

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO FIN DE GRADO EN PODOLOGÍA



**Título del Trabajo Fin de Grado. DIAGNÓSTICO ONICOMICOSIS Y FACTORES DE RIESGO
EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS**

AUTOR: Ibáñez Fernández, Tania

Nº expediente. 317

TUTOR. Consuelo Ferrer Rodríguez

COTUTOR. Esther Chicharro Luna – M^a Francisca Colom Valiente

Departamento y Área. Producción Vegetal y Microbiología – Psicología de la Salud

Curso académico 2015 - 2016

Convocatoria de Junio

ABREVIATURAS

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ITB: Índice Tobillo Brazo.

KOH: Hidróxido de Potasio.

DMSO: Dimetil Sulfoxido.

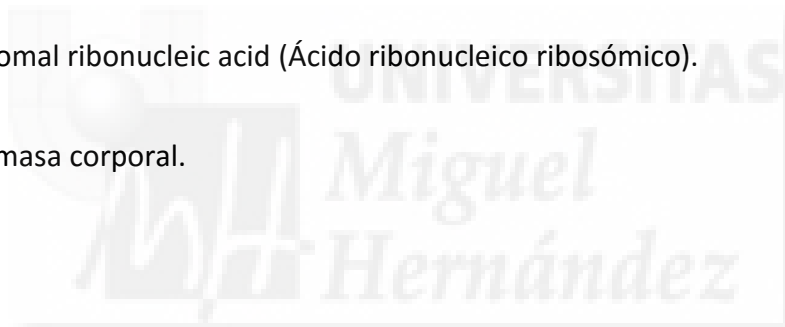
SDA: Sabouraud Dextrose Agar.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ITS: Internal transcribed spacer.

rRNA: Ribosomal ribonucleic acid (Ácido ribonucleico ribosómico).

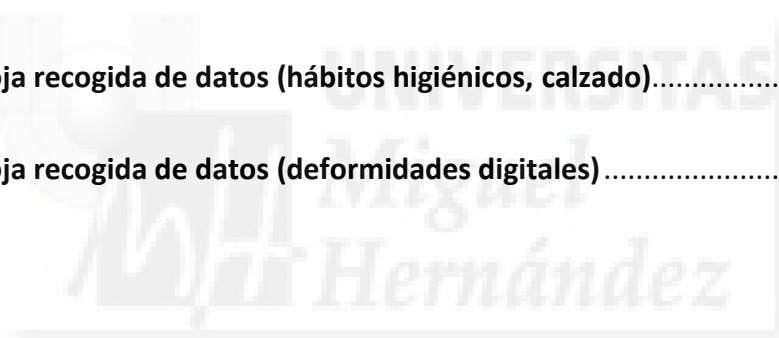
IMC: Índice masa corporal.



ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS	12
Objetivos generales:	12
Objetivos específicos:	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
Recogida de muestras:.....	14
Procesamiento de las muestras:.....	15
Análisis estadístico	17
RESULTADOS	18
Diagnóstico por visualización directa:.....	22
Diagnóstico por cultivo:	23
Diagnóstico por PCR:.....	25
Diagnóstico micológico:	26
Comparación examen directo, cultivo y PCR:	28
Diagnóstico micológico y el calzado	28
Diagnóstico micológico, medidas higiénicas y tipo de secado	29
Diagnóstico micológico y deformidades digitales del 1º dedo	29

Diagnóstico micológico e Índice Tobillo Brazo.....	30
DISCUSIÓN.....	31
Diagnóstico microbiológico y biología molecular	31
Diagnóstico micológico y características de los pacientes	34
CONCLUSIONES	36
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXO 1: Hoja recogida de datos (datos personales, enfermedades de interés, etc.)	41
ANEXO 2: Hoja recogida de datos (hábitos higiénicos, calzado).....	42
ANEXO 3: Hoja recogida de datos (deformidades digitales)	43



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Enfermedades de interés.....	18
Tabla 2: Sospecha dermatomicosis.....	19
Tabla 3: Características del calzado.....	20
Tabla 4: Resultados ITB.....	21
Tabla 5: Resultados PCR y diagnóstico micológico.....	22
Tabla 6. Resultados del examen directo, cultivo, PCR y diagnóstico micológico.....	27
Tabla 7: Diagnóstico micológico y características del calzado.....	28
Tabla 8: Diagnóstico micológico, tipo de lavado y secado.....	29
Tabla 9: Diagnóstico micológico y deformidades digitales.....	30
Tabla: Diagnóstico micológico e ITB.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Lámina ungueal y calzado.....	20
Figura 2: Lámina ungueal y calzado.....	21
Figura 3: Visualización directa con KOH.....	22
Figura 4: Visualización directa con blanco de Calcofluor.....	23
Figura 5: Crecimiento fúngico en medio SDA.....	24
Figura 6: Microcultivo.....	24
Figura 7: Visualización directa microcultivo.....	25
Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa.....	26
Figura 9: <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	33
Figura 10: <i>Aspergillus sydowii</i>	34

RESUMEN

Introducción. La onicomicosis, es una infección micótica de las uñas causada por dermatofitos, levaduras o mohos no dermatofitos. Es un problema común entre pacientes diabéticos, se estima que un tercio de todos los diabéticos tienen onicomicosis, frente al aproximadamente 10% de la población total. El diagnóstico se basa en la detección de elementos fúngicos por visualización directa de muestras clínicas, cultivo in vitro y biología molecular, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Objetivo. Determinar si la onicomicosis en pacientes diabéticos mayores de 65 años tiene relación con diferentes aspectos clínicos. Comparar métodos de microbiología y biología molecular para el diagnóstico micológico.

Métodos. Se realiza un estudio retrospectivo en pacientes diabéticos mayores de 65 años con sospecha de onicomicosis. Las 50 muestras de los 23 pacientes se sometieron a examen microscópico, cultivo y PCR. Se realizó un análisis estadístico de la clínica del paciente y de los resultados de las pruebas diagnósticas.

Resultados. En el 34.8% (n=8) de los pacientes, el diagnóstico de onicomicosis fue positivo en uno o ambos pies. De las 50 muestras, el 6.0% (n=3) fueron positivas por microscopía, el 6.0% (n=3) por cultivo, y 16.0% (n=8) por PCR. Estos resultados, se relacionaron con factores de riesgo de onicomicosis, siendo casi en su totalidad, no estadísticamente significativos.

Conclusión. No se encontró relación estadísticamente significativa entre el desarrollo de onicomicosis y ninguno de los aspectos clínicos y podológicos considerados en el

estudio. El método diagnóstico más sensible y específico fue la amplificación de secuencias ITS por PCR.

Palabras clave. Onicomycosis, diabetes, microscopía, cultivo, PCR, factores de riesgo.

ABSTRACT

Introduction. Onychomycosis is a fungal infection of the nail caused by dermatophytes, yeasts, or non-dermatophyte molds. It is a common problem in diabetic patients. It is estimated that one of the third of diabetics has onychomycosis, compared with about 10% of the population. The diagnosis is based on detection of fungal elements by direct visualization of clinical samples, in vitro culture and molecular biology, based on the polymerase reaction (PCR).

Objective. Determine whether onychomycosis in diabetic patients over 65 years is related to different clinical aspects. Compare methods of microbiology and molecular biology for mycological diagnosis.

Methods. A retrospective study was performed in diabetic patients over 65 years with suspected onychomycosis. The 50 samples of 23 patients were subjected to microscopic examination, culture and PCR. A statistical analysis of the patient's clinical and the results of diagnostic tests were performed.

Results. In 34.8% (n = 8) patients, the diagnosis of onychomycosis was positive in one or both feet. Of the 50 samples, 6.0% (n = 3) were positive by microscopy, 6.0% (n = 3) culture, and 16.0% (n = 8) by PCR. These results were related to risk factors for onychomycosis, so they are not statistically significant.

Conclusion. It is important to realize a complete mycological diagnosis (microscopy, culture and PCR) in patients with suspected onychomycosis. It exposed the importance of further studies to demonstrate the relationship between onychomycosis with risk factors exposed.

Keywords. Onychomycosis, diabetes, microscopy, culture, PCR, risk factors.



INTRODUCCIÓN

La onicomycosis es una infección micótica de las uñas causada por dermatofitos, levaduras o mohos no dermatofitos^{1,2}. La incidencia de la onicomycosis afecta aproximadamente al 10% de la población general, el 20% de las personas mayores de 60 años, y el 50% de los mayores de 70 años³. La prevalencia media en Europa y América del Norte es del 4,3%⁴. El aumento de la prevalencia en los últimos años se atribuye a una mayor longevidad, comorbilidades como la diabetes, participación en deportes, y aparición del VIH⁵. Aproximadamente, el 33% - 34% de los pacientes con diabetes mellitus padecen onicomycosis^{6,7}. En Europa, el *Trichophyton rubrum* es el principal agente etiológico de la onicomycosis, seguido de *T. mentagrophytes* y *T. interdigitale*^{2,5,8,9}.

Si el diagnóstico únicamente se basara en signos clínicos, alrededor del 50% de los pacientes serían mal diagnosticados, por lo que se debe confirmar o descartar la infección micótica con procedimientos de laboratorio¹⁰. El diagnóstico de este proceso infeccioso mediante técnicas convencionales de micología, se basa en la detección de elementos fúngicos por microscopía de las muestras y por cultivo en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) u otros medios^{2,5,7,11}. Es necesario, que la recogida de muestras sea adecuada para un correcto diagnóstico⁵. La visualización directa de uñas es a menudo suficiente para el diagnóstico de onicomycosis^{7,8}. Esta técnica sirve como prueba de cribado para detectar presencia o ausencia de hongos^{1,2,10,11}. Para un diagnóstico completo es necesario realizar cultivos y así, identificar la especie fúngica mediante un examen morfológico macroscópico y microscópico. El cultivo de hongos es un proceso lento, hasta 4 semanas de duración y a menudo el fracaso del crecimiento fúngico genera falsos negativos (40% de los casos que fueron positivos por microscopía)^{1,2,8,10}.

Otra posibilidad para la detección es mediante técnicas de biología molecular con amplificación y secuenciación de las regiones barcode de los genes ribosómicos (rDNA) y sus espaciadores (ITS1-2). Esta metodología, basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite el diagnóstico temprano y específico de onicomicosis y agentes causantes^{2,8,10}.

En este estudio, se evalúa la presencia de onicomicosis en muestras de uñas de pacientes con diabetes mellitus mayores de 65 años por métodos diagnósticos convencionales (cultivo y microscopía) y mediante PCR con el fin de relacionarlos con diferentes factores podológicos (tipo de calzado, hábito de caminar, hábitos higiénicos, etc).



OBJETIVOS

Objetivos generales:

- Comparar métodos de microbiología y biología molecular para el diagnóstico de onicomicosis.
- Conocer incidencia y agente causal más frecuente de onicomicosis en pacientes diabéticos mayores de 65 años.
- Determinar si existe relación entre la onicomicosis en pacientes mayores de 65 años con diabetes mellitus y diferentes aspectos clínicos.

Objetivos específicos:

- Comprobar si existe relación entre las micosis ungueales y tipo de calzado.
- Evidenciar si la presencia de alteraciones vasculares produce mayor riesgo de onicomicosis.
- Observar la relación entre hábitos higiénicos y existencia de hongos.
- Definir la asociación entre deformidades digitales y presencia de micosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo de muestras de uñas, se recogieron entre Noviembre de 2011 a Mayo de 2012 en el centro Isla de Cuba en Alicante. En el estudio se incluyeron un total de 50 muestras de uñas de 23 pacientes.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Paciente mayor de 65 años.
- Paciente diagnosticado de diabetes mellitus.
- Paciente con sospecha de micosis ungueal.
- Paciente que no haya estado en tratamiento antifúngico previo.
- No presentar ninguna enfermedad dermatológica con afectación ungueal como psoriasis, liquen plano, etc.
- Paciente que haya firmado el consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Pacientes que no cumplieran los criterios de inclusión.
- Pacientes que sufrieran un traumatismo en la uña en los últimos 3 meses.

A todos los pacientes se les realizó una anamnesis en el que se preguntaban antecedentes familiares, enfermedades de interés, hábitos tabáquicos, tratamientos farmacológicos, actividad física, etc. Se valoró la presencia de tinea pedis mediante la existencia de descamación, fisuras y prurito. (Anexo 1).

Se preguntó al paciente, a través de la anamnesis, sobre hábitos higiénicos (limpieza, corte, secado y protección de los pies). (Anexo 2). Se analizó el calzado con el que el

paciente acudió a consulta valorando varias características (cierre, material del corte, punta y tipo de calzado) teniendo en cuenta los días y meses de utilización del mismo.

Se llevó a cabo una exploración física del paciente determinando el Índice Tobillo Brazo (ITB) con un tensiómetro automático específico para este tipo de índice (WatchBP office ABI®). Se valoraron las deformidades digitales de ambos pies, clasificando el hallux abductus valgus mediante la escala visual de Manchester; el resto de deformidades digitales (garra, martillo, mazo, supraductus, suprabductus, infraductus, infrabductus y varo) se diagnosticaron de manera visual, estableciéndolos como leve, moderado o severo según el grado de flexibilidad y presencia de lesiones dérmicas. (Anexo 3).

El almacenaje de las muestras después de su recogida se realizó en placas de Petri secas y estériles a temperatura ambiente.

Recogida de muestras:

Se obtuvieron muestras de uñas que presentaran al menos dos signos clínicos de micosis (onicolisis, onicogriphosis, cambio de coloración, hiperqueratosis subungueal, etc.), se descartó obtener muestra de los 5º dedos porque muchos presentan engrosamiento ungueal por el roce con el calzado. Las muestras se recogieron en placas de Petri estériles individuales para cada uña identificadas por un número, seguido del número del dedo y la letra "D" o "I" si era el pie derecho o el pie izquierdo respectivamente. Para la obtención del material, se utilizaron guantes desechables, micromotor y material estéril (alicate, mango de bisturí, gubia intercambiable, gubia fija y fresa de tungsteno). Previo a la recogida de la muestra, se lavó la uña y zona periungueal con una esponja de clorhexidiana desechable y suero fisiológico. Posteriormente, se aplicó alcohol sobre la

zona y se dejó secar, finalmente se recogió el material afecto. La muestra se obtuvo de la zona afectada más cercana a la zona sana descartando el material menos viable. Se recogieron muestras de uña, detritus y/ o polvo en función del tipo de hongo.

Procesamiento de las muestras:

Las muestras de cada paciente se dividieron en tres partes para la realización de tres exámenes: visualización directa al microscopio, cultivo y detección de ADN fúngico mediante PCR. La preparación para la visualización directa se realizó según el método que muestra la guía práctica consultada. Se realizó con Hidróxido Potásico 20% (KOH), al que se le añadió 40 ml DMSO y 60 ml de agua destilada, también se observaron las muestras con unas gotas de blanco de calcoflúor en el caso de la visualización con microscopio de fluorescencia¹². En ambos casos, aumentos de 200 y 400X. En paralelo, las muestras de uñas se cultivaron en placas de medio SDA para facilitar el crecimiento de hongos y levaduras. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (alrededor de 25°C) durante 4 semanas en condiciones de humedad controlada. Todas las cepas fúngicas fueron identificadas mediante estudio morfológico macroscópico y microscópico. El estudio de la morfología macroscópica se realizó mediante examen directo del crecimiento del hongo en la placa del medio SDA, y para el estudio de morfología microscópica se realizaron microcultivos de los hongos, en fragmentos de aproximadamente 1.5x1.5 cm del mismo medio de cultivo sólido. Después del crecimiento de los mismos, se procedió a su visualización directa mediante tinción con azul de lactofenol al microscopio (objetivo 200 y 400X). La clasificación microscópica de los cultivos se efectuó siguiendo las guías de identificación en la bibliografía^{13,14}.

Una tercera parte de las muestras de uñas se almacenaron en tubos Eppendorf para la detección e identificación de especies fúngicas mediante la amplificación de la región ITS – gen 5.8S rRNA. La extracción del ADN de las muestras de uñas, se realizó con el Kit Instagene (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante con una única modificación, tras añadir 100-300 µL de Instagene (según cantidad de uña), se incubaban a 55º durante 60 minutos en lugar de 15 minutos. La extracción del ADN de las muestras de hongos procedente de cultivos, se realizó con un método de alta calidad. Se efectuó con el Kit E.Z.N.A® Yeast DNA Kit (Omega bio – tek) siguiendo las instrucciones del fabricante. En esta técnica, se utilizan una serie de buffers, enzimas y reactivos con la finalidad de eliminar las paredes celulares de los hongos, proteínas y diferentes estructuras celulares con el fin de aislar y purificar las moléculas de ADN.

Una vez extraído el ADN, se realizó amplificación de la región 5.8S –ITS del genoma fúngico mediante el uso de los primers ITS1 e ITS4. ITS1 que hibrida con la región 3' gen del 18S rRNA (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') y un segundo primer ITS 4 que hibrida con la región 5' del gen del 28S rRNA (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'). La PCR se realizó en un volumen total de 25 µL, que contenía 20 µL Mix (2.5 ml of PCR buffer con 1.5mM MgCl₂; 200 mM de cada nucleótido trifosfato, 25 pmol de cada primer y 0.5U de Taq DNA polimerasa) y 5 µL de ADN extraído de la muestra. La amplificación del ADN se determinó utilizando un termociclador BioRad iCycler con el siguiente programa: un ciclo inicial durante 5 minutos a 95 °C y 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 60 segundos a 55 °C, 60 segundos a 72º C y un último ciclo de 6 minutos a 72ºC.

La amplificación se realizó en 5 series de 10 muestras incluyendo en cada serie un control positivo (DNA de *Candida parasilopsis*) y un control negativo (agua).

Tras la amplificación, los fragmentos fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5%. Tras electroforesis de 20 minutos a 120 miliamperios. El fragmento esperado oscila entre 500-850 pb.

Las muestras positivas fueron enviadas al Centro Inmunológico de Alicante para su identificación mediante secuenciación Sanger realizada con el primer ITS4 y posterior comparación con la base de datos GenBank mediante el programa de alineamiento BLAST (National Institutes of Health).

Análisis estadístico

Los datos recogidos fueron codificados para su tratamiento estadístico, tabulados y mecanizados informáticamente, analizándolos mediante el paquete de programas informáticos SPSS para Windows, versión 17. Se realizó análisis descriptivo y se calcularon proporciones para variables cualitativas y medidas de tendencia central y dispersión para cuantitativas. En el análisis bivalente para variables cualitativas se realizaron tablas de contingencia para el cálculo de Chi Cuadrado.

RESULTADOS

Del total de la muestra estudiada, un 43.5% fueron hombres (n=10) y un 56.5% (n=13) mujeres.

El 95.0% (n=19) refieren no tener antecedentes familiares de onicomycosis, en tres de los pacientes se desconoce los antecedentes familiares. Un 54.5% (n= 12) vive solo, el 36.4% (n=9) vive con su pareja, un 4.5 (n=1) vive con su pareja e hijo y un 4.5 (n=1) vive con su descendiente, se desconocía la situación de un paciente.

Sobre la duración de la diabetes, un 53.9% (n=7) estaba diagnosticado de diabetes mellitus menos de 10 años, un 30.8% (n=4) presentaban la enfermedad de 10 a 20 años y un 15.4% (n=2) más de 20 años. Diez pacientes no supieron indicar los años de evolución de su enfermedad.

Las enfermedades de interés fueron múltiples, como se observa en la tabla 1.

ENFERMEDADES	N	%
Hipercolesterolemia	12	52.2%
Hipertensión	19	82.6%
Problemas coronarios	3	13.0%
Enfermedad vascular periférica	1	4.3%
Problemas respiratorios	1	4.3%
Insuficiencia renal	2	8.7%
Insuficiencia venosa	1	4.3%
Enfermedades endocrinas (tiroides)	1	4.3%
Neurológico (depresión/ ansiedad/ alzhéimer)	3	13.0%
Problemas musculares (artrosis, osteoporosis)	4	17.3%
Problemas digestivos	1	4.3%

Tabla 1. Enfermedades de interés.

Respecto a la cantidad de fármacos que tomaban los pacientes, el 63.6% (n=14) tomaba menos de 5 fármacos al día y el 36.3% (n=8) tomaban 5 o más fármacos diarios. En un paciente se desconocía los fármacos tomados.

La tabla 2 muestra a los pacientes con sospecha de dermatomicosis. (Presencia de descamación interdigital, fisuras y/ o prurito). Se clasifica a los pacientes como sospecha de dermatomicosis con un único signo clínico.

	Pie derecho		Pie izquierdo	
	n	%	n	%
Descamación interdigital	6	26.1%	6	26.1%
Fisuras interdigitales	1	4.3%	1	4.3%
Prurito	1	4.3%	1	4.3%
Sólo descamación interdigital	4	17.4%	4	17.4%
Descamación y fisuras interdigitales	1	4.3%	1	4.3%
Descamación interdigital y prurito	1	4.3%	1	4.3%

Tabla 2. Existencia de descamación, fisuras interdigitales y/o prurito. Sospecha dermatomicosis.

Respecto al hábito tabáquico, un 60.9 % (n=14) nunca habían fumado, un 34.8% (n=8) eran exfumadores y el 4.3% (n=1) fumaba de forma activa en el momento del estudio.

El 20.0% (n=3) de los pacientes tenían normopeso, el 46.7% (n=7) sobrepeso y el 33.4% (n=5) obesidad. En los ocho pacientes restantes, no se conocía la talla o el peso, por lo que no se pudo calcular el IMC.

De los 23 pacientes incluidos en el estudio, el 91.3% (n=21) andaba diariamente y el 8.7% (n=2) no caminaba a diario. El 13.0% (n=3) practicaba gimnasia dos veces por semana. El baile lo practicaba el 4.3% (n=1) y la natación el 4.3% (n=1) del total de pacientes.

Referente al calzado, se analizó el tipo de material, el cierre utilizado y la punta del calzado. Las características del calzado con el que el paciente acudió a consulta se muestran en la tabla 3. En la figura 1 y 2 se observa la uña y el calzado con el que el paciente acudió a consulta.

		N	%
Material del calzado	Piel	12	52.2%
	Otros materiales (<i>piel sintética, plástico – goma o tejido</i>)	11	47.8%
Cierre calzado	Sin cierre	8	34.8%
	Cierre (<i>cordones, hebilla, elástico – gomas o cremallera</i>)	15	65.1%
Punta del calzado	Punta (<i>circular, redonda u ovalada</i>)	17	73.8%
	Punta cuadrada	6	26.1%

Tabla 3. Características del calzado.



Figura 1. Paciente 177, uña 1º dedo pie derecho y calzado con el que acudió a consulta.



Figura 2. Paciente 107, uña 1º dedo pie derecho y calzado con el que acudió a consulta

Los resultados obtenidos en el Índice Tobillo Brazo (ITB) se observan en la tabla 4, incluye incidencia de la oclusión, calcificación o ambas.

	N	%
Normal	10	43.5%
Sólo oclusión	6	26.1%
Oclusión y calcificación	1	4.3%
Sólo calcificación	6	26.1%

Tabla 4. Resultados ITB.

Los hábitos higiénicos se valoraron en cuanto al tipo de lavado, el 50.0% (n=11) se lavaban los pies en la ducha y el otro 50.0% (n=11) se lavaban los pies en la ducha y de manera independiente. El 63.5% (n=14) se secaba la zona interdigital y un 36.3% (n=8) el secado no lo hacía en esa zona.

Las deformidades del 1º dedo que se valoraron fueron el hallux abductus valgus, hallux extensus, hallux flexus, suprabductus e infraductus. La frecuencia de éstas, se muestran en la tabla 5.

	1º dedo pie derecho		1º dedo pie izquierdo	
	N	%	n	%
No deformidad	3	13.0%	3	13%
Una deformidad	19	82.6%	17	73.9%
Dos deformidades	1	4.3%	3	13.0%

Tabla 5. Deformidades digitales en el 1º dedo del pie derecho e izquierdo.

Diagnóstico por visualización directa:

De las 50 muestras de los 23 pacientes observadas con KOH y blanco de calcoflúor el 6.0% (n=3) fueron positivas (figura 3 y 4), el 58.0% (n=29) negativas y el 36.0% (n=18) dudosas.



Figura 3. Visualización directa (objetivo 200X) con KOH de la muestra 107, 1º uña pie derecho.

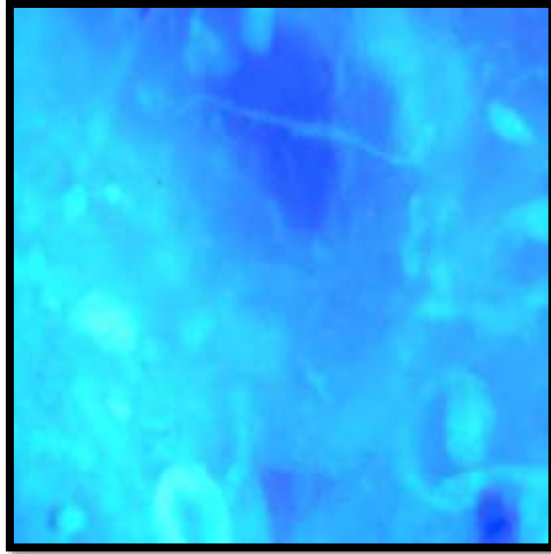


Figura 4. Visualización directa mediante blanco de Calcofluor (objetivo 200X) de la muestra 177, 1º uña pie izquierdo.

Diagnóstico por cultivo:

El 6.0% (n=3) de los cultivos fueron positivos y el 94% (n=47) negativo.

Estudio macromorfológico de los cultivos: característicamente presentaron micelio de color marrón, negros o blancos con aspecto aterciopelado, formando pliegues y difundiendo el pigmento al exterior, su tamaño varía de 1 a 3 cm de diámetro (figura 5).

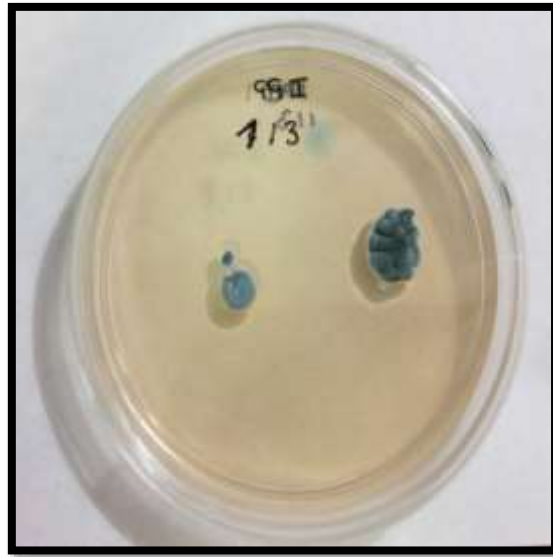


Figura 5. Crecimiento fúngico en el medio SDA de la muestra 199, 1º uña pie izquierdo.

El análisis microscópico realizado en los microcultivos (figura 6) de las 5 muestras que fueron positivas, mostró los anélicos formando un penicilio simple o ramificado sosteniendo la cadena de conidias grandes, y redondeadas. Los conidióforos fueron cortos y ramificados (figura 7). La identificación basándose en la micromorfología dio como resultado *Scopulariopsis sp.* Aunque en algunos casos la morfología microscópica fue confusa, recordando a *Aspergillus sp.*

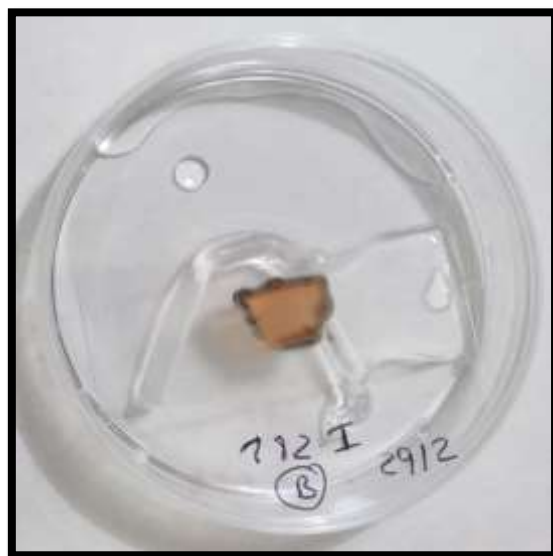


Figura 6. Microcultivo de la muestra 182 B, 1º uña pie izquierdo.

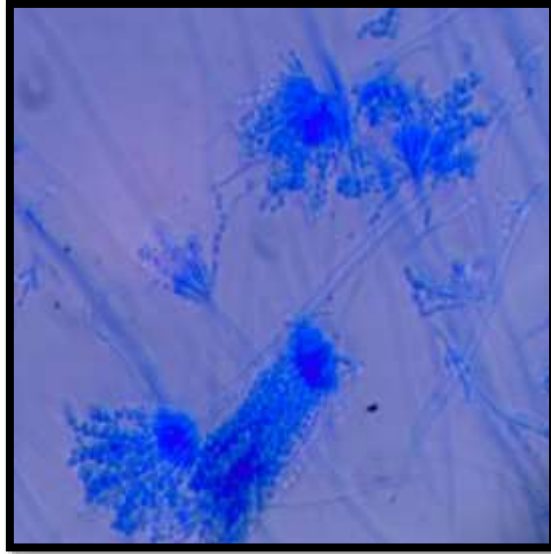


Figura 7. Microscopía (objetivo 400X) del microcultivo 182 A, 1º uña pie izquierdo.

Diagnóstico por PCR:

De las 50 muestras de uñas, el 16% fueron positivas por PCR (n=8). La figura 8 muestra un gel de agarosa con los amplificados obtenidos en 10 muestras. La identificación de las secuencias ITS-5.8 rDNA mediante secuenciación y comparación con la base de datos, dio como resultado *Aspergillus sidowii* en el 87.5% (n=7) y *Trichophyton interdigitale* en el 12.5% (n=1).

Ante la no concordancia de resultados entre la identificación por microbiología clásica (cultivo) y biología molecular (PCR) se realizó la amplificación y secuenciación de los cultivos crecidos, obteniéndose *Aspergillus sidowii* como causante de la onicomicosis.

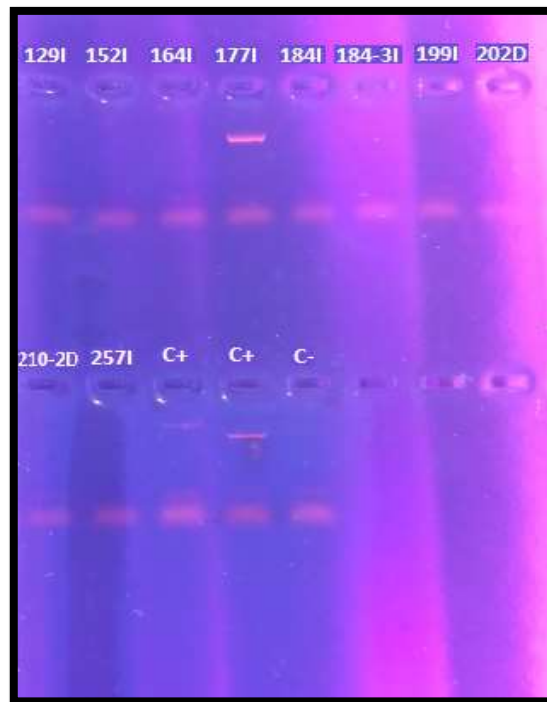


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los amplificados obtenidos en 10 de las muestras. El carril 4 (muestra 177, 1º uña del pie izquierdo) aparece la banda de aproximadamente 600 pb correspondiente a la amplificación esperado. Los carriles 11 y 12 son controles positivos (*Candida parapsilopsis* y *Candida albicans*). El carril 13 corresponde al control negativo.

Diagnóstico micológico:

El 20.0% (n=10) de las muestras fueron positivas y, el 26.1% (n=6) de los pacientes el diagnóstico fue positivo en un pie y el 8.7% (n=2) positivo en ambos. En cambio, en el 80.0% (n=40) de las muestras y en el 65.2% (n=15) de los pacientes el diagnóstico de micosis ungueal fue negativo. El agente causal fue *Aspergillus sidowii* en el 90% (n=9) y *Trichophyton interdigitale* en el 10% (n=1) de las 10 muestras positivas.

En la tabla 6, se observan los resultados de todas las pruebas diagnósticas utilizadas para cada muestra de los distintos pacientes sometidos a estudio.

P	MUESTRA	MICROSCOPIA	CULTIVO	IDENTIFIC. CULTIVO	PCR	IDENTIFIC. PCR	DIAGNÓSTICO
67	1º uña PD	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
79	1º uña PD	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
83	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
85	1º uña PD	Dudoso	Negativo		Positivo	<i>Aspergillus sydowii</i>	Positivo
	1º uña PI	Dudoso	Negativo		Positivo	<i>Aspergillus sydowii</i>	Positivo
87	1º uña PD	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Dudoso	Positivo	<i>Scopulariopsis sp</i>	Positivo	<i>Aspergillus sydowii</i>	Positivo
107	1º uña PD	Negativo	Negativo		Positivo	<i>Aspergillus sydowii</i>	Positivo
	1º uña PI	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
129	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	2º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
143	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	3º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
152	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	2º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	3º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
163	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
164	1º uña PD	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
177	1º uña PI	Dudoso	Negativo		Positivo	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Positivo
182	1º uña PI	Positivo	Positivo	<i>Scopulariopsis sp</i>	Positivo	<i>Aspergillus sydowii</i>	Positivo
184	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Positivo	Negativo		Negativo		Positivo
	3º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	4º uña PD	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
	4º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
185	1º uña PD	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
197	1º uña PD	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
199	1º uña PD	Negativo	Negativo		Positivo	<i>Aspergillus sydowii</i>	Positivo
	1º uña PI	Positivo	Positivo	<i>Scopulariopsis sp</i>	Negativo		Positivo
	2º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	2º uña PI	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
	3º uña PD	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
202	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Negativo	Negativo		Positivo	<i>Aspergillus sydowii</i>	Positivo
	2º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
210	2º uña PD	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
	2º uña PI	Dudoso	Negativo		Negativo		Negativo
215	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
222	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
250	1º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
257	1º uña PD	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo
	1º uña PI	Negativo	Negativo		Negativo		Negativo

Tabla 6. Resultados del examen directo, cultivo, PCR y diagnóstico micológico. PD: pie derecho; PI: pie izquierdo.

Comparación examen directo, cultivo y PCR:

Un total del 33.3% (n=1) de las muestras fueron positivas por microscopía y negativas por cultivo y PCR. En la muestra que era positiva en examen directo y negativa en cultivo y PCR no se pudo establecer la identificación del género o especie.

Un 16.0% (n=8) de las muestras fueron positivas por PCR y sólo el 25% (n=2) de ellas fueron positivas por diagnósticos de cultivo y/o visualización directa. De las 46 muestras negativas por examen directo y cultivo, el 13.3% (n=6) fueron positivas por PCR.

Diagnóstico micológico y el calzado

Después de analizar los diagnósticos micológicos en correlación a las características del calzado (tabla 7), se concluye que el tipo de material del calzado no es estadísticamente significativo con la presencia de hongos (p-valor: 0.304), al igual que el tipo de cierre (p-valor: 0.263) y de punta (p-valor: 0.278).

		Diagnóstico Positivo		Diagnóstico negativo	
		n	%	N	%
Material del calzado	Piel	3	25.0%	9	75.0%
	Otros materiales (<i>piel sintética, plástico – goma o tejido</i>)	5	45.5%	6	54.5%
Cierre calzado	Sin cierre	4	50.0%	4	50.0%
	Cierre (<i>cordones, hebilla, elástico – gomas o cremallera</i>)	4	26.7%	11	73.3%
Punta del calzado	Punta (<i>circular, redonda u ovalada</i>)	7	41.2%	10	58.8%
	Punta cuadrada	1	16.7%	5	83.3%

Tabla 7. Resultado del diagnóstico micológico de los pacientes, en relación a las características del calzado.

Diagnóstico micológico, medidas higiénicas y tipo de secado

Resultados del diagnóstico micológico de los pacientes en relación al tipo de lavado y secado de los pies se muestran en la tabla 8. En nuestro estudio hemos observado que lavarse los pies de manera independiente no es estadísticamente significativo con la presencia de hongos (p-valor: 0.375) al igual que un mejor secado interdigital (p-valor: 0.141).

		Diagnóstico positivo		Diagnóstico negativo	
		n	%	N	%
Tipo de lavado	Lavado independiente de los pies	5	45.5%	6	54.5%
	Lavado de los pies en la ducha (no independiente)	3	27.3%	8	72.7%
Tipo de secado	Secado interdigital	6	42.9%	8	57.1%
	Sin secado interdigital	1	12.5%	7	87.5%

Tabla 8. Resultado del diagnóstico micológico de los pacientes, en relación al tipo de lavado y secado.

Diagnóstico micológico y deformidades digitales del 1º dedo

La frecuencia de deformidades digitales en el pie derecho e izquierdo y su asociación al diagnóstico micológico se observan en la tabla 9. Al analizar resultados, en este estudio, la presencia de deformidades digitales en el 1º dedo no es estadísticamente significativo con hongos a este nivel, tanto en el pie derecho (p-valor: 0.263), como en el pie izquierdo (p-valor: 0.144).

		Diagnóstico positivo		Diagnóstico negativo	
		n	%	N	%
1º dedo pie derecho	No deformidad	3	13.0%	3	13%
	Deformidad (una o varias)	19	82.6%	17	73.9%
1º dedo pie izquierdo	No deformidad	2	66.7%	1	33.3%
	Deformidad (una o varias)	5	25.0%	15	75.0%

Tabla 9. Resultado del diagnóstico micológico de los pacientes, en relación al tipo de las deformidades digitales en el pie derecho e izquierdo.

Diagnóstico micológico e Índice Tobillo Brazo

Tras examinar resultados del ITB y analizarlos con las pruebas diagnósticas (tabla 10), se manifiesta que la oclusión no estadísticamente significativa (p-valor: 0.591). En cambio, la calcificación o rigidez arterial presenta una relación estadísticamente significativa (p-valor: 0.021).

	Diagnóstico positivo		Diagnóstico negativo	
	n	%	N	%
Oclusión	3	42.9%	4	57.1%
Sin oclusión	5	31.3%	11	68.8%
Calcificación	0	0.0%	7	100.0%
Sin calcificación	8	50.0%	8	50.0%

Tabla 10. Resultados del diagnóstico micológico de los pacientes, en relación a los del ITB.

DISCUSIÓN

Diagnóstico microbiológico y biología molecular

La incidencia de la onicomycosis en personas mayores de 60 años es del 20% y el 50% en los mayores de 70 años³. El 33–34% de los pacientes con diabetes mellitus padecen onicomycosis^{6,7}. Otros autores, además de señalar que la prevalencia es mayor en personas de edad avanzada, a partir de los 40-60 años, añaden que la localización más frecuente es el primer dedo^{16,17}. Los datos obtenidos en nuestro estudio concuerdan con estos hallazgos, de los 23 pacientes mayores de 65 años, los resultados positivos han sido en el 34.8% (n=8) de los pacientes y todos en el primer dedo.

Esta incidencia ha sido obtenida basándonos en los tres métodos de diagnóstico (visualización directa, cultivo y PCR). El método que ha presentado mayor sensibilidad ha sido la PCR, con un total de 8 muestras positivas (16% de las muestras estudiadas) frente a las 3 obtenidas por cultivo o por visualización directa (6%).

En cuanto a las técnicas utilizadas en este estudio el diagnóstico por PCR mostró la mayor sensibilidad (80.0%, 8 de las 10 muestras) en comparación con el diagnóstico convencional (30.0% cada uno de los dos métodos). La PCR para la detección de dermatofitos en muestras clínicas ha demostrado una mayor eficacia que el cultivo y microscopía^{8,18}. En el estudio de Ebihara *et al.*, la sensibilidad de la PCR fue del 94%, mucho más alta comparado con los resultados del cultivo. En cuanto a la visualización directa, sólo 3 de las 50 muestras, fueron positivas por microscopía y una de ellas no amplificó mediante PCR¹⁹. Esto podría explicarse porque la muestra original se divide en varios trozos para su análisis y pudiera ser que no hubiera micelio en el fragmento que se realizó la PCR.

La microscopía, resultó tener la misma sensibilidad que el cultivo (30%), Bonifaz *et al.* en su artículo obtuvo mayor porcentaje de positivos en la visualización directa con KOH (66,67%) y blanco de calcofluor (57.58%), en comparación con el cultivo (33,33 %) ²⁰. En este estudio, se asignó a la microscopía un resultado dudoso en los casos de sospecha de onicomycosis. El examen microscópico, se llevó a cabo con KOH al 40% que ayuda a disolver la queratina para la visualización del material fúngico, teñido con blanco de calcofluor que hace que la técnica sea más sensible ^{11,17,20}. No obstante, si tenemos en cuenta los dudosos, nuestra sensibilidad aumentaría hasta el 42%, porcentaje mucho más próximo a los publicados. Hay que tener en cuenta que el grado de experiencia es trascendente para evaluar la visualización directa ²⁰.

En las muestras negativas por cultivo, no se puede descartar la posibilidad de que algunos de estos casos puedan presentar infecciones fúngicas. Diferentes autores indican en sus artículos que no es raro obtener resultados negativos del cultivo por la dificultad de la toma de muestra o porque se siembran sólo pequeñas partes de la uña ^{2,9,11}. En este estudio, el cultivo tuvo una sensibilidad del 30%, se cultivaron dos trozos de uña de cada muestra en el medio SDA y en alguno de los casos, el crecimiento fúngico solo apareció en uno de los dos trozos de uña sembrados.

Los dermatofitos y levaduras son la causa más común de onicomycosis. Hongos no dermatofitos como *Scopulariopsis sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Acremonium sp.* también se han encontrado como patógenos comunes para la onicomycosis en pacientes con diabetes ⁶. En el artículo de Wijesuriya *et al.* con métodos diagnósticos convencionales se encontró como el agente más común *Aspergillus sp.* (71.0%) en pacientes diabéticos mayores de 50 años ⁶. En el estudio de Nouripour *et al.* se

obtuvieron *Aspergillus sp.*, en el 70.38%, aislando especies inusuales como el *Aspergillus sydowii* en el 1.3%. Señala, que en especies de *Aspergillus sp.* poco comunes, para aclarar la epidemiología los métodos útiles son los métodos moleculares²¹. En nuestro estudio es cierto, que al identificar los tres cultivos positivos por microscopía hicieron sospechar de *Scopulariopsis sp.*, género frecuente en infecciones fúngicas por hongos no dermatofitos, pero al identificarse por PCR, indiscutiblemente resultaron ser *Aspergillus sydowii*, una especie poco común y con mucha similitud en su morfología a *Scopulariopsis sp.*, como se observa en la figura 9 y 10. En el presente estudio, se obtuvo en el 87,5% (n=7) de las muestras positivas por PCR, *Aspergillus sydowii* y en el 12.5% (n=1) *Trichophyton interdigitale*.

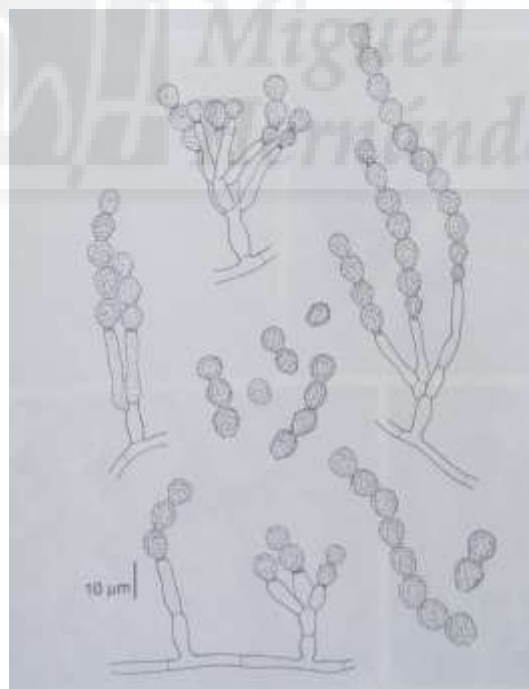


Figura 9. *Scopulariopsis brevicaulis* (De Hoog et al. Atlas of Clinical Fungi. 2000).

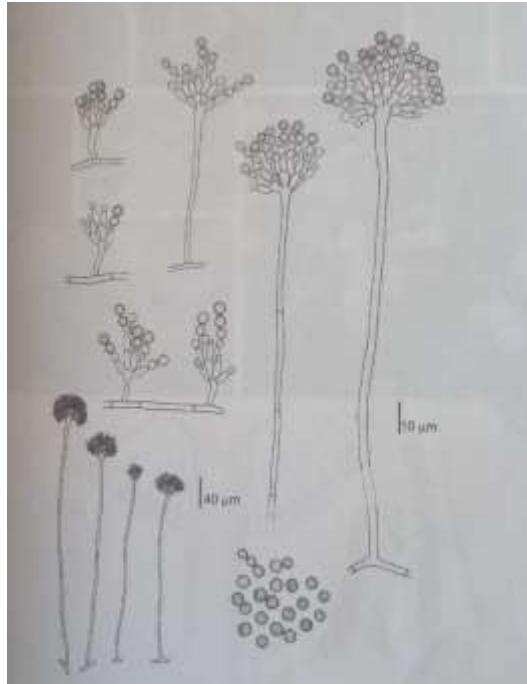


Figura 10. *Aspergillus nidulans* (De Hoog et al. Atlas of Clinical Fungi. 2000).

Diagnóstico micológico y características de los pacientes

No se conocen realmente los factores predisponentes para contraer la enfermedad, pero se han citado como condiciones asociadas a la micosis ungueal las alteraciones anatómicas, traumatismos, enfermedad vascular periférica, diabetes, endocrinopatías, inmunosupresión, el calzado, hiperhidrosis o la incapacidad para mantener un buen cuidado de los pies^{5,6,16,22}.

Ninguna de las características estudiadas en los pacientes pudo asociarse como factor de riesgo, lo que puede deberse a la pequeña muestra sometida a estudio.

En el artículo de Thomas *et al.* manifiesta que el uso de calzado oclusivo que dificulte la ventilación y transpiración puede contribuir a una mayor incidencia de onicomicosis⁷.

En nuestro estudio se intentó relacionar el diagnóstico micológico con el tipo de calzado.

Se analizó el tipo de material, el cierre del calzado y la forma de la punta. En ninguno de los casos, se pudo afirmar que estas características fuesen un factor de riesgo. Lo que no se puede obviar, es que este resultado puede ser debido a que el calzado que se observó fue con el que el paciente acudió a consulta, que no tiene por qué ser su calzado habitual.

Thomas *et al.*, también mencionó que la dificultad en la higiene de los pies produce, una mayor exposición a hongos causantes de enfermedades⁷. Con los resultados obtenidos, las medidas higiénicas y el tipo de secado efectuado por el paciente tampoco se pudieron relacionar con una mayor incidencia de onicomicosis.

En el artículo de Martínez *et al.* determina que las onicomicosis son más frecuentes en presencia de alteraciones anatómicas¹⁷. En este caso, aunque sean un factor de riesgo por producir traumatismos repetitivos que facilitan la infección fúngica, al examinar las deformidades digitales del 1º dedo de ambos pies con los resultados diagnósticos, no se pudo asociar con la causa de onicomicosis.

Thomas *et al.* indica que las enfermedades vasculares periféricas dificultan el crecimiento de uñas, evitando así, la prevención de la infección fúngica⁷. Al relacionar los resultados obtenidos en el estudio con los datos del paciente, la presencia de oclusión no se relacionó con la onicomicosis. En cambio, en pacientes con calcificación se obtuvo un resultado significativo. Es importante reseñar que con el ITB elevado no se puede conocer el estado de la capa íntima de las arterias, sería necesaria otra prueba más específica para determinar la presencia de patología arterial obstructiva.

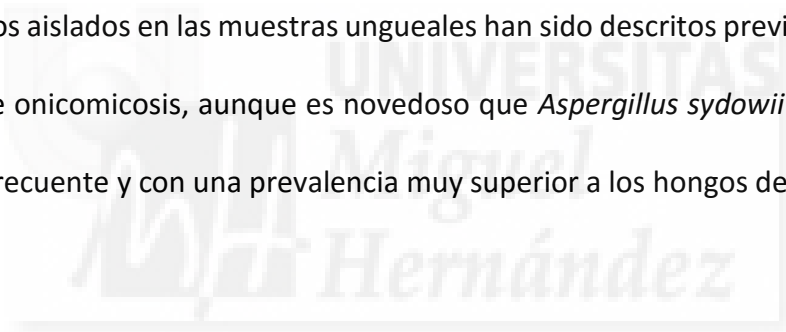
CONCLUSIONES

Nuestro estudio muestra un 34,8% de prevalencia de onicomicosis en ancianos diabéticos, lo que concuerda con estudios previos en este tipo de pacientes.

No se ha obtenido relación estadísticamente significativa entre la onicomicosis y factores de riesgo como el calzado, medidas higiénicas y tipo de secado en los pies, deformidades digitales del 1º dedo o enfermedades vasculares periféricas

La amplificación de las secuencias del ADN ribosómico (ITS) mediante PCR, resultó ser la técnica más sensible y específica, no solo para la detección sino no también para la correcta identificación fúngica.

Los patógenos aislados en las muestras ungueales han sido descritos previamente como causantes de onicomicosis, aunque es novedoso que *Aspergillus sydowii* sea el agente causal más frecuente y con una prevalencia muy superior a los hongos dermatofitos.



PERSPECTIVAS FUTURAS

Para afianzar las conclusiones de este trabajo, sería necesario incrementar el número de muestras y pacientes. Esto es de importancia trascendental para establecer conclusiones sólidas acerca de la relación entre las onicomycosis del anciano y factores de riesgo distintos de la diabetes mellitus.

Además, sería de gran interés ampliar conocimientos sobre especies como *Aspergillus sydowii* y su capacidad para invadir estructuras queratinizadas. A la vez que se hace necesario estudiar la sensibilidad de esta especie a los antifúngicos habitualmente utilizados para tratar estas micosis.



BIBLIOGRAFÍA

1. Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis – epidemiology, diagnosis and management. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26: 108 – 116.
2. Petinataud D, Berger S, Contet-audonneau N, Machouart M. Molecular diagnosis of onychomycosis. *Journal de Mycologie Médicale*. 2014; 24: 287 – 295.
3. Westerberg DP, Voyack MJ. Onychomycosis: Current Trends in Diagnosis and Treatment. *American Family Physican*. 2013; 88 (11): 762 – 770.
4. Siqurqueirsson B, Baran R. The prevalence of onychomycosis in the global population: a literature study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014; 28 (11): 1480 – 1491.
5. Singal A, Khanna D. Onychomycosis: Diagnosis and management. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2011; 77 (6): 659 – 672.
6. Wijesuriya TM, Kottahachchi J, Gunasekara T, Bulugahapitiya U, Ranasinghe KNP, Neluka F, Weerasekara M. *Aspergillus* species: An emerging pathogen in onychomycosis among diabetics. *Indian J Endocrinol Metab*. 2015; 19 (6): 811 – 816.
7. Thomas J, Jacobson GA, Narkowicz CK, Peterson GM, Burnet H, Sharpe C. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *JCPT*. 2010; 35: 497 – 519.
8. Kondori N, Abrahamsson AL, Ataollahy N, Wenneras C. Comparison of a new commercial test, Dermatophyte- PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. *Medical Mycology*. 2010; 48: 1005 – 1008.

9. Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45 (4): 1200 – 1204.
10. Yvonne G, Viktor C, Torsten O. Diagnostic PCR of dermatophytes – an overview. *JDDG*. 2012; 10: 721 – 725.
11. Verrier J, Pronina M, Peter C, Bontems O, Fratti M, Salamin K. Identification of Infectious Agents in Onychomycoses by PCR Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. *JCM*. 2012; 50 (3): 553 – 561.
12. Pemán J, Martín E, Rubio MC. 2007. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. 2ª ed. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.
13. Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL, Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S, ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol*. 2001; 38 (8): 2873 – 2879.
14. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MI. 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2ª ed. CBS/ Univ. Rovira i Virgili. 1126 p.
15. Ellis D, Davis S, Alexiou H, Handle R, Bartley R. 2007. Descriptions of Medical Fungi. 2ª ed. Published by the Authors, Australia. 187 p.
16. García P, Domínguez P, Linares M, Mira J, Calap J. Onychomycoses caused by non-dermatophytic filamentous fungi in Cádiz. *Emerg Infect Microbiol Clin*. 2000; 18 (9): 319 – 324.
17. Martínez E, Arroyo S, Tejada D, Porrás C, Arenas R. Onychomycosis due to opportunistic molds. *An Bras Dermatol*. 2015; 90 (3): 334 – 337.
18. Pagan A, Ollivier C, Viguié C, Anaya L, Mary C, De Ponfily G, Ranque S. Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect

- dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis.
Journal of Microbiological Methods. 2013; 95: 218 – 222.
19. Ebihara M, Makimura K, Sato K, Abe S, Tsuboi R. Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *BJD*. 2009; 161: 1038 – 1044.
20. Bonifaz ARios –Yuil JM, Arenas R, Araiza J, Fernández R, Mercadillo – Pérez P. Comparison of direct microscopy, culture and calcofluor white for the diagnosis of onychomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2013; 30 (2): 109 – 111.
21. Nouripour S, Mirhendi H, Shidfar MR, Ahmadi B, Rezaei A, Geramishoar M, Zarei F, Jalalzan D. *Aspergillus* species as emerging causative agents of onychomycosis. *J Mycol Med*. 2015; 25 (2): 101 – 107.
22. Myung L, Sung H, Moo S, Gyong H, Heesco K, Jeong P. Onychomycosis Caused by *Scopulariopsis brevicaulis*: Report of Two Cases. 2012; 24 (2): 209 – 213.

ANEXO 2: Hoja recogida de datos (hábitos higiénicos, calzado)

HÁBITOS HIGIÉNICOS		CALZADO		CALZADO					
LIMPIEZA Frecuencia	<input type="checkbox"/>	2 Veces al día	Antigüedad del calzado	<input type="text"/>	Talla del calzado que usa	<input type="text"/>			
	<input type="checkbox"/>	1 vez al día		Días utilización calzado por semana		<input type="text"/>	Meses utilización calzado por año	<input type="text"/>	
	<input type="checkbox"/>	Cada 2 días	CIERRE		<input type="text"/>	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/>	Velcro
	<input type="checkbox"/>	Cada 3 días						<input type="checkbox"/>	Cordones
	<input type="checkbox"/>	Una vez a la semana						<input type="checkbox"/>	Hebilla
<input type="checkbox"/>	Cada 15 días	<input type="checkbox"/>		Elástico / Gomas					
<input type="checkbox"/>	Otro	<input type="checkbox"/>		Cremallera					
<input type="text"/>		MATERIAL DEL CORTE	<input type="checkbox"/>	Sin cierre	TIPO DE CALZADO	<input type="checkbox"/>	Zapatilla deportiva		
			<input type="checkbox"/>	otro		<input type="checkbox"/>	Zapatilla Casual		
			<input type="checkbox"/>	Cuero / Piel		<input type="checkbox"/>	Bota Media caña		
			<input type="checkbox"/>	Piel Sintética		<input type="checkbox"/>	Botín		
			<input type="checkbox"/>	Plástico-goma		<input type="checkbox"/>	Bota alta		
SECADO	<input type="checkbox"/>	Interdigital	<input type="checkbox"/>	Tejido / Lona	<input type="checkbox"/>	Mocasín			
	<input type="checkbox"/>	Digital (incluido uñas)	<input type="checkbox"/>	Elástico	<input type="checkbox"/>	Zapato de salón			
	<input type="checkbox"/>	Plantar	<input type="checkbox"/>	Otro	<input type="checkbox"/>	Zapato destalonado			
	<input type="checkbox"/>	Dorsal	PUNTA	<input type="checkbox"/>	Circular	<input type="checkbox"/>	Zapato hombre tipo blucher		
	<input type="checkbox"/>	No secado		<input type="checkbox"/>	Cuadrada	<input type="checkbox"/>	Zapatilla de casa (slipper)		
		<input type="checkbox"/>		Redondeada	<input type="checkbox"/>	Manoletina			
		<input type="checkbox"/>		Ovalada	<input type="checkbox"/>	Sandalia			
		<input type="checkbox"/>		Fina	<input type="checkbox"/>	Otro			
PROTECCIÓN PIES	<input type="checkbox"/>	Calcetines	<input type="checkbox"/>	Abierto	<input type="checkbox"/>	MUJER (letra)			
	<input type="checkbox"/>	Panties	<input type="checkbox"/>	Otro	<input type="checkbox"/>	HOMBRE (letra)			
	<input type="checkbox"/>	Medias cortas							
	<input type="checkbox"/>	Pinkie							
	<input type="checkbox"/>	Sin protección							
<input type="checkbox"/>	Otro								
<input type="text"/>									

ANEXO 3: Hoja recogida de datos (deformidades digitales)

	FECHA:	
NOMBRE:		
DEFORMIDADES DIGITALES PIE DERECHO		
1º	<input type="checkbox"/> HAV Leve <input type="checkbox"/> Mod <input type="checkbox"/> Sev <input type="checkbox"/>	2º
	Lev Mod Sev	<input type="checkbox"/> Garra <input type="checkbox"/> Martillo <input type="checkbox"/> Mazo <input type="checkbox"/> Supra ADD <input type="checkbox"/> Supra ABD <input type="checkbox"/> Infra ADD <input type="checkbox"/> Infra ABD <input type="checkbox"/> Varo
	Lev Mod Sev	Lev Mod Sev
3º	<input type="checkbox"/> Garra <input type="checkbox"/> Martillo <input type="checkbox"/> Mazo <input type="checkbox"/> Supra ADD <input type="checkbox"/> Supra ABD <input type="checkbox"/> Infra ADD <input type="checkbox"/> Infra ABD <input type="checkbox"/> Varo	4º
	Lev Mod Sev	Lev Mod Sev
5º	<input type="checkbox"/> Garra <input type="checkbox"/> Martillo <input type="checkbox"/> Mazo <input type="checkbox"/> Supra ADD <input type="checkbox"/> Infra ADD <input type="checkbox"/> Varo	5º
	Lev Mod Sev	Lev Mod Sev
		Leve: Deformidad flexible, posicional Moderada: Deformidad semirígida, sin lesiones dérmicas Severa: Deformidad rígida con lesiones dérmicas
DEFORMIDADES DIGITALES PIE IZQUIERDO		
1º	<input type="checkbox"/> HAV Leve <input type="checkbox"/> Mod <input type="checkbox"/> Sev <input type="checkbox"/>	2º
	Lev Mod Sev	<input type="checkbox"/> Garra <input type="checkbox"/> Martillo <input type="checkbox"/> Mazo <input type="checkbox"/> Supra ADD <input type="checkbox"/> Supra ABD <input type="checkbox"/> Infra ADD <input type="checkbox"/> Infra ABD <input type="checkbox"/> Varo
	Lev Mod Sev	Lev Mod Sev
3º	<input type="checkbox"/> Garra <input type="checkbox"/> Martillo <input type="checkbox"/> Mazo <input type="checkbox"/> Supra ADD <input type="checkbox"/> Supra ABD <input type="checkbox"/> Infra ADD <input type="checkbox"/> Infra ABD <input type="checkbox"/> Varo	4º
	Lev Mod Sev	Lev Mod Sev
5º	<input type="checkbox"/> Garra <input type="checkbox"/> Martillo <input type="checkbox"/> Mazo <input type="checkbox"/> Supra ADD <input type="checkbox"/> Infra ADD <input type="checkbox"/> Varo	5º
	Lev Mod Sev	Lev Mod Sev
		Leve: Deformidad flexible, posicional Moderada: Deformidad semirígida, sin lesiones dérmicas Severa: Deformidad rígida con lesiones dérmicas