

Sensibilidad y especificidad del examen directo micológico con blanco de calcofluor para el diagnóstico de onicomicosis

Sensitivity and specificity of mycological direct examination with calcofluor white for the diagnosis of onychomycosis

K. Sánchez Armendáriz¹, RF Fernández Martínez¹, ME Moreno Morales¹, L. Villegas Acosta², F. Meneses González², R. Arenas Guzmán¹

¹División de Dermatología. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

²Dirección General Adjunta de Epidemiología. Secretaría de Salud. México D. F. México.

Correspondencia:
Roberto Arenas Guzmán
e-mail: rarenas98@hotmail.com

Recibido: 29/4/2013

Aceptado: 30/10/2013

Resumen

Introducción: La creciente importancia de la onicomicosis, no sólo por el aumento en su frecuencia sino también por el incremento de patógenos emergentes, plantea un reto diagnóstico y terapéutico.

Material y métodos: Estudio comparativo, abierto, observacional y transversal de pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis y se comparó la utilidad diagnóstica del examen directo con KOH-negro de clorazol y el blanco de calcofluor, tomando como estándar de oro la biopsia de la porción distal de la lámina ungueal teñida con PAS.

Resultados: Se incluyeron 165 pacientes (70% mujeres), el 79,4% fueron positivos para onicomicosis (OSDL 50,9%) en uñas de pies (89%) con 6 años de evolución. Se reportó una sensibilidad: KOH-negro de clorazol 90,12% (95% CI: 81,46%-95,63%) vs blanco de calcofluor 86,42% (95% CI: 76,99%-93,01%) y una especificidad de 50% para KOH-negro de clorazol (95% CI: 38,89%-61,11%) vs 60,71% para blanco de calcofluor (95% CI: 49,45%-71,20%). Así mismo, se registró un VPP de 63,48% para KOH-negro de clorazol (95% CI: 53,99%-72,26%) y de 67,96% para blanco de calcofluor (95% CI: 58,04%-76,81%) y un VPN de 84% (95% CI: 70,88%- 92,81%) y 82,26% (95% CI: 70,46%-90,78%), respectivamente.

Comentario: El examen directo con blanco de calcofluor resulta una buena herramienta diagnóstica debido a que es altamente sensible, requiere de poca experiencia por parte del observador, se realiza mediante un procesamiento sencillo, que consume poco tiempo y es de bajo costo.

Palabras clave: onicomicosis, diagnóstico, examen directo, KOH, blanco de calcofluor, biopsia, PAS.

(K. Sánchez Armendáriz, RF Fernández Martínez, ME Moreno Morales, L. Villegas Acosta, F. Meneses González, R. Arenas Guzmán. Sensibilidad y especificidad del examen directo micológico con blanco de calcofluor para el diagnóstico de onicomicosis. *Med Cutan Iber Lat Am* 2013;41(6):261-266)

Summary

Introduction: The growing importance of onychomycosis, not only by the increase in frequency but also by the rise of emerging pathogens poses a diagnostic and therapeutic challenge.

Material and methods: A comparative, open, observational, transversal, which included patients with clinical diagnosis of onychomycosis and compared the diagnostic utility of direct examination of KOH-chlorazol black and calcofluor white, on the gold standard biopsy of the distal portion of the nail plate stained with PAS.

Results: We included 165 patients (70% women), 79.4% were positive for onychomycosis (OSDL 50.9%) in toenails (89%) with 6 years of evolution. They reported a sensitivity: KOH-black of chlorazol 90.12% (95% CI: 81.46% -95.63%) vs 86.42% calcofluor white (95% CI: 76.99% -93.01%), and a specificity of 50% KOH-black of chlorazol (95% CI: 38.89% -61.11%) vs 60.71% for calcofluor white (95% CI: 49.45% -71.20%). Also, there was a PPV of 63.48% for chlorazol KOH-black (95% CI: 53.99% -72.26%) and 67.96% for calcofluor white (95% CI: 58.04% -76.81%) and a NPV of 84% (95% CI: 70.88% - 92.81%) and 82.26% (95% CI: 70.46% -90.78%), respectively.

Comment: The direct examination with calcofluor white is a good diagnostic tool because it is highly sensitive, requires little expertise on the part of the observer, is performed by simple processing, which consumes little time and is inexpensive.

Key words: onychomycosis, diagnosis, direct examination, KOH, calcofluor white, biopsy, PAS.

El término onicomicosis deriva del griego “onyx” que significa uña y “mykes” que significa hongo y hace referencia a la infección de las uñas causada por hongos dermatofitos, mohos no dermatofitos o levaduras[1].

La onicomicosis tiene una prevalencia estimada del 10% en la población mundial (48% de la población geriátrica)[2], es la causa más común de onicodistrofia y representa el 50% de las onicopatías y el 30% de las micosis cutáneas superficiales[3].

Dentro del espectro clínico de la onicomicosis se consideran 5 variedades clínicas que dependen de dos factores: la vía de entrada y el agente infectante[1, 3]:

- Onicomicosis subungueal distal lateral (OSDL).
- Onicomicosis subungueal proximal (OSP).
- Onicomicosis blanca superficial (OBS).
- Onicomicosis distrófica total (ODT).
- *Endonyx*.

La creciente importancia de la onicomicosis, no sólo por el aumento en su frecuencia sino también por el incremento de patógenos emergentes, plantea un reto diagnóstico y terapéutico. Se reconoce que la detección del hongo en muestras de uña tiene muchas limitaciones pues depende de diversos factores y que el tratamiento antifúngico conlleva potenciales efectos adversos para los pacientes. Por lo tanto, es necesario evaluar otras alternativas diagnósticas que brinden mayor sensibilidad para la detección del hongo mediante un procesamiento sencillo, económico y que consuma poco tiempo para guiar la mejor decisión terapéutica.

El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad y especificidad del examen directo con blanco de calcoflúor para el diagnóstico de onicomicosis.

Material y métodos

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, abierto, observacional y transversal. Se incluyeron las muestras de pacientes referidos a la sección de Micología División de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” con diagnóstico clínico de onicomicosis. Se consideró como estándar de oro la biopsia teñida con ácido periódico de Schiff (PAS). Se calculó la sensibilidad y especificidad de toda la muestra de forma independiente y dependiente del tiempo de evolución (mayor o menor a 5 años). Se registraron las características demográficas de los pacientes, las comorbilidades y el tipo de onicomicosis. A todas las muestras se les realizó examen directo con blanco de calcoflúor y se registró el número de estructuras fúngicas y el hallazgo de fungomas (1:escasas; 2:moderadas; 3: abundantes; 4: fungomas). Asimismo, se tomó a todas las muestras biopsia de la porción distal de la lámina ungueal y se tiñó con ácido periódico de Schiff.

Para el examen directo con blanco de calcoflúor la muestra se coloca en un portaobjetos con una gota de tinción fluorescente (blanco de calcoflúor M2R 1g/L y azul Evans 0,5 g/L), se cubre y se deja reposar durante 1 minuto. Posteriormente, se examina bajo luz UV a 100x en un microscopio de fluorescencia entre 380-440 nm (Olympus BX40 filtro de excitaciones 385-400 475-493 545-565 y filtro barrera BA 450-465 503-533 582-622 para microscopio TE 300).

Los hongos presentan una fluorescencia verde brillante o blanco azulado, mientras que otros materiales (p.e. fibras de algodón) se observan con una fluorescencia rojo-anaranjada. Una prueba se considera positiva cuando se observan formas redondas o filamentosas cuyo perímetro exhibe fluorescencia azul brillante. En los hongos tabicados, el tabique se observa claramente (Figura 1).

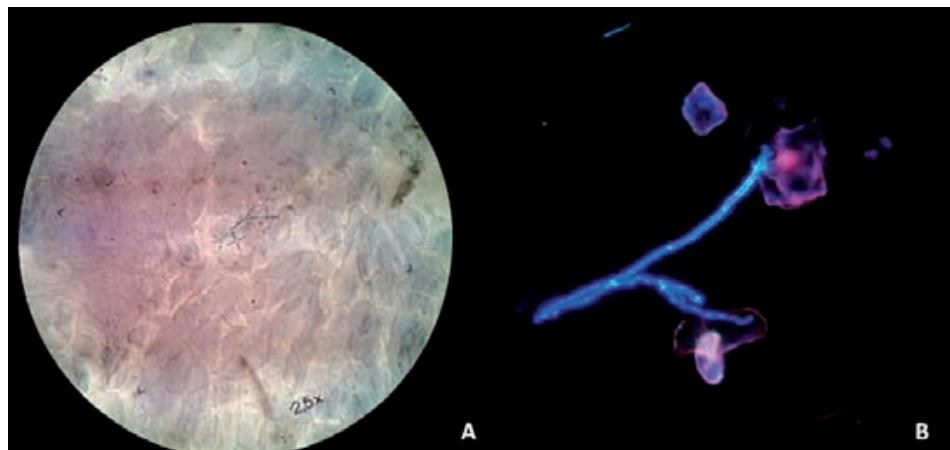


Figura 1. Examen directo. A) KOH-negro de clorazol. B) Blanco de calcoflúor.

Tabla 1. Características demográficas de la población

| Variables | n = 165 (%) |
|-------------------------------|---------------|
| <i>Demográficas</i> | |
| Femenino | 115 (70,3) |
| Edad | 57,75 ± 15,31 |
| Lugar de origen (DF) | 92 (55,76) |
| Lugar de residencia (DF) | 141 (85,45) |
| Ocupación (hogar) | 79 (47,88) |
| <i>Comorbilidades</i> | |
| Diabetes mellitus 2 | 56 (33,94) |
| Reumatológicas | 14 (8,48) |
| Dislipidemia y obesidad | 11 (6,67) |
| Enfermedades respiratorias | 5 (3,03) |
| Enfermedades hematológicas | 3 (1,82) |
| Enfermedades renales | 2 (1,21) |
| Enfermedades cardiovasculares | 74 (44,85) |
| Neoplasias | 6 (3,64) |
| VIH | 2 (1,21) |
| Enfermedades de la tiroides | 10 (6,06) |
| Enfermedades hepáticas | 8 (4,85) |
| Síndrome de Down | 2 (1,21) |
| Enfermedades neurológicas | 9 (5,45) |
| Enfermedades de la piel | 4 (2,42) |
| Origen de la muestra (pies) | 147 (89,09) |
| Evolución en años | 6,01 (0-40) |
| Clinica (OSDL) | 84 (50,9) |

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico Stata versión 11®.

Resultados

Se incluyeron 165 pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis, de los cuales el 70% fueron mujeres, con una edad promedio de 58 años ($\pm 15,81$), dedicadas al hogar (48%) y con comorbilidades como diabetes mellitus (34%) y enfermedades cardiovasculares (45%).

El 79,4% de los pacientes resultaron positivos para el diagnóstico de onicomicosis definido por la presencia de estructuras fúngicas (hifas y/o esporas). La forma clínica más frecuente fue (50,9%), que predominó en uñas de pies (89%) con un tiempo de evolución de 6 años (Tabla 1).

La sensibilidad del examen directo con blanco de calcoflúor fue del 86,42% (95% CI: 76,99%-93,01%), y la especificidad del 60,71% para blanco de calcoflúor (95% CI: 49,45%-71,20%). El valor predictivo positivo fue del 67,96% (95% CI: 58,04%-76,81%), y el valor predictivo negativo del 82,26% (95% CI: 70,46%-90,78%). Al consi-

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad en el total de las muestras y en mayores o mejores de 5 años de evolución

| | Total | < 5 años | > 5 años |
|---------------|--------|----------|----------|
| Sensibilidad | 86,42% | 91,07% | 76% |
| Especificidad | 60,71% | 57,63% | 68% |
| VPP | 67,96% | 67,11% | 70,37% |
| VPN | 82,26% | 87,18% | 73,91% |
| ROC | 0,7511 | 0,7714 | 0,7214 |

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ROC: curva ROC.

derar el tiempo de evolución de la onicomicosis, tomando como corte 5 años de evolución, los valores se expresaron como se muestra (Tabla 2) (Figura 2).

Durante la interpretación de las pruebas diagnósticas se empleó una escala análoga graduada por cruces de acuerdo a la cantidad de estructuras fúngicas observadas (Figura 3).

Comentario

El diagnóstico micológico de la onicomicosis en la mayoría de los centros hospitalarios se realiza mediante examen directo con KOH y cultivo, ambos con una certeza diagnóstica que varía entre 50% y 70% dependiendo de la forma de recolección de la muestra[4, 5].

El examen directo con KOH es un método sencillo y de bajo costo que registra un porcentaje de falsos negativos entre 5-15%[5, 6], probablemente debido a la poca visibilidad de las estructuras fúngicas en una muestra de escama ungueal. En México, los resultados son similares según lo reportado por Moreno-Coutiño y cols., con una sensibilidad de 80%[7].

El blanco de calcoflúor es una tinción fluorescente con gran afinidad por la quitina de la pared fúngica que no requiere fijador ni medio de transporte para su análisis, por lo que su interpretación puede ser inmediata[8].

En este estudio, el examen directo con blanco de calcoflúor demostró ser una prueba diagnóstica con una sensibilidad de 86,42% y una especificidad de 60,71%, lo que contrasta con los resultados de Gupta y cols., quienes reportan una sensibilidad de 31,3%[9]. En cambio, Haldane et al. describen una sensibilidad de 92% y un especificidad de 95%[10]. Chander et al. encontraron una sensibilidad de 95% para 143 úlceras corneales[11].

En México, los resultados de Bonifaz y cols. demuestran una buena correlación diagnóstica entre KOH y blanco de calcoflúor ($\kappa = 0,8085$; $p < 0,0001$) con una sensibilidad de 57,58%, aunque su muestra es pequeña[12].

Es importante resaltar que existen múltiples factores que pueden alterar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de

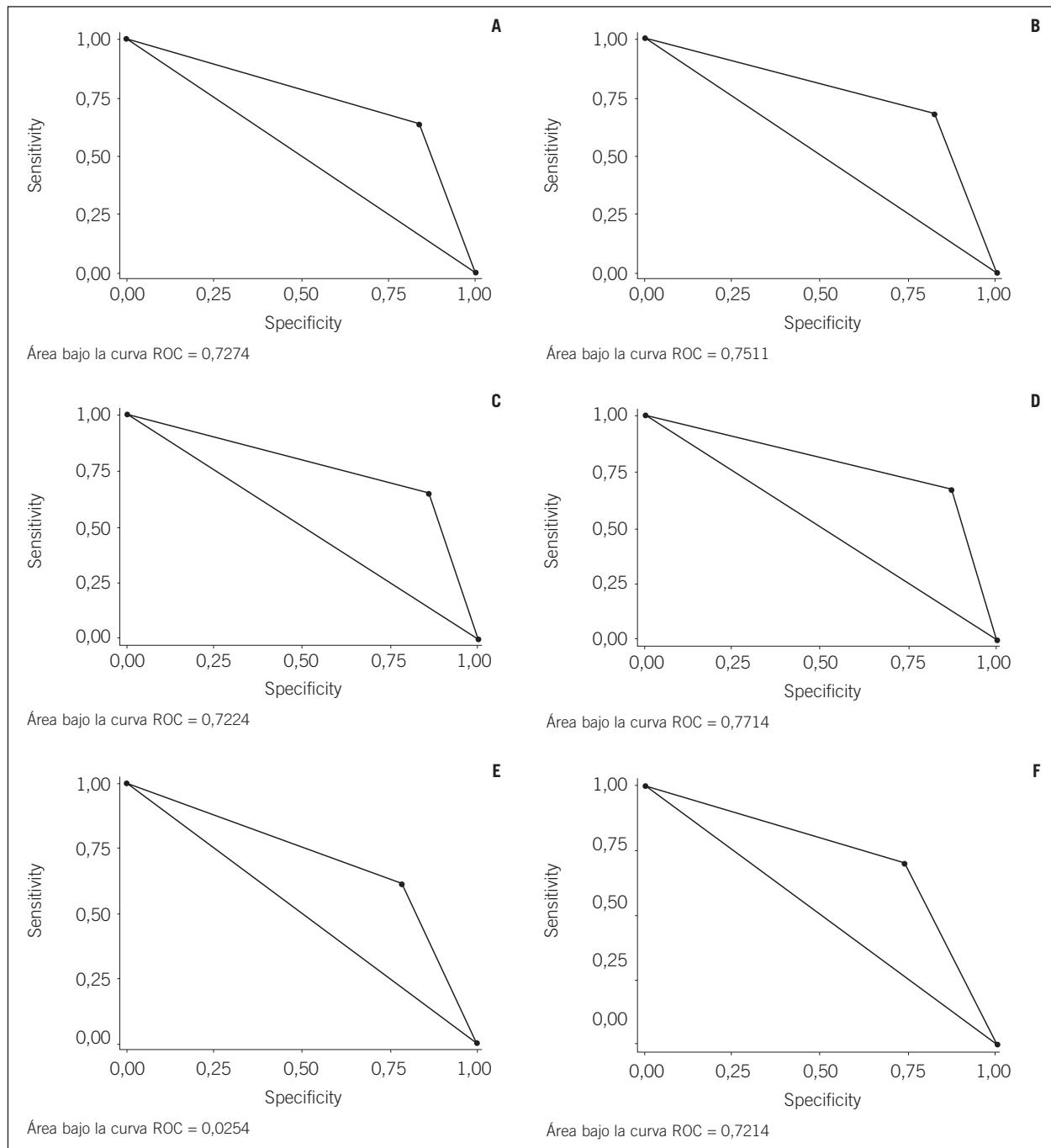


Figura 2. Área bajo la curva ROC. A) Global KOH. B) Global CFW. C) < 5a KOH. D) < 5a CFW. E) > 5a KOH. F) > 5a CFW.

ambas pruebas y que a pesar de que los resultados de éstas generalmente se correlacionan también pueden existir discrepancias, lo que resulta en la necesidad de evaluar otros métodos diagnósticos[13].

Aunque los resultados del VPP y del VPN fueron del 67,96% y 82,26% respectivamente, el examen directo con blanco de calcoflúor puede ser considerado como un buen método de escrutinio y confirmatorio[9, 10, 11].

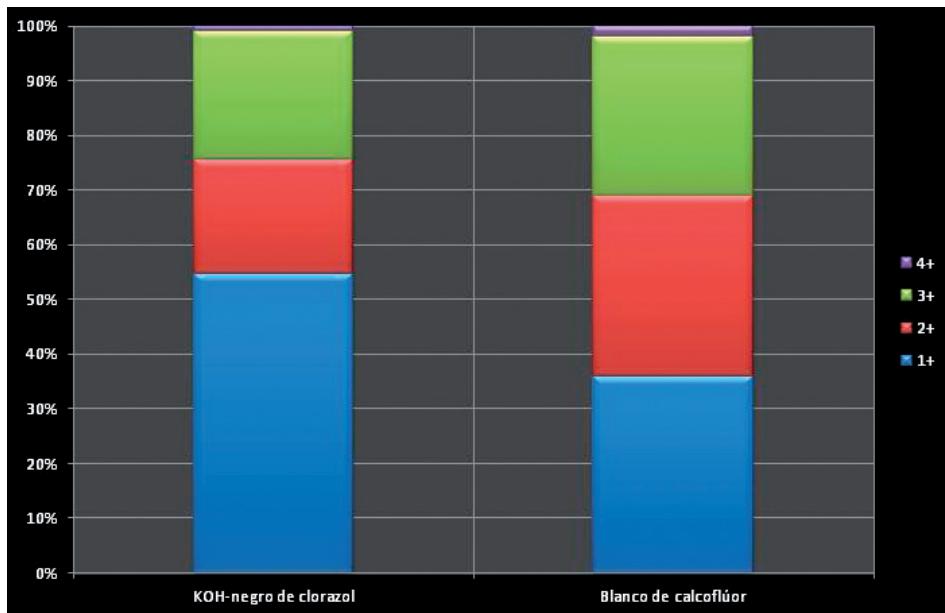


Figura 3. Cantidad de estructuras fúngicas por campo (1+ = escasas; 2+ = moderadas; 3+ = abundantes y 4+ = fungoma).

Al analizar los resultados en relación al tiempo de evolución, la sensibilidad es mayor si el padecimiento tiene menos de 5 años de evolución (91,07%), que cuando la evolución es mayor de 5 años (76%). Por el contrario, la especificidad mejora cuando la onicomicosis tiene más de 5 años (57,63% vs 68%). Por lo que respecta al VPP, su valor mejora levemente en pacientes con más de 5 años con el padecimiento (67,11% vs 70,37%). El VPN es mayor en pacientes con más de 5 años de evolución.

Se identificó un mayor número de estructuras fúngicas por campo estudiado gracias a la fluorescencia del blanco de calcoflúor (65% de 2 o más + vs 47%), lo que simplifica la interpretación de la prueba aún en ojos no expertos, resaltando su utilidad en centros hospitalarios que no cuenten con un área específica de micología.

Conclusiones

Un diagnóstico incorrecto de onicomicosis en cualquier paciente se traduce en un retraso en el tratamiento adecuado, mientras que un diagnóstico certero no sólo permite un mejor uso de los recursos terapéuticos sino que también es crucial en la resolución de la enfermedad[14].

El examen directo con blanco de calcoflúor resulta una buena herramienta diagnóstica debido a que es sensible, principalmente en casos de onicomicosis de larga evolución con múltiples exámenes negativos, requiere de poca experiencia por parte del observador, se realiza mediante un procesamiento sencillo, que consume poco tiempo y es de bajo costo; sin embargo esta técnica como limitaciones, precisa de un microscopio de fluorescencia para su interpretación limitando su uso fuera de una institución hospitalaria.

Bibliografía

- Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis – Epidemiology, Diagnosis and Management. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26: 108-16.
- 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: 641-8.
- Gupta M, Sharma NL, Kenga AK, Mahajan VK, Tegta GR. Onychomycosis: clinic-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2007; 73: 389-92.
- 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: 18-21.
- Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutron WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 193-7.
- Piérard GE, Quatresooz P, Arrese JE. Spotlight on Nail Histomycology. *Dermatol Clin* 2006; 371-4.
- Moreno-Coutino G, Toussaint-Caire S, Arenas R. Clinical, mycological and histological aspects of white onychomycosis. *Mycoses* 2010; 53: 144-7.
- Harrington BJ, Hageage GJ. Calcofluor White: A Review of its Uses and Applications in Clinical Mycology and Parasitology. *Lab Med* 2003; 34: 361-7.
- Gupta AK, Zaman M, Singh J. Diagnosis of *Trichophyton rubrum* from Onychomycosis.

- cotic nail samples using polymerase chain reaction and calcofluor white microscopy. *J Am Podiatr Med Assoc* 2008; 98: 224-8.
10. Haldane DJM, Robart E. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990; 13: 337-9.
11. Chander J, Chakrabarti A, Sharma A, Saini JS, Panigarhi D. Evaluation of calcofluor staining in the diagnosis of fungal corneal ulcer. *Mycoses* 1993; 36: 243-5.
12. Bonifaz A, Rios-Yuil JM, Arenas R, Araiza J, Fernández R, Mercadillo-Pérez et al. Comparison of direct microscopy, culture and calcofluor white for the diagnosis of onychomycosis. *Rev Iber Am Micol* (en prensa, 2012).
13. Piérard-Franchimont C, Kharfi M, Piérard GE. Prélèvement et examen mycologiques des onychomycoses. En: Baran R, Piérard GE, editors. *Onychomycoses*. Paris: Abrégés Masson; 2004: 79-90.
14. Mehregan DC, Gee SL. The cost effectiveness of testing for onychomycosis versus empirical treatment of onychodystrophies with oral anti-fungal agents. *Cutis* 1999; 64: 407-10.