40% dos casos⁽³⁾.

Estudos têm demonstrado que a prevalência de onicomicoses aumenta conforme o aumento da idade⁽⁴⁻⁸⁾, sendo estimado uma freqüência de 48% aos 70 anos de idade. No Canadá, a prevalência estimada de onicomicoses dos pés por dermatófitos, em indivíduos de 40 a 59 anos foi de 9,5%⁽⁹⁾. No Reino Unido a prevalência de onicomicoses dos pés em uma população de 9332 indivíduos com idade acima de 16 anos foi de 2,73%⁽¹⁰⁾.

Existem indícios de que a freqüência das onicomicoses esteja aumentando, provavelmente por uma combinação de fatores^(6, 11, 12). Com o crescente envelhecimento da população e o maior uso de imunossuppressores, mais indivíduos ficam suscetíveis a infecções ungueais^(6, 13). Apesar de apresentarem uma baixa mortalidade, as onicomicoses possuem morbidade elevada. Além das alterações morfológicas e estéticas, as distrofias ungueais podem produzir dor e dificuldade para deambular, com conseqüente impacto negativo na qualidade de vida^(9, 14, 15).

Os dermatófitos são os principais causadores de onicomicoses nos pés(16-19). Entre as espécies de dermatófitos o *Trichophyton rubrum* é o principal responsável. Em

estudo de revisão realizado por Schwartz et al, o *T. rubrum*, foi responsável por 80% das infecções fúngicas nas unhas dos pés (20). Esse fato também foi relatado por outros autores (9, 13, 16, 21-25).

Atualmente existem diversos métodos para diagnosticar as onicomicoses:

1. Exame micológico direto;
2. Exame cultural para fungos;
3. Exame anatomopatológico;
4. Genética molecular (através da reação em cadeia da polimerase-PCR);e
5. Clareadores fluorescentes (calcoflúor).

Os exames mais utilizados são o EMD e cultural⁽²⁶⁾. O EMD é um exame de baixo custo e de realização em poucos minutos. O material é coletado e depositado em uma lâmina, o hidróxido de potássio é utilizado no preparo do espécime para análise no microscópio. Por sua vez, o cultural necessita uma estufa biológica, autoclave, e preparo dos meios de cultura, sendo o seu custo mais elevado e o tempo para obtenção do resultado, entre 15 a 30 dias.

O EMD permite classificar os agentes patogênicos causadores de infecções fúngicas cutâneas superficiais (IFCS) em três categorias:

1. Dermatófitos;
2. Contaminantes (não-dermatófitos);
3. Leveduras.

O exame cultural, por sua vez, identifica a espécie fúngica responsável pela infecção, permitindo posteriormente classificar os achados nas mesmas três categorias do EMD descritas acima.

Na prática clínica atual, ambos os exames (EMD e cultural) são solicitados, provavelmente como uma tentativa de aumentar a sensibilidade diagnóstica.

Existem na literatura diversos estudos avaliando a acurácia do EMD e cultural, contudo nenhum deles utilizou metodologia epidemiológica adequada para identificar um dos testes como padrão-ouro. O achado de dermatófitos em qualquer destes exames, é diagnóstico de *tinea unguium*, permitindo iniciar o tratamento^(19, 24, 27). O uso de ambas as técnicas justificar-se-ia se fossem complementares, o que ainda não foi adequadamente estudado.

Não foram encontrados na literatura estudos avaliando a história natural da doença que nos permita identificar os resultados falso-positivos e falso-negativos de cada teste diagnóstico. Desta forma, a verificação da acurácia, bem como da sensibilidade e especificidade de cada teste torna-se prejudicada.

Pesquisas avaliando a detecção de dermatófitos pela técnica do EMD e do cultural tornam-se necessárias para compreendermos adequadamente as propriedades de cada um dos testes. Nosso estudo não pretende avaliar a capacidade diagnóstica dos testes, apenas comparar a proporção de diagnósticos realizados por ambas as técnicas.

3. DEFINIÇÃO DE TERMOS E SIGLAS

Artrosporos: Agrupamento de esporos formando hifas, também chamado artroconídeo.

Blastoconídeo: Conídeo que se desenvolve por brotamento.

Conídeo: Esporo assexual fúngico.

Contaminantes (non-dermatophytes molds): Fungos que são ora patogênicos, ora contaminantes.

Cultural: Exame micológico cultural ou cultivo.

Dermatófito: Grupo homogêneo de fungos queratinofílicos, causadores de micoses de pele e fâneros.(cutâneas)

Dermatofitose: Infecção fúngica por dermatófito.

EMD: Exame micológico direto.

Hidróxido de potássio (KOH): Substância utilizada para dissolver o material a ser examinado em lâmina, no preparo do EMD.

Hifa: Porção ou corpo ou talo vegetativo, constituído por um filamento.

Leveduras: Grupo fúngico que apresenta colônias pastosas ou cremosas. (Ex: cândida, criptococos).

LILACS: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde - Base de dados utilizada para pesquisa em saúde.

Micélio: Agrupamento de hifas.

Macroconídio: A maior entre as duas formas de esporos assexuais fúngicos.

Microconídio: A menor entre as duas formas de esporos assexuais fúngicos.

Onicomicose: Infecção fúngica ungueal.

PUBMED: Base de dados internacional para pesquisa em saúde.

Tinea unguium: Infecção fúngica ungueal por dermatófitos, o mesmo que

dermatofitose ungueal.

4. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão bibliográfica foi realizada nas bases de dados PUBMED e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), bem como livros-texto.

4.1. PUBMED

Para busca de artigos foram utilizados os seguintes termos na língua inglesa: onychomycosis; terbinafine; terbinafina; tinea and ungueal; tinea and nail; nail and fungus; nail and mycosis; nail and dermatophytes; nail and dermatophytosis; KOH and dermatophytes; dermatophytes and cultural; dermatophytes and culture; fungi and nail; toenail and mycosis; diagnostic and dermatophytes; dermatophytes and diagnostic; direct microscopic examination and dermatophytes; direct microscopic examination and onychomycosis; direct microscopic examination and cultural; direct microscopic examination and fungi; direct microscopic examination and nail; gold and standard onychomycosis; gold and standard dermatophytes; gold and standard and fungi; tinea and unguium; fungal and nail.

Na PUBMED foram detectados 12.283 artigos. Conforme demonstrado na Figura 1, a exclusão dos artigos foi realizada em etapas.

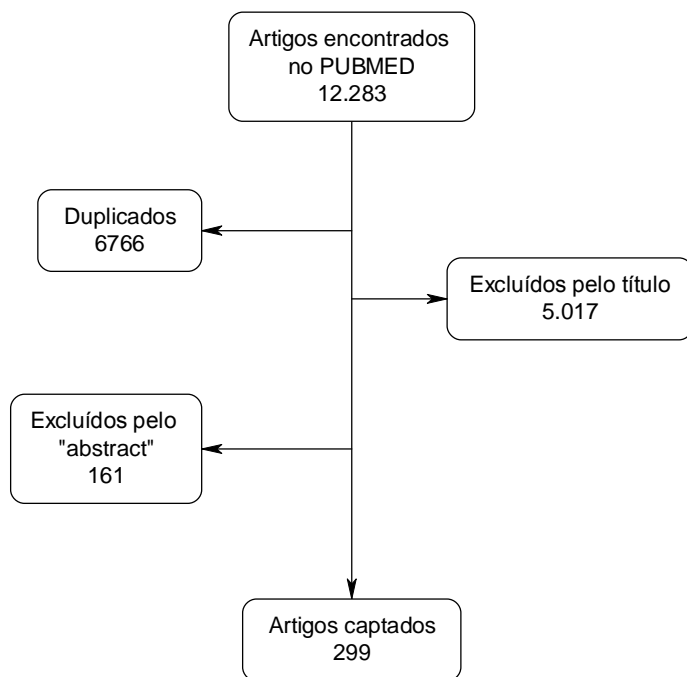


Figura 1. Organograma de exclusão de artigos no PUBMED.

4.2. LILACS

Para busca de artigos na base de dados LILACS foram utilizados os seguintes termos: onicomicoses, terbinafina, tinea e unhas, tinea e ungueal, unhas e fungos, unha e dermatófitos, unha e dermatofitoses, KOH e dermatófitos, dermatófitos e cultural, dermatófitos e cultura, fungos e unhas, unhas dos pés e micoses, diagnóstico e dermatófitos, fungos e dermatófitos, exame micológico direto e cultural, exame micológico direto e fungos, exame micológico direto e unhas, padrão ouro e dermatófitos, padrão ouro e dermatofitoses, padrão ouro e fungos.

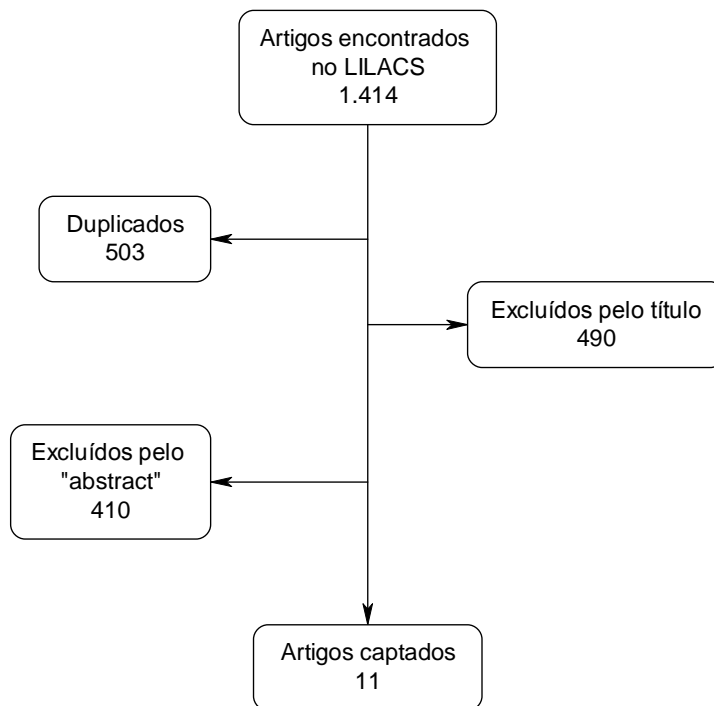


Figura 2. Organograma de exclusão de artigos no LILACS.

4.3. OUTRAS FONTES DE BUSCA

Livros de referência na área de dermatologia e micologia:

- Andrews Diseases of Skin (Andrews GC 2006)
- Clinical Dermatology (Habif TP 2004)
- *Compêndio de Micologia Médica (Zaitz C 1998);*
- Dermatology (Bolognia JL 2003);
- *Dermatology in General Medicine (Fitzpatrick, TB 2003)*
- Diseases of the Nails and their Management (Baran R 1994)
- Dermatologia (Sampaio 2007)
- Laboratory Handbook of Dermatophytes (Kane J 1997)
- Medical Mycology (Rippon JW 1998);
- Nouvelle Pratique Dermatologique (Darier J 1936)
- Textbook of Dermatology (Rook, A 2004)
- Tratado de Micologia Médica Lacaz (Lacaz CS 2002);

5. ASPECTOS HISTÓRICOS

As tineas, como muitas outras condições dermatológicas, têm sido observadas e conhecidas desde os tempos históricos mais remotos. Na pele e no couro cabeludo, o crescimento dos fungos ocorre em todas as direções, adquirindo uma forma circular ou anular. Por este motivo, os gregos denominaram a doença herpes, um termo que ainda persiste. Os romanos associaram as lesões com insetos e denominaram a doença de tinea, que significa pequena larva de inseto⁽²⁸⁾.

Sabouraud refere em seu livro “Las Teignes”, que a tricofitose ungueal foi descoberta, assim como o favo da unha, pelos irmãos Mahon. O primogênito descobriu, e seu irmão, conhecido como “Mahon, o jovem”, descreveu-as em 1820. Estes autores descreveram a diferença que havia entre a unha tricofítica- branca- e a unha fávica- amarelada⁽²⁹⁾.

As onicomicoses eram incomuns nas Américas e Europa até a introdução do *Trichophyton rubrum*, espécie de dermatófito que se desenvolveu como causa de tinea corporis crônica na África e sudeste da Ásia. No final do século XIX, este agente encontrou um novo grupo populacional, constituído por soldados europeus e colonialistas, e um novo nicho ecológico, o pé calçado. Soldados e seus mestres provavelmente o trouxeram para a América. Desde então a espécie se espalhou através do mundo⁽²⁸⁾. O termo tinea unguium foi proposto por English em 1976 para as infecções ungueais fúngicas causadas por dermatófitos⁽³⁰⁾.

6. OCORRÊNCIA DE ONICOMICOSSES

Alguns autores estimam que as tineas ungueais sejam responsáveis por 25% de todas as dermatofitoses^(31, 32).

Diversos estudos foram realizados para verificar a ocorrência de dermatofitose ungueal. Na grande maioria das vezes, a metodologia empregada não foi bem descrita, o que não nos permitiu avaliar adequadamente validade dos resultados.

No Reino Unido a prevalência de onicomicoses dos pés em uma população de 9.332 indivíduos com idade acima de 16 anos foi estimada em 2,7%⁽¹⁰⁾. Proporções semelhantes foram encontradas na Espanha, onde dois estudos prospectivos identificaram prevalência de 2,8 e 2,3% na população adulta^(21, 33, 34).

Embora a frequência de onicomicose possa variar conforme a localização geográfica, outros estudos realizados fora da Europa obtiveram prevalências semelhantes. Na ilha de Creta a frequência de onicomicoses foi de 2,6%⁽³⁵⁾, na Argélia a prevalência foi estimada em 4,6%⁽⁸⁾.

No Japão foram realizados três estudos em anos diferentes, 1992, 1997 e 2002, sendo estimada a prevalência de onicomicose em 1,9, 2,0 e 2,9% respectivamente⁽²³⁾.

Em um estudo multicêntrico realizado no Canadá com 15.000 indivíduos, a prevalência estimada de tinea unguium dos pés foi 5,5%⁽⁹⁾.

Com relação ao gênero vários estudos identificam os dermatófitos como os principais agentes etiológicos das onicomicoses.

Em um estudo multicêntrico, realizado na Europa e leste asiático, foram avaliados 80.396 indivíduos com onicomicoses. Neste estudo, a prevalência de dermatófitos foi de 68%⁽³⁾.

Outro estudo multicêntrico realizado nos Estados Unidos e Canadá, os dermatófitos representaram 59% dos fungos ungueais⁽¹³⁾.

Valores mais elevados foram encontrados em estudos realizados na Itália, Grécia e Taiwan, estimando a prevalência de onicomicoses por dermatófitos em 86,0%, 72,3% e 69,6% respectivamente^(16, 19, 24, 25).

Um estudo realizado por Lopes et al., no Rio Grande do Sul, de um total de 2664 casos de micoses superficiais, 601 casos (22%) foram de onicomicoses. A proporção de dermatófitos identificados entre as onicomicoses foi de 69.4%⁽³⁶⁾.

7. IMPORTÂNCIA DAS ONICOMICOSSES POR DERMATÓFITOS

Além de apresentarem graus variados de transtornos físicos e dor, os pacientes com onicomicoses podem sofrer limitações sociais e psicológicas. O envelhecimento das populações e o crescente uso de imunossupressores contribuem para uma maior frequência de onicomicoses, pois mais indivíduos ficam suscetíveis a infecções ungueais^(6, 13).

O efeito das distrofias ungueais na qualidade de vida foi avaliado na Inglaterra em um grupo de 60 pacientes com suspeita clínica de onicomicose. As queixas mais comuns foram a dificuldade de cortar as unhas e o fato de que a distrofia ungueal afetava o tipo de calçado que o paciente poderia utilizar. A maioria dos pacientes acometidos havia tido pelo menos uma visita ao podólogo nos últimos 12 meses, e 50% duas ou mais visitas no mesmo período. Mais de 1/3 dos pacientes sofriam com dor ou desconforto nos pés que resultaram em limitação das suas atividades⁽³⁷⁾.

Em um estudo multicêntrico realizado por Drake et al, 520 indivíduos com onicomicose de vários países (Estados Unidos, França Itália e Alemanha), foram entrevistados. Deste grupo, 284 questionários foram respondidos por indivíduos nos quais as unhas afetadas eram dos pés. Houve associação entre a maior extensão do comprometimento ungueal (unha totalmente envolvida X metade da unha envolvida) e piora nos escores de qualidade de vida. Da mesma forma, a longa duração da onicomicose e o maior número de unhas envolvidas também contribuíram para um impacto negativo na qualidade de vida. As mulheres foram mais afetadas do que os homens nos escores principalmente no grupo mais velho⁽¹⁴⁾.

Um estudo multicêntrico conduzido em 17 países, 15 europeus (Áustria, Bélgica, República Tcheca, Alemanha, Grécia Hungria, Itália, Luxemburgo, Holanda, Polônia, Rússia, Eslovênia, Suécia, Suíça e Reino Unido), Israel e África do Sul, recrutou 76.475 indivíduos. Neste estudo, um grupo de 43.593 indivíduos com diagnóstico de alguma enfermidade clínica nos pés foi entrevistado. Entre os pacientes com onicomicoses, 29% apresentavam dor, 36.8% desconforto para deambular, 19.3% limitação nas atividades diárias e 27.1% algum tipo de constrangimento em relação ao problema⁽³⁸⁾.

Nos Estados Unidos, Elewski estudou 93 indivíduos com onicomicoses. Nos pacientes que apresentavam a doença há 10 ou mais anos, o impacto físico e psicossocial foi diretamente proporcional ao número de unhas acometidas, sendo maior nos indivíduos com 5 ou mais unhas acometidas. Neste grupo, 92% dos pacientes indicaram que onicomicoses tinham um impacto negativo na qualidade de vida⁽³⁹⁾.

Em outro estudo com o objetivo de avaliar a qualidade de vida dos indivíduos com onicomicoses, 299 pacientes foram estudados. Entre os participantes 45% consideraram as unhas um problema em suas vidas. Neste mesmo estudo as maiores diferenças, referentes à qualidade de vida, estavam relacionadas às atividades envolvendo os pés, como o uso adequado de calçados⁽⁵⁾.

8. ASPECTOS CLÍNICOS DAS ONICOMICOSSES POR DERMATÓFITOS

1) Distal e lateral subungueal - é forma mais comum da doença, onde a invasão se dá na borda livre da unha com tendência a espessamento ungueal^(20, 40-42);



Figura 3. À esquerda onicomicose acometendo toda extensão distal da unha, à direita acometimento de parte da porção distal e lateral da unha.

2) Proximal subungueal - neste tipo clínico, o fungo afeta a área sob a cutícula, levando à infecção do leito ungueal proximal. Acomete principalmente pacientes com vírus da imunodeficiência humana^(20, 40-43).



Figura 4. Acometimento proximal.

3) Branca superficial - ocorre invasão superficial da unha que fica com aspecto calcário (de giz)^(20, 40-43).



Figura 5. Acometimento superficial da unha.

4) Distrófica total – Considerada uma evolução das formas anteriores, há acometimento da unha inteira, podendo ser considerada um amálgama de todos os tipos de onicomicoses^(20, 40, 41, 43);



Figura 6. Distrofia de todas as unhas do pé.

9. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ONICOMICOSSES

A pesquisa de fungos nas unhas é um passo fundamental para confirmar o diagnóstico da infecção fúngica^(26, 44-46).

Os dois exames mais utilizados para detecção de onicomicoses, na prática clínica, são o EMD e o cultural. Destes, o EMD é provavelmente o método mais utilizado^(20, 26, 47-49). Embora não detecte a espécie fúngica, este exame pode identificar a morfologia das estruturas fúngicas podendo classificá-las em dermatófito, leveduras ou fungos contaminantes^(26, 44-46).

Atualmente para estabelecer o diagnóstico de onicomicoses utilizamos pelo menos um teste laboratorial⁽⁴⁶⁾.

Exame micológico direto: É realizado seguindo alguns passos:

1 – Raspagem das áreas ungueais suspeitas para posterior disposição do espécime em lâmina de microscópio (Figura. 7).

2 – Adiciona-se uma gota de KOH (10 a 30%) ao espécime procurando misturar bem, deixando uma camada tão fina quanto possível (Figura. 8). Cobre-se com lamínula, esperando-se 2 a 3 minutos para dissolver os fragmentos.

3 – A lâmina é levemente aquecida, devendo ser evitada a fervura, pois pode precipitar cristais de KOH. O KOH digere debris proteináceos e afrouxa o material esclerótico sem danificar o fungo (Figura. 9).

4 - A lâmina é levada ao microscópio para análise das estruturas fúngicas após poucos minutos de “amadurecimento” (Figura 9).

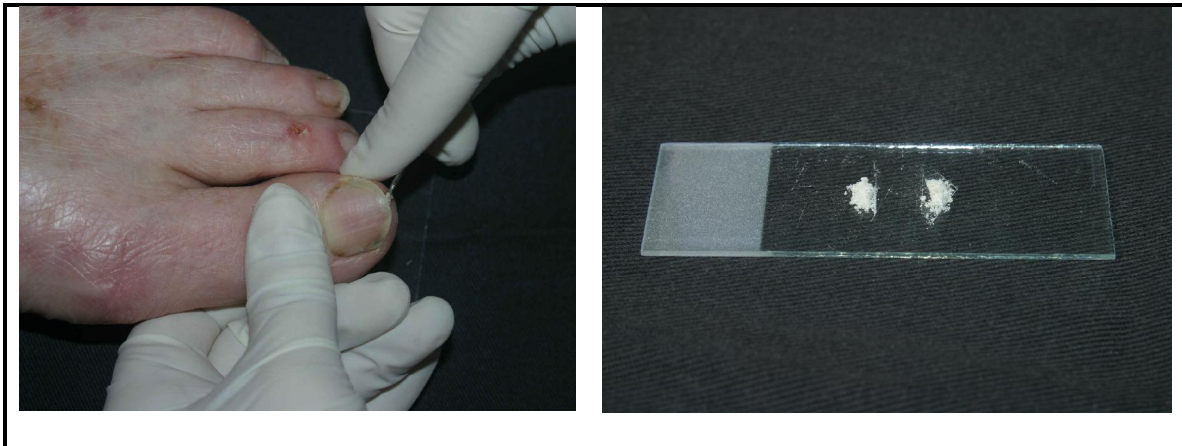


Figura 7: À esquerda colheita por raspagem subungueal. À direita material destinado ao EMD e cultural.



Figura 8: O hidróxido de potássio (KOH) é adicionado ao espécime colhido.

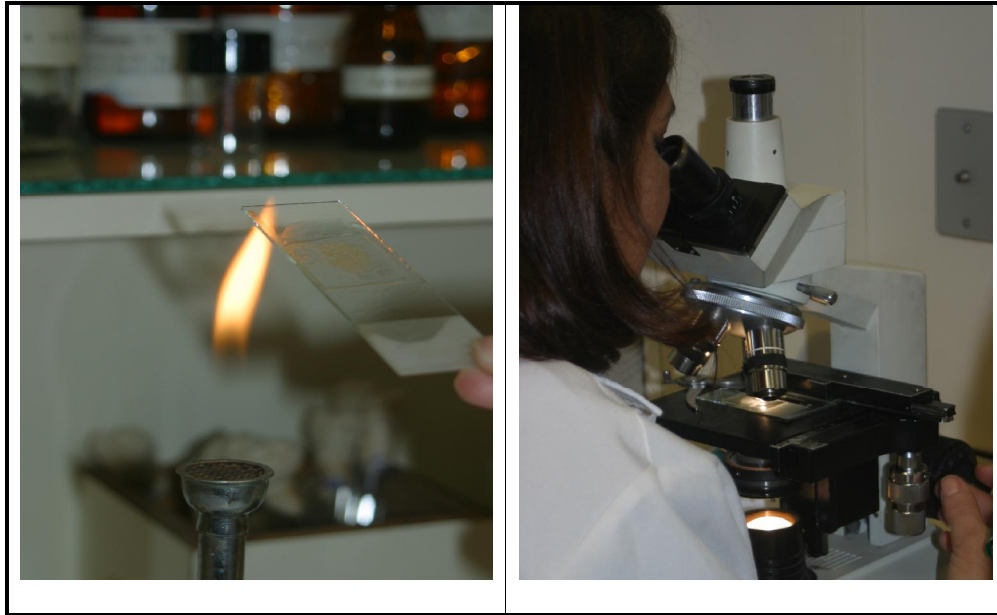


Figura 9: À esquerda aquecimento da lâmina. À direita realização do EMD com microscópio óptico.

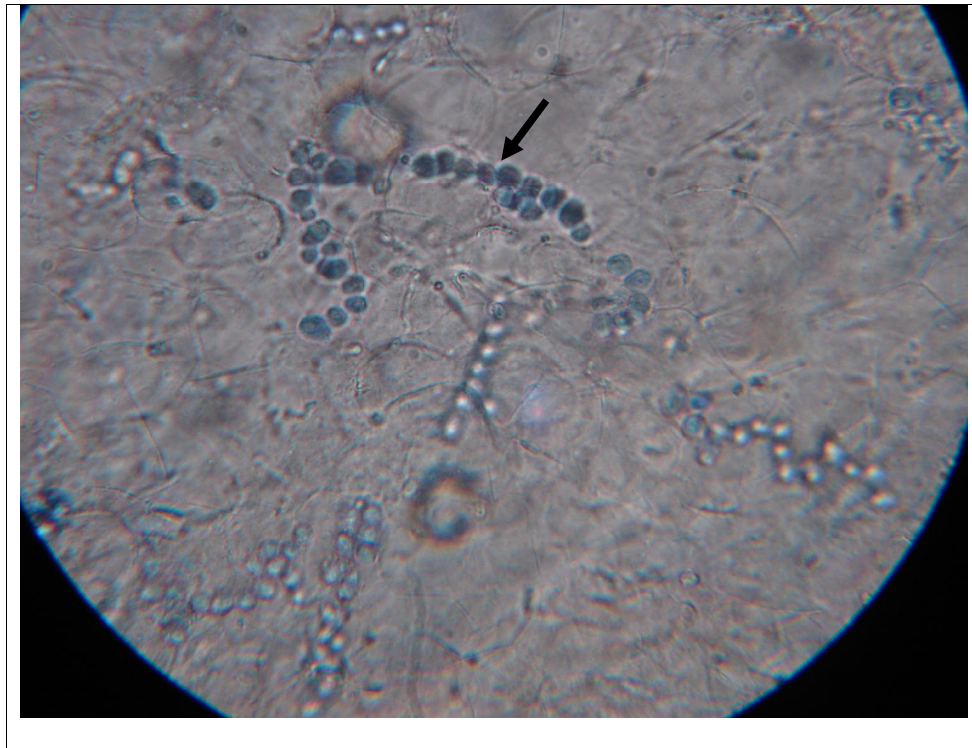


Figura 10: Hifas artrosporadas (Dermatófito). Seta demonstrando artrosporação.

(aumento400X)

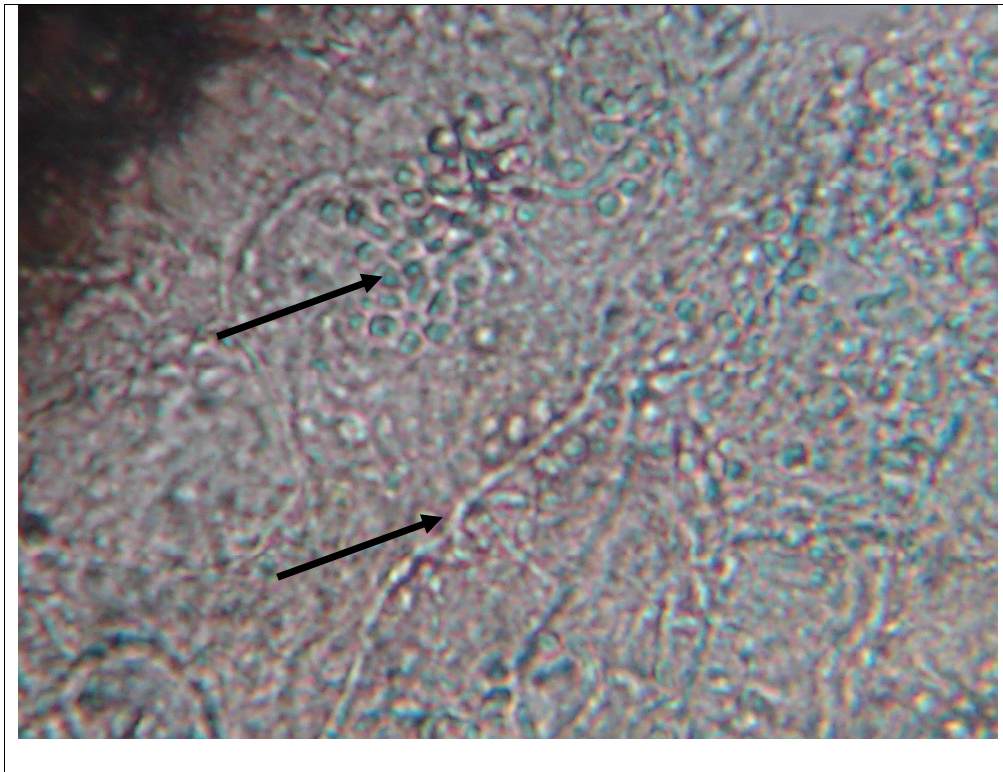


Figura 11: Pseudo-hifas com blastoconídeos. (aumento400X)

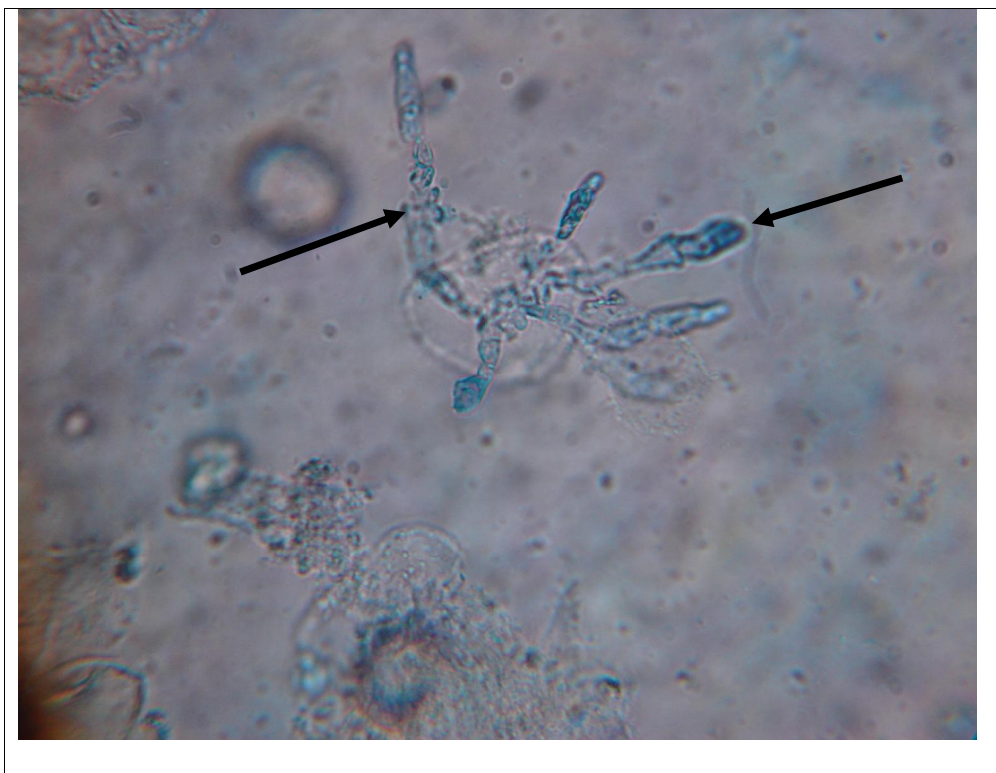


Figura 12: Hifas hialinas irregulares septadas. (aumento400X)

Exame cultural: Normalmente colhido juntamente com o exame direto

1 - Uma parte do material colhido é reservada para o cultural. (Figura 7)

2 - O material é semeado produzindo-se sulcos no meio de cultura. (Figura 14)

3 – O meio de cultura é colocado em estufa a uma temperatura de 27° C, onde permanece por 20 a 30 dias para desenvolvimento dos fungos. (Figura 14)

O meio de cultura padrão para isolamento de dermatófitos é o ágar-Sabouraud contendo cycloheximide e um antibiótico antibacteriano. O cicloheximide (Actidione) em uma concentração de 0,1 a 0,4mg/ml suprime o crescimento da maioria dos fungos saprófitos sem impedir o crescimento de dermatófitos. Para evitar o crescimento bacteriano, o antibiótico habitualmente utilizado é o cloranfenicol^(26, 28, 45, 46, 49).

Existem três passos para a observação das colônias fúngicas:

1 – Obverso (anverso) da colônia. Observa-se sua cor (branca, perolada, marfim, preta), consistência (algodonosa, pulverulenta, filamentosa), e a topografia (plana, rugosa, pregueada).

2 – Reverso da colônia. Identifica-se o pigmento predominante.

3 – Morfologia microscópica. Observa-se o tamanho, o formato, o arranjo e a estrutura das hifas. Procura-se microconídios e macroconídios⁽²⁸⁾.

Os meios de cultura são preparados no próprio laboratório; tanque de lavagem, fogão, geladeira, autoclave, estufa, micoteca, são alguns dos equipamentos necessários para preparo e armazenamento de material. Obviamente requerem uma área física para serem instalados de maneira apropriada, além de ser indispensável um auxiliar de laboratório para execução das tarefas.



Figura 13: À esquerda preparo dos meios de cultivo. À direita conservação dos meios de cultivo à 4° C.

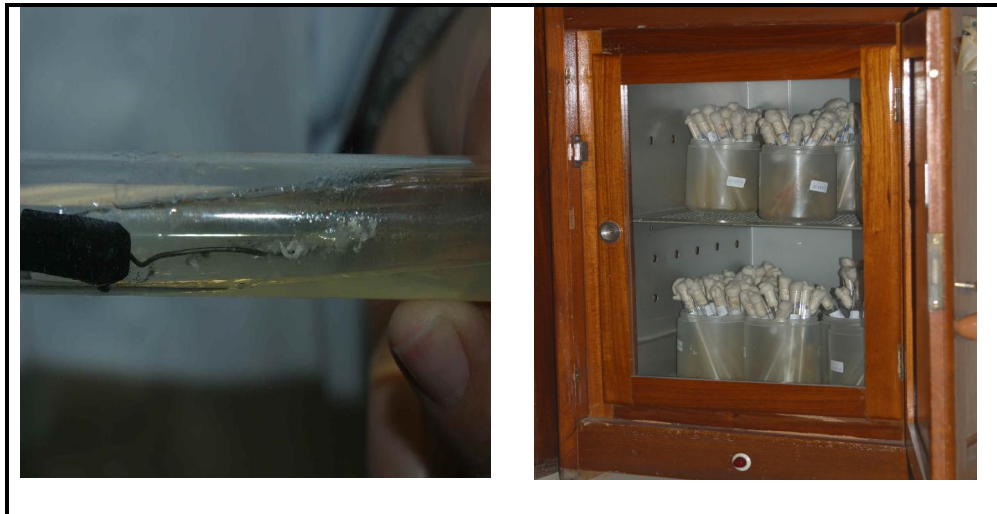


Figura 14: À esquerda semeadura em ágar Sabouraud. À direita estufa com meios de cultura à temperatura adequada para o desenvolvimento fúngico.

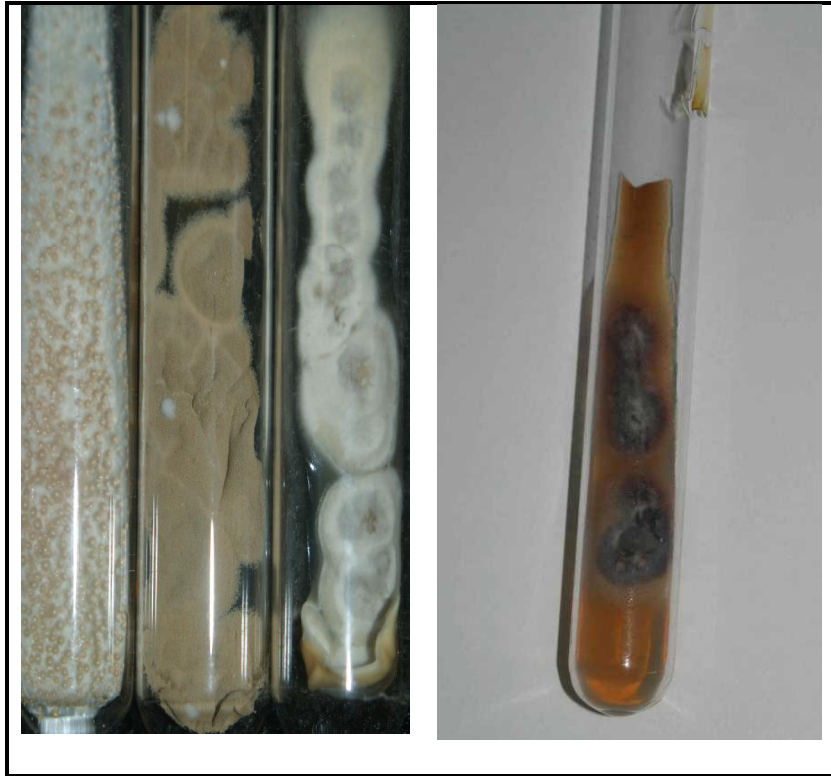


Figura 15: Meios de culturas com colônias fúngicas. À direita reverso do meio de cultura com *Trychophyton rubrum*.



Figura 16: Balança utilizada para pesar os ingredientes para confecção dos meios de cultura. À direita, autoclave.



Figura 17: Micoteca com colônias de fungos.

Exame anatomopatológico - os fragmentos ungueais coletados por biópsia são fixados com formalina 4% e embebidos em parafina líquida a 60⁰ Celcius. Posteriormente as lâminas obtidas são coradas usualmente com ácido periódico de Schiff (PAS) para visualização no microscópio^(20, 26, 45-47, 50)

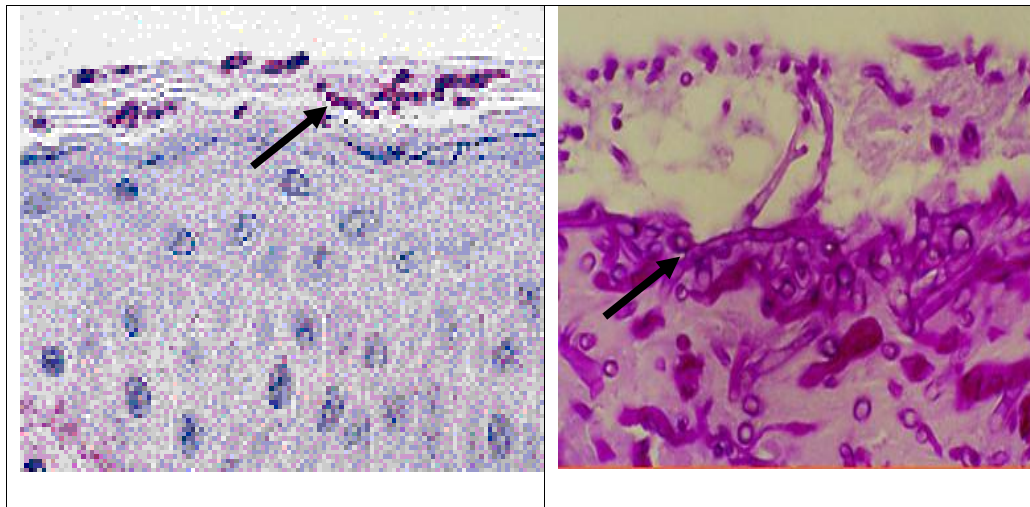


Figura 18: Exames anatomopatológicos de pele demonstrando estruturas fúngicas no seu interior. (aumento400X coloração PAS à esquerda e hematoxilina-eosina à direita)

Calcofluor/Blankophor (branqueador ou clareador fluorescente) - tem sido utilizado como uma alternativa para a detecção de elementos fúngicos em espécimes clínicas das unhas. Liga-se à celulose e elementos da parede dos fungos que fluorescem quando expostos à radiação ultravioleta (UV)^(41, 49, 51, 52).

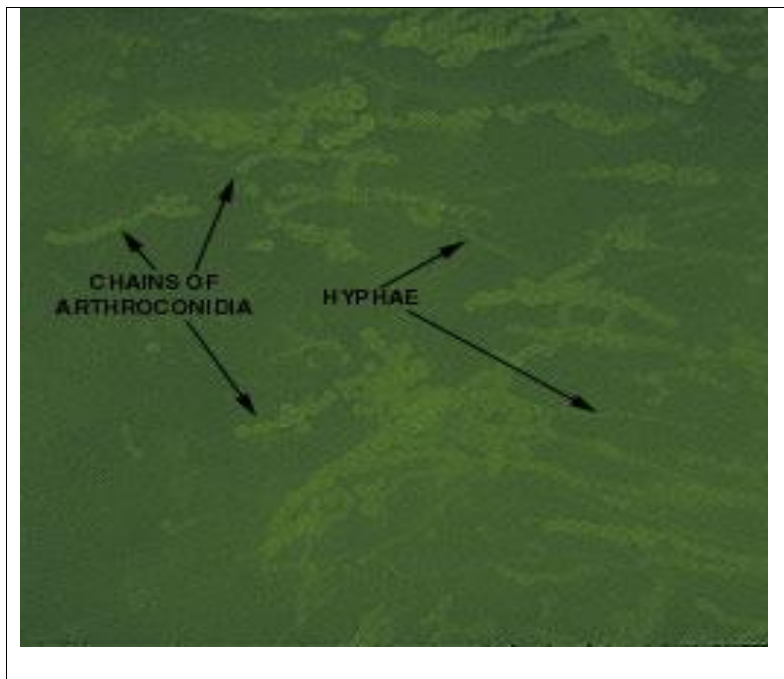


Figura 19: Visualização das estruturas fúngicas pelo método de fluorescência com calcoflúor. (aumento400X)

Reação em cadeia da polimerase (PCR) - protocolos utilizando esta técnica de genética molecular tem sido desenvolvidos para a detecção de dermatófitos e sua diferenciação de outros fungos ungueais. Tem seu uso principalmente em pesquisas sobre onicomicose^(26, 53, 54).

A identificação micológica é uma ciência morfológica, poucos testes “químicos” são úteis. Procedimentos que são comuns em bacteriologia, não são aplicáveis para o

diagnóstico dos fungos⁽²⁸⁾. A experiência por parte do coletador e, principalmente, do micologista, são elementos importantes para uma análise necessária ao diagnóstico. Estes aspectos parecem imitar a prática clínica dermatológica, uma especialidade também morfológica em sua essência.

10. ARTIGO

Concordance between direct mycological examination and mycological culture exam for diagnosing *Tinea unguium* onychomycosis of the feet

Autores:

Paulo Ricardo Martins Souza

Rodrigo Pereira Duquia

Hiram Larangeira de Almeida Júnior

Concordance between direct mycological examination and mycological culture exam for diagnosing *Tinea unguium* onychomycosis of the feet

Summary

Direct mycological examination (DME) with potassium hydroxide 20% is a low-cost-procedure for mycological diagnosis, which can be carried out in only a few minutes. In order to evaluate the need to obtain mycological culture confirmation of examined individuals, we compared the agreement between DME and mycological culture exams with kappa statistics and also estimated the proportion of subjects positively diagnosed with *Tinea unguium* only under mycological culture exams. Reliability between DME and mycological culture exams was 0.54 according to kappa test. DME detected a larger number of cases in relation to mycological culture exam. The proportion of cases diagnosed with onychomycosis caused by dermatophytes only under mycological culture exam was 4%, these findings do not support its large-scale use.

Key-words: onychomycosis; mycoses; diagnostic tests, routine.

Introduction

Toe onychomycosis, a fungal infection of the nail usually caused by a dermatophyte, is one of the commonest dermatological diseases(1-3). It is characterized by a fungal infection of the nail apparatus that includes dermatophytes, non-dermatophyte moulds and yeasts. Although not life-threatening, onychomycosis constitutes an important health problem because of its high prevalence (nearly 10% in the U.S. adult population) and associated morbidity(4). Onychomycosis can produce negative impacts on affected individuals such as pain, which, in turn, may undermine work productivity and disturb social interactions(5-7).

Toenails are affected in 80% of all cases of onychomycosis; dermatophytes, mostly *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*, are the causative agents in over 90% of all cases. The techniques usually adopted for diagnostic purposes are direct microscopic examination (DME) and mycological culture exams. DME prepared with specimens and potassium hydroxide (KOH) 20% is regarded as the simplest, fastest and cheapest method of diagnosis.

Easy identification of fungal elements (hiphae) with DME allows the dermatologist to promptly prescribe therapy for onychomycosis. On the other hand, submitting a specimen to mycological culture is far more complex and expensive (the cost is about four times higher when compared with DME in Brazil, for example); it takes between 15-30 days to present final test results, and requires an available and appropriate laboratory structure where specimens can be handled. Other methods of onychomycosis diagnosis are available. However, they are even more costly and, therefore, not frequently used.

Articles in the literature have advocated different tests as gold-standard exam for onychomycosis⁽⁸⁻¹¹⁾. However, none of them were methodologically designed to detect false-positive and false-negative test results, and this jeopardises a more detailed evaluation of the potential use of mycological culture as a gold-standard test for onychomycosis diagnosis.

The objective of this study was to determine the agreement between DME and mycological culture exam in onychomycosis diagnosis and to estimate the proportion of cases diagnosed with onychomycosis caused by dermatophytes only under mycological culture exam.

Materials and methods

A cross-sectional study was carried out with individuals recruited at the outpatient clinic of the Department of Dermatology from the Santa Casa Hospital in Porto Alegre, Southern Brazil. All patients admitted to the clinic during a period of twelve months (year 2005) in whom one of the possibilities of diagnosis was toenail mycosis were included in the present study (n=890). Specimens from all patients were submitted to both DME and mycological culture exams.

Scrapings from all patients were analysed according to the following procedures: sub-ungueal curettage was used to obtain as much sub-ungueal debris as possible from the nail lesion. KOH preparations were made by placing samples on a glass slide with 20% KOH. Specimens were briefly heated, and microscopically analysed for the presence of fungal elements. Mycological cultures were obtained with Sabouraud's (dextrose agar and mycosel) agar. Cultures were stored in greenhouses at 25° C for five weeks and were also checked periodically for fungal growth. Species of each positive culture were determined by macro and microscopic examination.

A technical assistant carried out the collection and preparation of DME and culture specimens, while reading of results was done by an experienced mycologist. The technical assistant and the mycologist were both blinded to the study objectives and hypotheses. Results from DMEs and mycological cultures were classified according to the following categories: dermatophytes, non-dermatophytes moulds and yeasts. Then, for analytical purposes, results from DMEs and mycological cultures were re-categorized into the following groups: dermatophytes and non-dermatophytes.

Data were entered twice into Epi Info 6.04 with automatic checks for consistency and range. Thereafter, data were transferred into Stata version 9, where all analyses were run.

The study protocol was approved by the local Ethics Committee, and verbal consent was obtained from each participant.

Results

From the total of 890 patients, the DME detected 34% dermatophytes, 10% of non-dermatophytes molds, 6% of mixed infection (dermatophytes plus non-dermatophytes molds) and 3% yeasts, the DME was negative in 47% of the individuals (Table 1).

The culture detected 23% dermatophytes, 8% non-dermatophytes molds, 7% yeasts and was negative in 62% of the individuals.

The table 2 shows that the DME and culture agreed in 721(81%) and disagreed in 169 (19%) individuals. Of this 169, the DME was the only test to identify dermatophytes in 133(15%) and the culture was the only test to identify dermatophytes in the other 36(4%).

Discussion

Onychomycosis is a chronic disease with negative impact on the patient's quality of life, including the physical, social and emotional dimensions. It may also have psychosocial impacts on affected individuals because of its effects on the nail appearance, which may produce embarrassment, reduced self-esteem, and may contribute to social isolation^(6, 7). Furthermore, toenail onychomycosis can interfere with the practice of physical exercise and shoe fit⁽⁶⁾. Also, onychomycosis is considered a risk factor for bacterial cellulitis of the leg⁽¹²⁾.

The aetiology of onychomycosis is multifactorial. Some individuals are prone to have nail infections due to many predisposing factors, such as advanced age, use of medications (immunosuppressants), diabetes, peripheral arterial disease and smoking^(13, 14).

In 1997, a multicentric Canadian study with new patients visiting dermatologists' offices, the frequency of toenail onychomycosis was 9.1%, with 93% caused by dermatophytes⁽¹⁵⁾.

In the same country, another multicentric study showed that in the age groups of 0-19, 20-39, 40-59 and 60-79 years of age the prevalence of toenail fungal infections were 0.7%, 3.1%, 9.5% and 18.2%, respectively. Dermatophytes were the causative agents in 90% of them⁽³⁾.

Current laboratory methods for the diagnosis of onychomycosis include microscopy with KOH test, fungal culture, histopathological examination with periodic

acid-Schiff (PAS) stain, immunofluorescent microscopy with calcofluor stain, enzyme analysis, in vivo confocal microscopy and polymerase chain reaction. Among all these techniques, DME and mycological culture exams are the most widely used(16, 17).

DME is a low-cost procedure and can be carried out in only a few minutes; it is a routine procedure for mycological diagnosis in dermatology.

According to the findings presented here, DME detected a larger number of cases in relation to mycological culture exam. Staats et al also demonstrated that, in cases of dermatophyte infections, DME also detects more cases of toe onychomycosis than mycological culture exam⁽¹⁸⁾. The authors believed this was a result of difficulty in growing dermatophytes in a laboratory setting. A drawback of this method is that recognition of fungal elements with microscopy requires considerable experience and expertise.

Our results suggest that mycological culture exams were not able to effectively improve the number of cases diagnosed with onychomycosis caused by dermatophytes, with only 4% of positive test results beyond those already detected with DME. This could be considered a reasonable argument against the large-scale use of mycological culture exams.

Therefore, a rational management of resources in order to reduce mycological culture exam in terms of public health should be always kept in mind. There are multiple costs associated with the laboratory diagnosis. DME, currently, is the cheapest and fastest available technique to detect *Tinea unguium*. This technique avoids the need

for a complex laboratory structure.

In Brazil, the cost of a DME is approximately USD 10.00 and mycological culture exams costs USD 20.00. In the studied sample, the costs involved with DME reached USD 8,900 per year, while the costs involved with culture exams equalled USD 17,800 per year.

When DME test is negative and, even though, the dermatologist is highly suspicious about the diagnosis, other techniques could be used. Probably a second DME in will be more useful than the culture to make the diagnosis.

One of the main limitations of the present study was the lack of a gold-standard diagnostic test to detect false-positive and false-negative test results. Therefore, prospective studies should be carried out so that the onychomycosis natural history can be determined and the proportion of false-positive and false-negative test results can be estimated for each diagnostic test.

Our results indicate the use of mycological culture exam may not be very helpful, and that the high costs associated with it may counter-indicate it in large-scale use.

Table 1. Sample distribution according to DME and mycological culture exam test results(n=890).

Variables	DME	Mycological cultural exam
	n / (%)	n / (%)
Dermatophytes	303 / 34	206 / 23
Non-dermatophytes moulds	89 / 10	71 / 8
Yeasts	27 / 3	61 / 7
Mixed	52 / 6	0 / 0
Negative	419 / 47	552 / 62
Total	890 / 100	890 / 100

Table 2. Comparison between DME and mycological culture exam findings about the presence or not of dermatophytes.

		Cultural				
		Dermatophytes		Non-dermatophytes	Total	
		N (%)		N (%)		
KOH	Dermatophytes	170 (19.0)	a	133 (15.0)	b	303
	Non-dermatophytes	36 (4.0)	c	551 (62.0)	d	587
Total		206		684		890

Letters “a” and “d” represents agreement between exams, “b” and “c” disagreement.

References

1. Roberts DT. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: results of an omnibus survey. *Br J Dermatol* 1992;126 Suppl 39:23-7.
2. Haneke E, Roseeuw D. The scope of onychomycosis: epidemiology and clinical features. *Int J Dermatol* 1999;38 Suppl 2:7-12.
3. Gupta AK, Jain HC, Lynde CW, Macdonald P, Cooper EA, Summerbell RC. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicenter canadian survey of 15,000 patients. *J Am Acad Dermatol* 2000;43(2 Pt 1):244-8.
4. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 2000;43(4):641-8.
5. Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):415-29.
6. Katsambas A, Abeck D, Haneke E, van de Kerkhof P, Burzykowski T, Molenberghs G, et al. The effects of foot disease on quality of life: results of the Achilles Project. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19(2):191-5.
7. Drake LA, Patrick DL, Fleckman P, Andr J, Baran R, Haneke E, et al. The impact of onychomycosis on quality of life: development of an international onychomycosis-specific questionnaire to measure patient quality of life. *J Am Acad Dermatol* 1999;41(2 Pt 1):189-96.
8. Feuilhade de Chauvin M. New diagnostic techniques. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19 Suppl 1:20-4.
9. Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, Rossi M, Fabbrizio L, Masciangelo R, et

- al. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. *Mycoses* 2006;49(1):26-9.
10. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2003;49(2):193-7.
 11. 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(9):1112-6.
 12. Roujeau JC, Sigurgeirsson B, Korting HC, Kerl H, Paul C. Chronic dermatomycoses of the foot as risk factors for acute bacterial cellulitis of the leg: a case-control study. *Dermatology* 2004;209(4):301-7.
 13. Gupta AK, Gupta MA, Summerbell RC, Cooper EA, Konnikov N, Albreski D, et al. The epidemiology of onychomycosis: possible role of smoking and peripheral arterial disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2000;14(6):466-9.
 14. Gupta AK, Konnikov N, MacDonald P, Rich P, Rodger NW, Edmonds MW, et al. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. *Br J Dermatol* 1998;139(4):665-71.
 15. Gupta AK, Jain HC, Lynde CW, Watteel GN, Summerbell RC. Prevalence and epidemiology of unsuspected onychomycosis in patients visiting dermatologists' offices in Ontario, Canada--a multicenter survey of 2001 patients. *Int J Dermatol* 1997;36(10):783-7.
 16. Herbst RA, Brinkmeier T, Frosch PJ. [Histological diagnosis of onychomycosis]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2003;1(3):177-80.
 17. Elewski BE. Diagnostic techniques for confirming onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 1996;35(3 Pt 2):S6-9.

18. Staats CC, Korstanje MJ. [Fungi causing onychomycoses in The Netherlands].
Ned Tijdschr Geneesk 1994;138(47):2340-3.

11. ANEXOS

Com o objetivo de avaliar se os achados encontrados nas nossas análises eram consistentes com os diferentes grupos de indivíduos estudados, realizamos análises estratificadas por sexo e idade.

Avaliamos a concordância entre o EMD e cultural estratificado pelo sexo.

Conforme encontrado na análise incluindo todos os indivíduos, avaliando apenas o sexo feminino, o Kappa entre o EMD e cultural foi de 0,49. Entre as mulheres o cultural identificou apenas 3,9% das tineas ungueais não identificadas pelo EMD.

Tabela 1. Comparação entre o EMD e cultural entre as mulheres.

		Cultural		
		Dermatófitos	Não-dermatófitos	Total
		N (%)	N (%)	
KOH	Dermatófitos	80 (12,2)	85 (12,9)	165
	Não-dermatófitos	25 (3,9)	467 (71,1)	492
Total		105	552	657

Entre os homens a concordância avaliada pelo Kappa foi de 0,51. A contribuição do cultural no diagnóstico das tineas ungueais foi de 4,7%.

Tabela 2. Comparação entre o EMD e cultural entre os homens.

		Cultural		
		Dermatófitos	Não-dermatófitos	Total
		N (%)	N (%)	
KOH	Dermatófitos	90 (38,6)	48 (20,6)	138
	Não-dermatófitos	11 (4,7)	84 (36,1)	95
Total		101	132	233

Para análise por sexo, dividimos os indivíduos em 3 categorias:

- I. Até 40 anos;
- II. 41 a 60 anos; e
- III. 61 anos ou mais.

Nas três categorias as análises foram semelhantes. A colaboração do exame cultural para o diagnóstico de onicomicose não ultrapassou 4,5%. O Kappa máximo obtido foi entre os indivíduos de 41 a 60 anos. Abaixo apresentamos as três tabelas comparando o EMD e cultural entre os diferentes estratos de idade.

Tabela 3: Comparação entre o EMD e cultural entre indivíduos até 40 anos ambos os sexos.

		Cultural		
		Dermatófitos	Não-dermatófitos	Total
		N (%)	N (%)	
KOH	Dermatófitos	79 (26,3)	45 (15,0)	124
	Não-dermatófitos	13 (4,3)	163 (54,3)	176
Total		92	208	300

Tabela 4: Comparação entre o EMD e cultural entre indivíduos entre 41 e 60 anos de idade em ambos os sexos.

		Cultural		
		Dermatófitos	Não-dermatófitos	Total
		N (%)	N (%)	
KOH	Dermatófitos	67 (17,2)	45 (11,6)	112
	Não-dermatófitos	14 (3,6)	263 (67,6)	277
Total		81	308	389

Tabela 5: Comparação entre o EMD e cultural entre indivíduos acima de 60 anos de idade de ambos os sexos.

		Cultural		
		Dermatófitos	Não-dermatófitos	Total
		N (%)	N (%)	
KOH	Dermatófitos	24 (11,9)	43 (21,4)	67
	Não-dermatófitos	9 (4,5)	125 (62,2)	134
Total		33	168	201

12. REFERÊNCIAS

1. Haugh M, Helou S, Boissel JP, Cribier BJ. Terbinafine in fungal infections of the nails: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Br J Dermatol* 2002;147(1):118-21.
2. Bologna J. *Dermatology*. 1 ed. London: Mosby; 2003.
3. Haneke E, Roseeuw D. The scope of onychomycosis: epidemiology and clinical features. *Int J Dermatol* 1999;38 Suppl 2:7-12.
4. Nelson MM, Martin AG, Heffernan MP. Fungal diseases with cutaneous involvement. In: Freedberg IM EA, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editor. *Dermatology in General Medicine*. New York: Mc Graw-Hill; 2003. p. 2001-5.
5. Lubeck DP. Measuring health-related quality of life in onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 1998;38(5 Pt 3):S64-8.
6. Gupta AK, Konnikov N, MacDonald P, Rich P, Rodger NW, Edmonds MW, et al. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. *Br J Dermatol* 1998;139(4):665-71.
7. Faergemann J, Baran R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *Br J Dermatol* 2003;149 Suppl 65:1-4.
8. Djeridane A, Djeridane Y, Ammar-Khodja A. Epidemiological and aetiological study on tinea pedis and onychomycosis in Algeria. *Mycoses* 2006;49(3):190-6.
9. Gupta AK, Jain HC, Lynde CW, Macdonald P, Cooper EA, Summerbell RC. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicenter canadian survey of 15,000 patients. *J Am Acad Dermatol* 2000;43(2 Pt 1):244-8.
10. Roberts DT. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United

- Kingdom: results of an omnibus survey. *Br J Dermatol* 1992;126 Suppl 39:23-7.
11. Effendy I, Lecha M, Feuilhade de Chauvin M, Di Chiacchio N, Baran R. Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19 Suppl 1:8-12.
 12. Gupta AK, Gupta MA, Summerbell RC, Cooper EA, Konnikov N, Albreski D, et al. The epidemiology of onychomycosis: possible role of smoking and peripheral arterial disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2000;14(6):466-9.
 13. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 2000;43(4):641-8.
 14. Drake LA, Patrick DL, Fleckman P, Andr J, Baran R, Haneke E, et al. The impact of onychomycosis on quality of life: development of an international onychomycosis-specific questionnaire to measure patient quality of life. *J Am Acad Dermatol* 1999;41(2 Pt 1):189-96.
 15. Roujeau JC, Sigurgeirsson B, Korting HC, Kerl H, Paul C. Chronic dermatomycoses of the foot as risk factors for acute bacterial cellulitis of the leg: a case-control study. *Dermatology* 2004;209(4):301-7.
 16. Romano C, Gianni C, Difonzo EM. Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985-2000. *Mycoses* 2005;48(1):42-4.
 17. El Sayed F, Ammouy A, Haybe RF, Dhaybi R. Onychomycosis in Lebanon: a mycological survey of 772 patients. *Mycoses* 2006;49(3):216-9.
 18. Ilkit M. Onychomycosis in Adana, Turkey: a 5-year study. *Int J Dermatol* 2005;44(10):851-4.
 19. Chi CC, Wang SH, Chou MC. The causative pathogens of onychomycosis in

- southern Taiwan. *Mycoses* 2005;48(6):413-20.
20. Schwartz RA, Janniger CK. Onychomycosis. *Cutis* 1996;57(2):67-74, 80-1.
 21. Perea S, Ramos MJ, Garau M, Gonzalez A, Noriega AR, del Palacio A. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3226-30.
 22. Mugge C, Haustein UF, Nenoff P. [Causative agents of onychomycosis--a retrospective study]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2006;4(3):218-28.
 23. Nishimoto K. [An epidemiological survey of dermatomycoses in Japan, 2002]. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2006;47(2):103-11.
 24. Koussidou T, Devliotou-Panagiotidou D, Karakatsanis G, Minas A, Mourellou O, Samara K. Onychomycosis in Northern Greece during 1994-1998. *Mycoses* 2002;45(1-2):29-37.
 25. Wang SH, Chi CC. Onychomycosis in Taiwan. *Int J Clin Pract* 2005;59(8):906-11.
 26. Feuilhade de Chauvin M. New diagnostic techniques. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19 Suppl 1:20-4.
 27. Roberts SOB, Hay RJ, Mackenzie DWR. A clinician's guide to fungal disease. New York: Marcel Dekker; 1984.
 28. Rippon JW. *Medical mycology*. 3 ed. Chicago: W.B.Saunders Company; 1988.
 29. Darier S, Sabouraud R, Gougerot H, Milian G, Pautrier LM, Ravaut P, et al. *Nouvelle pratique dermatologique*. 1^a ed. Paris: Masson ET Cie; 1936.
 30. Gill D, Marks R. A review of the epidemiology of tinea unguium in the community. *Australas J Dermatol* 1999;40(1):6-13.
 31. Lupa S, Seneczko F, Jeske J, Glowacka A, Ochecka-Szymanska A. Epidemiology of dermatomycoses of humans in central Poland. Part IV.

- Onychomycosis due to dermatophytes. *Mycoses* 1999;42(11-12):657-9.
32. Welsh O, Welsh E, Ocampo-Candiani J, Gomez M, Vera-Cabrera L. Dermatophytoses in monterrey, mexico. *Mycoses* 2006;49(2):119-23.
 33. Crawford F. Athlete's foot. *Clin Evid* 2005(14):2000-5.
 34. del Palacio A, Cuetara MS, Garau M, Perea S. Onychomycosis: a prospective survey of prevalence and etiology in Madrid. *Int J Dermatol* 2006;45(7):874-6.
 35. Ioannidou DJ, Maraki S, Krasagakis SK, Tosca A, Tselentis Y. The epidemiology of onychomycoses in Crete, Greece, between 1992 and 2001. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20(2):170-4.
 36. Lopes JO, Alves SH, Mari CR, Oliveira LT, Brum LM, Westphalen JB, et al. A ten-year survey of onychomycosis in the central region of the rio grande do sul, brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999;41(3):147-9.
 37. Whittam LR, Hay RJ. The impact of onychomycosis on quality of life. *Clin Exp Dermatol* 1997;22(2):87-9.
 38. Katsambas A, Abeck D, Haneke E, van de Kerkhof P, Burzykowski T, Molenberghs G, et al. The effects of foot disease on quality of life: results of the Achilles Project. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19(2):191-5.
 39. Elewski BE. The effect of toenail onychomycosis on patient quality of life. *Int J Dermatol* 1997;36(10):754-6.
 40. Baran R, Hay RJ, Tosti A, Haneke E. A new classification of onychomycosis. *Br J Dermatol* 1998;139(4):567-71.
 41. Hay R. Literature review. Onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19 Suppl 1:1-7.
 42. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7 ed. London: Blackwell Science; 2004.

43. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA. *Dermatology in general medicine*. 6 ed. New York: Mc Graw Hill; 2003.
44. Reisberger EM, Abels C, Landthaler M, Szeimies RM. Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid-Schiff-stained nail clippings. *Br J Dermatol* 2003;148(4):749-54.
45. Karimzadegan-Nia M, Mir-Amin-Mohammadi A, Bouzari N, Firooz A. Comparison of direct smear, culture and histology for the diagnosis of onychomycosis. *Australas J Dermatol* 2007;48(1):18-21.
46. 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(9):1112-6.
47. Gianni C, Morelli V, Cerri A, Greco C, Rossini P, Guiducci A, et al. Usefulness of histological examination for the diagnosis of onychomycosis. *Dermatology* 2001;202(4):283-8.
48. Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, Rossi M, Fabbrizio L, Masciangelo R, et al. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. *Mycoses* 2006;49(1):26-9.
49. Ellis DH. Diagnosis of onychomycosis made simple. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(6 Pt 2):S3-8.
50. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J Med Microbiol* 2000;49(6):493-7.
51. Hamer EC, Moore CB, Denning DW. Comparison of two fluorescent whiteners, Calcofluor and Blankophor, for the detection of fungal elements in clinical specimens in the diagnostic laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(2):181-4.
52. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L.

Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2003;49(2):193-7.

53. Baylan O, Arca E, Ozcan A, Kisa O, Albay A, Doganci L. Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in lupus vulgaris: a case report. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8(9):1147-50.
54. Gutzmer R, Mommert S, Kuttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 2004;53(Pt 12):1207-14.