

Utilidad de la muestra de la lámina ungular en el diagnóstico de onicomycosis

Usefulness of nail plate sample in the diagnosis of onychomycosis

Luz Marina Gómez¹, Mónica Massaro², Ángela María Tabares³, Alejandra Zuluaga⁴, Juan David Vélez⁵, Alejandro Vélez⁶, Margarita Jaramillo⁷, Luz Elena Cano⁸

1. Médica dermatóloga; jefe, Servicio de Dermatología, Escuela de Ciencias de la Salud; coordinadora, Grupo de Investigación en Dermatología; profesora titular, Universidad Pontificia Bolivariana; dermatóloga, Clínica SOMA, Medellín, Colombia
2. Médica, M.Sc. en Epidemiología; profesora asociada, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana e Instituto Neurológico de Antioquia. Medellín, Colombia
3. Licenciada en Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas; Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia; Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
4. Médica, microbióloga clínica, Grupo de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas; Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia; Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
5. Médico, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
6. Médico patólogo; docente, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana; Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
7. Bacterióloga, Laboratorio de Patología, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia
8. Ph.D. en Inmunología, Grupo de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas; Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia; Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

Resumen

INTRODUCCIÓN. La sensibilidad de las pruebas convencionales (examen directo, cultivo) para el diagnóstico de la onicomycosis (25 a 80%), representa un problema para la decisión terapéutica del dermatólogo.

OBJETIVO. Determinar la exactitud diagnóstica de la muestra de la lámina ungular en pacientes con diagnóstico clínico de onicomycosis.

METODOLOGÍA. Es un estudio prospectivo de pruebas diagnósticas en 50 pacientes con sospecha de onicomycosis. Se tomó muestra de la lámina ungular con cortaúñas estéril en el área de onicólisis para pruebas micológicas (KOH-cultivo) y de histopatología (hematoxilina y eosina y ácido peryódico de Schiff), y muestra de detritos mediante raspado del lecho para prueba micológica. La toma de muestras y el procesamiento de las pruebas se realizaron en laboratorios de referencia y se interpretaron de manera ciega e independiente. La muestra de detritos se consideró la prueba estándar.

RESULTADOS. Se observó compromiso de los pies en 90% de los pacientes, 86,6% con afectación del primer dedo. La prueba micológica de detritos fue positiva en 80% de los casos, encontrándose estructuras micóticas en el examen directo en 72% y aislamiento al cultivo en 64%. En la lámina ungular, la sensibilidad fue de 87,5% y la especificidad de 80%; el cociente de probabilidades positivo fue 4,4. Cinco muestras positivas con la tinción PAS fueron negativas en la prueba estándar. La sensibilidad neta aumentó a 95% mediante el análisis de las pruebas en paralelo de la lámina ungular. La mayoría de los aislamientos fueron especies de *Candida* (77,3% en detritos y 75,9% en la lámina ungular), y *C. parapsilosis* fue el aislamiento más frecuente.

CONCLUSIÓN. Se propone la muestra de la lámina ungular para pruebas mico-

Correspondencia:

Luz Marina Gómez

Email: flmcartas@une.net.co

Recibido: 10 de noviembre de 2010.

Aceptado: 19 febrero de 2011.

No se reportan conflictos de intereses.

lógicas y tinción de PAS, como complemento a la muestra de detritos para el diagnóstico de onicomicosis.

PALABRAS CLAVE: diagnóstico, onicomicosis, lámina ungular.

Summary

INTRODUCTION: The sensitivity of conventional tests (direct-culture) for the diagnosis of onychomycosis (25-80%) represents a problem for the dermatologist's therapeutic decision.

OBJECTIVE: To determine the diagnostic accuracy of the nail plate sample in patients with clinical diagnosis of onychomycosis.

METHODOLOGY: Prospective study of diagnostic tests in 50 patients with suspected onychomycosis. The nail plate sample was taken with sterile nail clippers from the onycholysis area for mycological testing (KOH-culture) and histopathology (HE-PAS). Another sample by scraping debris from the ungueal bed was taken for mycological test. Sample collection and processing of the tests were performed in reference laboratories and interpreted blindly and independently. The debris from the ungueal bed was considered the gold standard.

RESULTS: Feet were involved in 90% of patients, 86.6% with involvement of the hallux. The mycological test positivity was 80% for detritus, fungal structures were found by direct in 72% and in 64% were isolated by culture. In nail plate sample, the sensitivity was 87.5% and specificity was 80%, the positive likelihood ratio was 4.4. Five samples that were positive for PAS staining were negative in the gold standard test. Net sensitivity increased to 95% by analysis of parallel testing of nail plate. Most of the isolates were *Candida* species (77,3% in debris and 75,9% in nail plate), *C. parapsilosis* being the most commonly isolated.

CONCLUSION: We propose the nail plate sample for mycological test and PAS staining, in addition to the sample of debris for the diagnosis of onychomycosis.

KEY WORDS: Diagnosis, onychomycosis, nails

Introducción

La onicomicosis es una infección micótica de las uñas causada por dermatofitos, levaduras o mohos no dermatofitos. A menudo es una infección inocua, pero puede causar malestar e infección bacteriana secundaria. Su incidencia en el mundo está en incremento; se observa compromiso entre 2 y 20% de la población general y es la causa más frecuente de distrofias ungulares (50%). Las especies de dermatofitos son causantes de infección en uñas en 90% de los casos en Estados Unidos y Europa. En las uñas de las manos, las especies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, son las más frecuentemente aisladas en los países tropicales y, los dermatofitos, en las infecciones de las uñas de los pies¹⁻⁹.

La clasificación clínica de la onicomicosis tiene cinco categorías^{1,2,6,8}:

DISTAL Y LATERAL SUBUNGULAR: la muestra para examen debe tomarse tan cerca como sea posible al área de uña adherida.

BLANCA SUPERFICIAL: debe tomarse muestra por raspado de superficie de la uña.

SUBUNGULAR PROXIMAL: cortar la lámina y realizar raspado del lecho.

ENDONIX SUBUNGULAR: se toma muestra de lámina y detritos subungulares.

DISTRÓFICA TOTAL: debe tomarse fragmento de la uña con detritos.

El diagnóstico de la onicomicosis ha planteado un problema para el dermatólogo, puesto que luego de tener la sospecha clínica, debe realizarse una confirmación por laboratorio, buscando tener una tipificación adecuada del agente causal, para tomar una decisión terapéutica.

Se reconoce que la detección del hongo en muestras de uña tiene muchas limitaciones, pues depende de muchos factores. La preparación previa del área analizada, la calidad y toma del espécimen, su manipulación y tinción, la visualización al microscopio, la técnica de siembra, el medio de cultivo, la experiencia del observador, el número

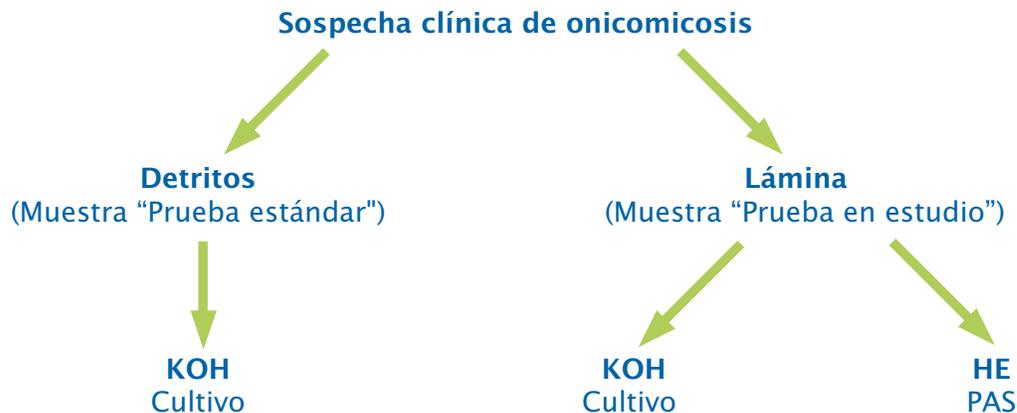


FIGURA 1. Toma de muestras en 50 pacientes con sospecha clínica de onicomicosis.

y la viabilidad de organismos en la muestra y el tiempo de interpretación de resultados, entre otros, juegan un papel importante en el reconocimiento de los agentes etiológicos de la onicomicosis. El examen directo y el cultivo, considerados la prueba estándar, con frecuencia son reportados como negativos, con una sensibilidad que oscila entre 25 y 80% con los métodos convencionales de toma de muestra y procesamiento^{1,2,4-6,8-19}. En este sentido, diferentes series han reportado una proporción de falsos negativos entre 5 y 50 %^{1,2,4,10-13,17,18}.

La utilización de otras técnicas para mejorar la exactitud diagnóstica en la onicomicosis, ha sido motivo de múltiples estudios. Se han propuesto métodos como: la tinción con calcoflúor para el examen directo, la evaluación histopatológica con tinciones de ácido peryódico de Schiff (PAS) y de plata metenamina, las pruebas de inmunohistoquímica, la citometría de flujo, la microscopía confocal, la PCR y la PCR-RFLP^{1,2,4,7,12,14,19}.

El Comité de la *American Academy of Dermatology* en sus guías de onicomicosis, propone para el diagnóstico: el criterio clínico y las pruebas de laboratorio, en las cuales sugiere la prueba micológica (KOH y cultivo), el corte de lámina ungular para evaluación histopatológica y la biopsia de uña (cuando las pruebas anteriores han sido negativas)¹⁶.

El propósito de este estudio fue determinar la exactitud diagnóstica de la muestra de la lámina ungular en pacientes con diagnóstico clínico de onicomicosis.

Pacientes y métodos

Se llevó a cabo un estudio prospectivo de las características operativas de pruebas diagnósticas en 50 pacientes con lesiones clínicas sospechosas de onicomicosis,

que asistieron a la consulta de dermatología de la Clínica Universitaria Bolivariana y a un consultorio dermatológico de la Clínica SOMA. Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio. La investigación, considerada de riesgo mínimo, fue aceptada por el Instituto de Ética y Bioética de la Universidad Pontificia Bolivariana.

Ante la sospecha diagnóstica de onicomicosis, los pacientes se aplicaban ciprofloxacina tópica dos veces al día en la lámina afectada durante cinco días; tres días después de suspenderla, se tomaban las muestras de lámina ungular y detritos subungulares (FIGURA 1).

La toma de muestra de lámina ungular fue practicada por el mismo dermatólogo con un cortaúñas estéril en el área de onicolisis más proximal al lecho adherido; la mitad de esta lámina ungular se colocaba en frasco con formol al 10% para estudio histopatológico con tinciones de hematoxilina y eosina (HE) y ácido peryódico de Schiff (PAS) en el Laboratorio de Patología de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Pontificia Bolivariana; la otra mitad era remitida el mismo día y con el paciente, en tubo estéril al Laboratorio de Referencia de Micología Médica y Experimental de la Corporación para Investigaciones Biológicas para su procesamiento y toma de muestra de detritos.

En este laboratorio se practicaba raspado subungular de la uña afectada para obtener la muestra de detritos. Para ello, se procedió a hacer un raspado de toda la zona afectada del lecho ungular con una lanceta de punta roma, tratando de hacerlo tan profundamente como la lesión permitiera.

A ambas muestras (lámina y detritos) se les hacía la prueba micológica (examen directo [KOH] y cultivo). Primero, se hizo la siembra de los cultivos en forma sepa-

rada para cada muestra (detritos y pequeños fragmentos de la lámina ungular), utilizando para cada una de ellas tres cajas de Petri que contenían medio de cultivo para hongos: Sabouraud dextrosa agar (BBL), agar Mycosel (BBL) y agar papa dextrosa. Éstos se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente durante 20 días y se revisaron semanalmente para detectar el crecimiento de hongos. Cuando se observaron cultivos con presencia de colonias indicativas de algún agente fúngico, se procedió a la identificación morfológica, tanto macroscópica como microscópica, del microorganismo aislado para lograr la tipificación de género y especie.

Por otra parte, y después de la siembra de los cultivos, se hizo el examen con KOH individual para cada tipo de muestra (detritos y lámina); en el caso de los detritos, se depositó el resto de esta muestra sobre una lámina de vidrio (portaobjetos) al cual se le adicionó KOH al 10%; el espécimen fue calentado brevemente y cubierto con una laminilla de vidrio (cubre-objetos) para ser evaluado microscópicamente y detectar la presencia o ausencia de elementos fúngicos.

La biopsia se partió, con ayuda de un cortauñas estéril, en pequeños fragmentos los cuales se depositaron sobre una lámina de vidrio; se les adicionó KOH al 20%, se dejaron allí 20 minutos, aproximadamente, para su ablandamiento, y posteriormente, la preparación fue cubierta con una laminilla de vidrio para proceder a su observación, de la misma manera que se hizo con los detritos. La toma de la muestra, el procesamiento y la interpretación de la prueba micológica, de ambas muestras, fueron hechas en el laboratorio de referencia mencionado, por dos profesionales designadas para este estudio.

Para el procesamiento en el Laboratorio de Patología, una vez que la muestra de la lámina ungular hubiera estado en formalina al 10% durante dos horas, era procesada de la manera habitual mediante ablandamiento previo en hidróxido de potasio al 20% a 56 °C durante una hora; posteriormente, deshidratada en pasos sucesivos de alcohol etílico al 95% y de xilol, inclusión en parafina a 60°C y corte en micrótomos para obtener secciones histológicas de 4,0 µm de espesor. Las muestras de la lámina ungular para histopatología fueron interpretadas por el mismo patólogo, de manera ciega e independiente de la prueba micológica. Dichas muestras fueron evaluadas en dos oportunidades y cuando se presentó duda o inconsistencia diagnóstica, fueron interpretadas por un segundo patólogo.

El espécimen de la lámina ungular afectada se consideró la prueba en estudio y la prueba micológica (KOH-cultivo) de detritos subungulares como la prueba estándar; esto último se hacía teniendo en cuenta el criterio estándar para el diagnóstico de onicomicosis de acuerdo con lo aceptado en la práctica clínica: hallazgos semio-

| HONGO AISLADO | No. |
|------------------------------|-----------|
| Especies de <i>Candida</i> | 34 |
| <i>C. parapsilopsis</i> | 21 |
| <i>C. guilliermondi</i> | 6 |
| <i>C. tropicalis</i> | 4 |
| <i>C. albicans</i> | 3 |
| <i>S. dimidiatum</i> | 6 |
| <i>T. mentagrophytes</i> | 2 |
| <i>Fusarium</i> sp. | 1 |
| <i>T. rubrum</i> | 1 |
| Total hongos aislados | 44 |

CULTIVOS POSITIVOS: 32

TABLA 1. Aislamientos obtenidos en los cultivos positivos de muestra de detritos subungulares.

lógicos sugestivos, sumado a un resultado positivo en al menos una de las muestras de la prueba micológica (KOH o cultivo)⁶.

Para el procesamiento de la información se utilizaron los programas SPSS®, versión 15.0 (Chicago, Illinois), y EPIDAT, versión 3.1 (Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C.). La información se analizó mediante la estadística descriptiva (frecuencias absolutas y relativas) para las variables sociodemográficas, clínicas, microbiológicas y de patología. Para determinar la sensibilidad, especificidad, valores diagnósticos y cocientes de probabilidad de la muestra de lámina ungular, se crearon tablas de contingencia y los resultados se presentan con su respectivo intervalo de confianza del 95% (IC_{95%}).

Resultados

Se evaluaron 50 pacientes con lesiones ungulares sospechosas de onicomicosis mediante examen clínico, 86% de sexo femenino, y con edades comprendidas entre los 8 y los 78 años.

En 90% de los pacientes se observó compromiso de los pies, de los cuales 86,6% tenían afectación del primer dedo (39/45); sólo un paciente tenía compromiso de manos y pies. En casi todos los pacientes (98%) la lesión se encontró a nivel subungular distal; dos de ellos también tenían compromiso proximal.

La prueba micológica de detritos fue positiva en 80%, mientras que la de lámina ungular lo fue en 74% (prevalencia aparente).

En la muestra de detritos, se encontraron estructuras fúngicas al examen directo en 72% y se obtuvo aislamiento de hongos en el cultivo en 64%. En 32 muestras

| HONGO AISLADO | No. |
|------------------------------|-----------|
| Especies de <i>Candida</i> | 22 |
| <i>C. parapsilopsis</i> | 15 |
| <i>C. guilliermondi</i> | 4 |
| <i>C. albicans</i> | 2 |
| <i>C. tropicalis</i> | 1 |
| <i>S. dimidiatum</i> | 4 |
| <i>T. rubrum</i> | 2 |
| <i>T. mentagrophytes</i> | 1 |
| Total hongos aislados | 29 |

CULTIVOS POSITIVOS: 26**TABLA 2.** Aislamientos obtenidos en los cultivos positivos de muestra de lámina ungular

de detritos positivas al cultivo, se obtuvieron 44 agentes, con crecimientos de un único hongo en 21 muestras, dos hongos en 10 muestras y tres hongos en una muestra; la mayoría de los aislamientos fueron de especies de *Candida* (77,3%) (TABLA 1).

En el examen directo de la lámina ungular se encontraron estructuras fúngicas en 70%, con cultivo positivo en 52%. En las 26 muestras de lámina ungular positivas al cultivo, se aislaron 29 agentes, obteniéndose un crecimiento único en 88,5%. Al igual que en el cultivo de detritos, el aislamiento más frecuente fue de especies de *Candida* (75,9%) (TABLA 2).

No se tuvieron en cuenta como muestras positivas, los

aislamientos de hongos considerados contaminantes: uno de *Candida magnoliae*, dos de *Penicillium* spp., uno de *Thichosporum mucoides*, uno de *Thichosporum* spp. y dos de *Paecilomyces variotii*; o con especie no tipificable: dos de *Candida* spp.

En 15 muestras los aislamientos fueron exactamente concordantes en el cultivo de detritos y de lámina ungular. La exactitud diagnóstica de la lámina ungular fue de 86% (IC_{95%} 75,4-96,6). Las características operativas de la prueba en estudio se presentan en la TABLA 3.

En la evaluación histopatológica de la muestra de la lámina ungular, se identificaron estructuras fúngicas en cuatro (8%) de las muestras con HE y 29 (58%) de las teñidas con PAS. Cinco muestras positivas en la tinción con PAS fueron negativas en la prueba estándar. La exactitud diagnóstica de la histopatología con PAS fue 58% (IC_{95%} 43,3-72,7); las demás características operativas de esta prueba se presentan en la TABLA 4.

La sensibilidad neta mediante el análisis de pruebas en paralelo de lámina ungular (KOH + cultivo + PAS) aumentó a 95%.

Discusión

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.

A partir de la década de los noventa, se ha observado un incremento de mohos no dermatofitos y especies de *Candida* en onicomicosis, como se ha reportado en este

| Prueba en estudio (examen directo o cultivo de de la lámina ungular) | Prueba estándar (examen directo o cultivo de detritos subungulares) | | Total |
|---|---|----------|-------|
| | Positiva | Negativa | |
| Positiva | 35 | 2 | 37 |
| Negativa | 5 | 8 | 13 |
| Total | 40 | 10 | 50 |

Sensibilidad: 87,5 % (76-99)
Especificidad: 80 % (50,2-100)
Valor diagnóstico positivo: 94,6 % (86-100)
Valor diagnóstico negativo: 61,5% (31,2-91,8)
Cociente de probabilidades positivo: 4,4 (1,3-15,2)

TABLA 3. Sensibilidad, especificidad, valores predictivos y cociente de probabilidades de la prueba fúngica de la lámina ungular.

| Prueba en estudio (histopatología con PAS) | Prueba estándar (examen directo o cultivo de detritos subungulares) | | Total |
|---|---|----------|-------|
| | Positiva | Negativa | |
| Positiva | 24 | 5 | 29 |
| Negativa | 16 | 5 | 21 |
| Total | 40 | 10 | 50 |

Sensibilidad: 60 % (43,6-76,4)
Especificidad: 50 % (14-86)
Valor diagnóstico positivo: 82,8 % (67,3-98,2)
Valor diagnóstico negativo: 23,8 % (3,2-44,4)
Cociente de probabilidades positivo: 1,2 (0,6-2,3)

TABLA 4. Sensibilidad, especificidad, valores predictivos y cociente de probabilidades de la histopatología con PAS.

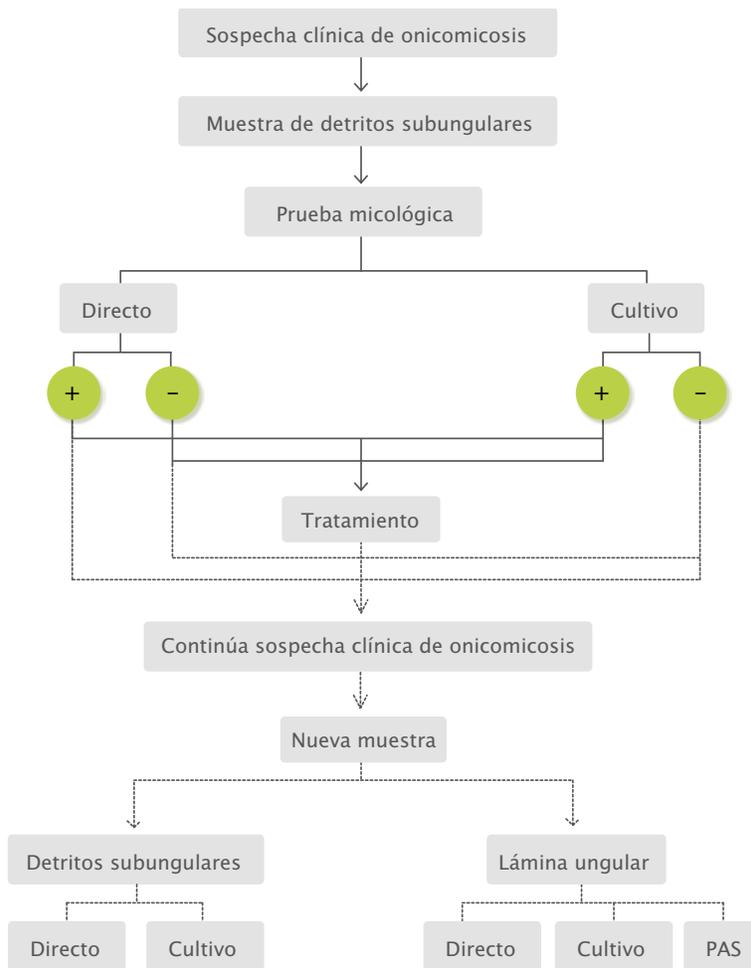


FIGURA 2. Propuesta de abordaje diagnóstico de la onicomicosis.

estudio. Aunque este hecho no tiene una interpretación clara, es posible que los tratamientos eficaces para dermatofitos, la inmunosupresión que confiere mayor sensibilidad a *Candida* y la ausencia de tratamientos adecuados para los mohos no dermatofitos, pudiesen explicar esta tendencia^{8,9}.

Para el laboratorio de referencia donde se realizó la prueba micológica de detritos, se tiene una sensibilidad estimada en 79%⁸; para la prueba micológica de la lámina ungular, en este estudio, la sensibilidad para la detección de hongos fue de 87,5%, superior a la reportada para la prueba estándar.

Esta gran capacidad de detección resalta la importancia de la remisión de estas muestras a laboratorios especializados, sin desconocer que la posibilidad de falsos negativos no es despreciable y que la mayor detección se logra con el examen directo, el cual fue positivo para este estudio, 72% en detritos y 70% en lámina ungular, en com-

paración con el cultivo, que fue de 64% en detritos y 52% en lámina ungular. Esta sensibilidad del KOH pudiera incrementarse, aún más, con el uso de dimetilsulfóxido, tinta china, negro de clorazol E o fluorocromo^{5,14,16,20}.

Teniendo en cuenta que el rendimiento diagnóstico de la muestra en estudio (lámina ungular) fue muy satisfactorio (86%), debe tenerse presente que al analizar de manera aislada el resultado del cultivo, en definitiva el método que demuestra el agente causal, sigue teniendo las mismas limitaciones que el cultivo de detritos².

La evaluación histopatológica con PAS es muy rápida y puede ser más específica al diferenciar entre invasión y mera colonización, con una sensibilidad reportada de 80,8 a 98,8%^{2,17,18,19,21}, muy superior a lo encontrado en este estudio (60%), lo que podría explicarse por dificultades técnicas ya identificadas en otros estudios, como el ablandamiento de la lámina requerido para lograr un buen corte²², la precipitación de la tinción y el hecho de

ser una técnica dependiente del observador. Es de anotar que, a pesar de la baja sensibilidad detectada en este estudio para el PAS, cinco muestras fueron positivas para hongos por este método que no fueron detectadas por la prueba estándar.

La inconsistencia en la sensibilidad de la prueba micológica y el tiempo que toma el resultado del cultivo, hacen que el PAS se proponga como una prueba complementaria^{4,6,16,17,20}; sin embargo, otros estudios sugieren incluso que pudiera ser el único método o prueba estándar en el diagnóstico de la onicomycosis^{6,7,17}.

Nuevas tecnologías propuestas para el diagnóstico de onicomycosis, conllevan altos costos y limitaciones como métodos de rutina en la práctica clínica^{1,2,4,7,12,14,19}.

De acuerdo con lo propuesto por las guías de la *American Academy of Dermatology* con respecto al diagnóstico de onicomycosis mediante el uso de pruebas múltiples¹⁶, los resultados de este estudio demuestran que la utilización de pruebas simultáneas en lámina ungular (KOH + cultivo + PAS) aumenta la sensibilidad a 95%.

La confirmación del diagnóstico clínico de onicomycosis implica la persistencia en la búsqueda del agente causal, lo cual pudiera lograrse mediante múltiples pruebas que, si bien es cierto aumentan los costos, podrían practicarse con un abordaje racional, propuesto por los autores, mediante el uso de pruebas seriadas (FIGURA 2).

La dificultad del diagnóstico de la onicomycosis mediante las pruebas de laboratorio convencionales, conlleva una gran frustración no sólo para el paciente sino para el dermatólogo. Con los resultados de este estudio, se propone la muestra de lámina ungular, para prueba micológica y tinción PAS, como complemento a la muestra de detritos subungulares, para el diagnóstico de la onicomycosis. Esto permitiría un mayor acercamiento diagnóstico, incrementando la sensibilidad para la detección del hongo y una mejor decisión terapéutica.

Agradecimientos

Los autores expresan sinceros agradecimientos a la doctora Ángela Restrepo Moreno, por sus valiosos aportes para el análisis de los resultados.

Referencias

- Hay R. Onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19(Suppl.1):1-7.
- Aberhasky RC. Laboratory diagnosis of onychomycosis. *Clin Podiatr Med Surg*. 2004;21:565-78.
- Scher RK, Tavakkol A, Bact D, Sigurgeirsson B, Hay RJ, Joseph WS, et al. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:939-44.
- Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of the onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49:193-7.
- Elewski BE. Clinical pearl: Diagnosis of onychomycosis. *J Am Acad*. 1995;32:500-1.
- Lawry MA, Haneke E, Strobeck K, Martin S, Zummer B, Romano PS. Methods for diagnosing onychomycosis: A comparative study and review of the literature. *Arch Dermatol*. 2000;136:1112-6.
- Borkowsky P, Williams M, Holeywinsky J, Bakotic B. Onychomycosis: An analysis of 50 cases and comparison of diagnostic techniques. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2001;7:351-5.
- Zuluaga A, de Bedout C, Tabares A, Cano LE, Restrepo A, Arango M, et al. Comportamiento de los agentes etiológicos de las onicomycosis en un laboratorio de micología de referencia (Medellín 1994-2003). *Med Cutan Iber Lat Am*. 2005;33:251-6.
- Escobar ML, Carmona-Fonseca J. Onychomycosis by common non-dermatophyte moulds. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:6-10.
- Gupta A, Cooper E. Onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 2009;117:2424.
- Ellis DH. Diagnosis of onychomycosis made simple. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40:S3-8.
- Piérard GE, Arrese JE, De Doncker P, Piérard-Franchimonto C. Present and potential diagnosis techniques in onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 1996;34:273-7.
- De Berker D. Fungal nail disease. *N Engl J Med*. 2009;360:2108-16.
- De Chauvin MF. New diagnostic techniques. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19(Suppl.1):20-4.
- Elewski BE. Diagnostic techniques for confirming onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 1996;35:S6-9.
- Drake LA, Dinehart SM, Farmer ER, Goltz RW, Graham G, Hordinsky MK, et al. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: Onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 1996;34:116-21.
- Chang A, Wharton J, Tam S, Kovich O, Kamino H. A modified approach to the histologic diagnosis of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57:849-53.
- Reisberger EM, Ables C, Landthaler M, Szlimics RM. Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid-Schiff-stained nail clipping. *Br J Dermatol*. 2003;148:749-54.
- 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;202:283-8.
- Lilly KK, Koshnick RL, Grill JP, Khalil ZM, Nelson DB, Warshaw EM. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: A repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55:620-6.
- 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.
- Suárez SM, Silvers DN, Scher RK, Pearlstein HH, Auerbach R. Histologic evaluation of nail clippings for diagnosing onychomycosis. *Arch Dermatol*. 1991;127:1517-9.