

Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose^{*}

Evaluation of the diagnostic methods of onychomycosis^{}*

Daniela Zanardi¹Daniel Holthausen Nunes²Alexsandra da Silva Pacheco³Mariana Quirino Tubone⁴Jorge José de Souza Filho⁵

Resumo: FUNDAMENTOS - As onicomicoses são infecções fúngicas responsáveis por 15 a 40% das doenças ungueais. Apesar do pleno conhecimento de seus agentes etiológicos e do surgimento de inúmeros medicamentos antifúngicos, mantêm-se as dificuldades para se estabelecer diagnóstico correto.

OBJETIVOS - Comparar o exame micológico direto, o histopatológico e a cultura dos pacientes com suspeita de onicomicose e verificar a sensibilidade e especificidade de cada método.

MÉTODO - Foram selecionados 40 pacientes com suspeita clínica de onicomicose e avaliados os três métodos diagnósticos. Calculou-se para cada exame: sensibilidade, especificidade e valores preditivos, positivo e negativo.

RESULTADOS - O exame micológico direto foi positivo em 29 pacientes (72,5%), o histopatológico em 14 (35%), a cultura em 22 (55%). As especificidades foram: exame micológico direto 78,6%, histopatológico 92,9% e cultura 100%. As especificidades não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Na análise dos valores preditivos positivo e negativo, a cultura e o exame micológico direto obtiveram maior eficácia, respectivamente.

CONCLUSÕES - O exame micológico direto foi o mais confiável para seu resultado negativo. A cultura mostrou-se específica quando positiva. Quanto à biópsia, não se mostrou sensível e apresentou especificidade equivalente à dos outros exames.

Palavras-chave: Diagnóstico; Microscopia; Onicomicose

Abstract: BACKGROUND - Onychomycoses are frequent fungal infections, responsible for 15% to 40% of nail plate diseases. In spite of great existing knowledge on the etiological agents and of the emergence of numerous antifungal drugs, difficulties still remain in making a correct diagnosis.

OBJECTIVE - To compare direct mycological examination, histopathology and culture of patients with suspicion of onychomycosis and to verify the sensitivity and specificity of the methods.

METHODS - Forty patients with clinical suspicion of onychomycosis were chosen and evaluated with the three diagnostic methods. For each of the methods, sensitivity, specificity, predictive positive value and predictive negative value were calculate.

RESULTS - Direct mycological examination was positive in 29 patients (72.5%), histopathology in 14 (35%), and culture in 22 (55%). Found specificities were: direct mycological examination: 78.6%, histopathology: 92.9% and culture: 100%. There were no significant differences in the specificity of the methods ($p > 0,05$). In the analysis of the predictive positive value and the predictive negative value, culture and direct mycological examination had the largest efficacies, respectively.

CONCLUSION - Direct mycological examination was the most reliable exam when its result was negative. Culture showed specificity when positive. As to the biopsy, it was found not to be sensitive and presented equivalent specificity to the other evaluated exams.

Keywords: Diagnosis; Microscopy; Onychomycosis

Recebido em 11.12.2006.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 14.03.2008.

^{*} Trabalho realizado no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Florianópolis (SC), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / Conflict of interest: None

Suporte financeiro: Nenhum / Financial funding: None

¹ Médica dermatologista pelo Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) - Florianópolis (SC), Brasil.

² Professor titular da disciplina de Dermatologia e Alergia Clínica – Unisul. Preceptor da Residência em Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC). Mestrado em Ciências Médicas (UFSC) – Florianópolis (SC), Brasil.

³ Médica pós-graduada pelo Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) - Florianópolis (SC), Brasil.

⁴ Aluna do 10º período de Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Florianópolis (SC), Brasil.

⁵ Professor titular da disciplina de Dermatologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Chefe do Serviço de Residência de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) – Florianópolis (SC), Brasil.

INTRODUÇÃO

As onicomicoses são infecções fúngicas frequentes que acometem as unhas, responsáveis por 15 a 40% das doenças ungueais. Sua prevalência está em crescimento, o que pode ser explicado por fatores como o aumento da incidência de imunodeficiências e da idade da população, melhora da vigilância médica, dos cuidados em relação às unhas e do uso de calçados impermeáveis de poliamida.^{1,2}

As onicomicoses estão em destaque nas patologias de regiões tropicais, principalmente devido ao clima quente e úmido. Fazem parte de sua origem três grupos de fungos bem definidos: os dermatófitos, em 80 a 90%, dos gêneros *Trichophyton* e *Epidermophyton*; raramente o gênero *Microsporum*, seguidos pelas leveduras, em cinco a 7%, sendo a *Candida albicans* o organismo mais comum, e os fungos não dermatófitos em dois a 12%.^{3,4}

A classificação das onicomicoses foi baseada nos quatro tipos clínicos específicos de alterações ungueais:^{5,6}

1. Onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL): variedade clínica mais frequente (90%); a invasão começa no hiponíqueo e na borda distal e lateral da lâmina ungueal, estendendo-se de forma lenta e progressiva até o setor proximal da unha.^{7,9}

2. Onicomicose branca superficial (OBS): representa dois a 5% das onicomicoses dermatofíticas. Caracteriza-se pela penetração in situ de estruturas fúngicas em direção ao interior da lâmina ungueal, podendo ser facilitada por traumas anteriores. É mais comumente observada nas unhas dos pés.^{7,9}

3. Onicomicose subungueal proximal (OSP): é a variante clínica menos comum, sendo observada com maior frequência em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida. Inicia-se pela invasão do fungo no estrato córneo da dobra ungueal proximal e subsequentemente, na lâmina ungueal.^{7,9,10}

4. Onicodistrofia total (OT): é o estágio final das onicomicoses por dermatófitos, não dermatófitos ou *Candida sp.* Verifica-se acometimento da matriz ungueal, e a totalidade da unha está alterada.^{8,9}

O diagnóstico laboratorial das onicomicoses pode ser realizado pelo exame micológico direto (EMD), por cultura fúngica e exame histopatológico.

O EMD é a primeira etapa do diagnóstico laboratorial, indicando, na maioria das vezes, se o material examinado contém ou não estruturas fúngicas que são avaliadas quanto à morfologia e coloração, auxiliando na conduta clinicolaboratorial. A observação de agentes hialinos e hifas regulares é sugestiva de dermatófitos; já a presença de pseudo-hifas ou hifas tortuosas, irregulares, com ou sem conídios, pode representar a existência de outros fungos miceliais não dermatófitos, sendo difícil essa diferenciação só ao EMD.

Por sua vez, a observação de leveduras ovaladas com pseudofilamentos não pigmentados e dispostas em acúmulo induz a suspeita de *Candida sp.*^{7,9,11-13}

A identificação dos fungos baseia-se nas características morfológicas tanto em vida parasitária nos organismos vivos quanto em vida saprofítica em meios apropriados de cultivo ou no meio ambiente. Ao EMD tem-se dificuldade em diferenciar fungos sapróbio e patogênico na amostra, principalmente quando são visualizadas leveduras, que são encontradas em ambos.⁹

A cultura é necessária para o isolamento e identificação da espécie, devendo o material ser inoculado sempre em diferentes meios, por exemplo, o ágar Sabouraud simples, o ágar Sabouraud com ciclo-heximida, que inibe o crescimento de fungos contaminantes, o ágar Sabouraud com cloranfenicol, que tem por finalidade inibir o crescimento de bactérias, o ágar-batata, utilizado na manutenção de culturas de dermatófitos, o ágar-fubá e o ágar-arroz, utilizados na indução de clamidósporo terminal de *Candida albicans*, o ágar-lacrimel, que é meio bastante enriquecido, permitindo o crescimento de fungos filamentosos e leveduras em geral.^{3,4,7,9}

Os fungos dermatófitos isolados em cultura devem ser considerados patogênicos. Já os fungos não dermatófitos podem ser encontrados como contaminantes ou como agentes etiológicos, sendo necessário repetir a cultura em duas ou mais ocasiões para reduzir a probabilidade de um fungo não dermatófito ser um contaminante.¹⁴

A separação e identificação do fungo nos cultivos se completa com sua correta identificação, sendo fundamental determinar se o fungo isolado está implicado na onicopatía ou se é contaminante.^{3,7}

Outro método complementar para o diagnóstico das onicomicoses é o exame histopatológico da lâmina ungueal, em que as hifas são vistas dispostas entre as camadas da unha, paralelas à superfície.^{3,7,13,15}

Apesar de os grupos de agentes causadores das onicomicoses estarem bem definidos e do advento de numerosos medicamentos antifúngicos para a terapia dessas infecções, mantêm-se as dificuldades para o estabelecimento de diagnóstico correto e tratamento eficaz, motivo pelo qual se pode afirmar que as onicomicoses seguem sendo problemática da atualidade.

Como o tratamento das onicomicoses pode requerer terapia de longo prazo com antifúngico oral, efeitos colaterais e de alto custo para o paciente, é importante diagnosticar corretamente a infecção, além de identificar o agente etiológico.

O objetivo deste trabalho foi comparar o EMD, a cultura e o exame histopatológico para o diagnóstico das onicomicoses dos pacientes com suspeita clíni-

ca atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário/UFSC e verificar a sensibilidade e especificidade de cada um dos métodos.

MATERIAL E MÉTODOS

Por meio de estudo observacional transversal, foram selecionados 40 pacientes com suspeita clínica de onicomicose, atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), submetidos a três métodos diagnósticos em avaliação: EMD, cultura e exame histopatológico.

O critério de inclusão consistiu na suspeita clínica de onicomicose, apresentadas por alterações ungueais sugestivas de acometimento por infecção fúngica, como, por exemplo, hiperqueratose subungueal, onicólise, onicodistrofia e alteração da coloração (amarela, esverdeada, esbranquiçada), em pacientes que não haviam iniciado tratamento com antifúngico tópico e oral até 15 dias antes da coleta do material para exame e que concordaram em participar do estudo.

As amostras de unha para o exame histopatológico foram assim obtidas: com cortadores de unha descartáveis, foi seccionada a porção da unha que apresentava alterações sugestivas de onicomicose, e o material enviado ao Laboratório de Patologia (Instituto de Diagnóstico Anátomo Patológico – Idap) em recipiente descartável sem formol e processado de maneira rotineira. Posteriormente, as amostras de unha foram tingidas com ácido periódico de Schiff (PAS) e avaliadas microscopicamente, todas por um único patologista.

Para os exames micológico direto e cultura, os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Micologia do HU/UFSC a fim de coletar o material. A raspagem da unha com auxílio de lâmina de bisturi ou cureta foi usada para obter grande quantidade de restos subungueais sem causar desconforto ao paciente. Foi utilizada clarificação por KOH a 20% para avaliação do EMD.

As amostras coletadas para os exames histopatológico, micológico direto e cultura, foram obtidas da mesma unha, sendo primeiro realizado o raspado subungueal e logo em seguida o histopatológico.

As culturas das amostras foram realizadas no meio ágar dextrose Sabouraud com e sem ciclo-heximida. Foram mantidas por quatro semanas em temperatura ambiente e verificadas periodicamente. As espécies de cada cultura positiva foram determinadas por estudo micromorfológico e macromorfológico.

Foram calculados para cada exame: sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN). A comparação entre os três exames foi feita pelo teste de Mc Nemar. Para determinar a sensibilidade e a especificidade considerou-se que, se pelo menos dois testes de diagnósticos fossem positivos, o paciente seria classificado como doente.

Utilizou-se o aplicativo Epidata para análise dos dados.

RESULTADOS

Dos 40 pacientes analisados, observou-se que nove tiveram resultado positivo nos três métodos diagnósticos (EMD, biópsia e cultura), e em 17 pacientes o resultado foi positivo em dois dos métodos diagnósticos.

Na tabela 1 é apresentada a frequência e a porcentagem de pacientes com o resultado positivo para cada um dos três métodos diagnósticos usados para os 40 pacientes. Notou-se que o teste EMD foi o que classificou maior quantidade de pacientes com onicomicose, 72,5%. Em contrapartida, o exame histopatológico classificou apenas 35% dos pacientes com onicomicose.

Para verificar o grau de concordância entre dois testes de diagnóstico foi utilizado o coeficiente de Kappa. De acordo com o critério de Landis & Koch,¹⁶ os valores do coeficiente de Kappa superiores a 0,80 representam concordância “quase perfeita”; valores entre 0,60 e 0,80 mostram concordância “substancial”; valores entre 0,40 e 0,60 mostram concordância “moderada”, e valores abaixo de 0,40 representam concordância “fraca”.

Na tabela 2 são apresentadas as comparações das frequências dos testes utilizando o coeficiente de Kappa e a concordância relativa.

Nota-se, na tabela 2, que a relação entre os métodos de diagnóstico EMD e cultura foi a que apresentou maior concordância relativa e concordância

TABELA 1: Análise descritiva da quantidade de pacientes classificados como doentes por cada um dos três testes (exame histopatológico, EMD, cultura), do total de 40 pacientes

Testes de diagnóstico	Frequência	%
Exame histopatológico	14	35
EMD	29	72,5
Cultura	22	55

TABELA 2: Coeficiente de Kappa e a concordância relativa para a comparação entre os testes de diagnóstico

Testes de diagnóstico	Kappa	Concordância %
Exame histopatológico vs EMD	0,2511	57,5
Exame histopatológico vs cultura	0,1262	55
EMD vs cultura	0,6335	82,5

substancial segundo o coeficiente Kappa. Para as demais relações estudadas, o nível de concordância apresentou-se fraco.

A tabela 3 mostra os resultados da análise de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN (considerando que no Brasil a prevalência de onicomicose entre as onicopatias é de 65%) e a significância estatística entre as sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos de diagnóstico pelo teste de Mc Nemar.

As sensibilidades de cada um dos métodos diagnósticos foram: exame histopatológico 50%; EMD 100% e cultura 84,6%. Observou-se que apesar de o teste EMD ter apresentado maior sensibilidade, ele não apresentou diferença significativa da cultura (p -valor $>0,05$), podendo-se assim considerar que esses dois testes têm sensibilidades equivalentes.

As especificidades obtidas foram: exame histopatológico 92,9%; EMD 78,6% e cultura 100%. Observou-se, entretanto, que essas especificidades não apresentam diferença significativa (p -valor $>0,05$) entre nenhum teste de diagnóstico, conforme os resultados do teste de McNemar. Portanto, quanto à especificidade, os três testes são equivalentes.

Ao analisar o VPN, verificou-se que o teste EMD forneceu o maior valor, ou seja, esse índice mostra a eficácia do teste de diagnóstico na situação em que o resultado do teste é negativo, e de fato o paciente não está doente.

Na análise do VPP, notou-se que a cultura apresentou maior eficácia, isto é, a cultura é o teste mais confiável nas situações em que seu resultado é positi-

vo, e realmente o paciente apresenta a doença.

DISCUSSÃO

Os métodos tradicionais usados para o diagnóstico das onicomicoses são a cultura e o EMD. Embora estes sejam métodos-padrão frequentemente utilizados, os limites de acurácia diagnóstica variam entre 50 e 70% dependendo dos métodos utilizados nas coletas e na preparação das amostras.¹⁵

Weinberg et al.¹⁵ em seu estudo descrevem que o EMD de amostras das unhas é o método mais simples e barato para diagnosticar infecções fúngicas, porém possui porcentagem falso-negativa de cinco a 15%, possivelmente devido à baixa visibilidade do material fúngico dispersado na amostra da unha. Essa afirmativa discorda do presente estudo, pois não foram encontrados resultados falso-negativos.

Araújo et al.,¹ realizaram estudo com 1.416 pacientes com onicodistrofia, dos quais foram coletadas amostras de unha para o EMD e cultura, havendo confirmação micológica de onicomicose em apenas 565 (39,9%). No presente estudo, a frequência de pacientes com EMD positivo foi de 29 (72,5%), maior do que a encontrada na literatura.

Clayton et al.,¹⁷ analisaram em seu estudo 2.113 unhas, sendo que 11% das referentes a pés e 19% a mãos apresentaram resultados positivos ao EMD e negativos à cultura. Culturas falso-positivas podem também ocorrer secundárias à contaminação do meio de crescimento. A flora normal da pele contém fungos não patogênicos que podem resultar em cultura positiva.

TABELA 3: Sensibilidade, especificidade e valores de predição dos testes biópsia, EMD e cultura no diagnóstico da onicomicose

Testes de diagnóstico	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Exame histopatológico	50%	92,9%	75%	81,2%
EMD	100%	78,6%	66,7%	100%
Cultura	84,6%	100%	100%	93,8%
Exame histopatológico vs EMD	0,0002 [#]	ns		
Exame histopatológico vs cultura	0,0490 [#]	ns		
EMD vs cultura	Ns	ns		

ns representa o p-valor não significativo ($p>0,05$) usando o teste de McNemar

[#] p-valor significativo ($p\leq 0,05$) usando o teste de McNemar

Segundo Weinberg et al.¹⁵ e Ellis,¹⁸ a cultura fúngica é mais específica que o EMD; entretanto, podem-se encontrar resultados falso-negativos quando a amostra das unhas contém hifas não viáveis, é insuficiente ou coletada distalmente ao crescimento do fungo. No estudo de Araújo et al.,¹ dos 1.416 pacientes avaliados que apresentavam onicodistrofia, a cultura mostrou-se positiva em 224 (15,2%). No estudo aqui divulgado, a cultura foi positiva em 22 pacientes (55%), apresentando concordância substancial quando comparada ao EMD.

Nos casos em que há evidência clínica de onicomicose com achados laboratoriais (EMD e cultura) negativos, deve-se considerar a repetição dos exames.¹⁸ Se mesmo assim, após a repetição dos exames, os resultados continuarem negativos, pode-se lançar mão de outros métodos complementares, como, por exemplo, a biópsia ungueal. Entretanto, é importante ressaltar que esse exame apenas confirma a presença do fungo, mas, como o EMD, não identifica a espécie do patógeno.¹³ Além disso, se a onicodistrofia não for decorrente da infecção fúngica, a histologia pode auxiliar no diagnóstico de causas alternativas, tais como a psoríase ou o líquen plano.¹⁵

Ao contrário do estudo de Lawry et al.,¹⁹ em que foi o mais sensível dos métodos avaliados no diagnóstico da onicomicose, neste trabalho o exame histopatológico não se mostrou sensível quando comparado ao EMD e cultura, destacando apenas 14 pacientes

(35%) positivos. Talvez esse fato possa ser explicado pela forma de coleta da amostra para o exame.

Novos estudos que desenvolvam métodos de coleta mais detalhados para a histopatologia, com associação de materiais para coleta da mesma amostra, como, por exemplo, a curetagem com cortador de unha e/ou lâmina de bisturi n. 15, seriam interessantes para obter amostra maior e quem sabe melhores respostas do que os resultados encontrados neste estudo.

Devido à disponibilidade de antifúngicos sistêmicos eficazes, grande número de pacientes recebe diversos tratamentos só com a suspeita clínica de onicomicose, sem comprovação diagnóstica.²⁰ O procedimento adequado seria utilizar os métodos complementares disponíveis no diagnóstico da onicomicose, uma vez que os tratamentos implicam alto custo, efeitos colaterais e tempo.

CONCLUSÃO

O EMD foi considerado o exame mais confiável para resultados negativos, ou seja, quando é provável que o paciente não seja portador de onicomicose.

A cultura mostrou-se específica nas situações em que seu resultado foi positivo, e realmente o paciente apresenta onicomicose.

Quanto à biópsia, não se mostrou sensível e apresentou especificidade equivalente à dos outros exames avaliados. □

REFERÊNCIAS

1. Araújo JG, Souza MAJ, Bastos OM, Oliveira JC. Occurrence of onychomycosis among patients attended in dermatology offices in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *An Bras Dermatol.* 2003;78:299-308.
2. Ramos e Silva M. Onicomicoses – diagnóstico diferencial. *Dermatologia Atual.* 1999;6:27-34.
3. Araújo JG, Souza MAJ, Bastos OM, Oliveira JC. Onychomycosis caused by emergent fungi: clinical analysis, diagnosis and revision. *An Bras Dermatol.* 2003;78:445-55.
4. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vaccari EMH, Melo NT. *Tratado de micologia médica Lacaz.* 9 ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
5. Roberts DT, Evans EVG, Allen R. *Fungal nail disease.* London: Gower Medical; 1990. p.86.
6. Zaias N. Onychomycosis. *Arch Dermatol.* 1972; 105:263-74.
7. Ballesté R, Mousques N, Gezuele E. Onicomicosis – revision del tema. *Rev Med Uruguay.* 2003;19:93-106.
8. Lopea JO, Alves SH, Mari C, Oliveira LTO, Brum LM, Westphalen JB, et al. A ten-year survey of onychomycosis in the central region of the Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 1999;41:147-9.
9. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
10. Fitzpatrick TB, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolfk K, Austen KF, Goldsmith LA, et al. *Tratado de Dermatologia.* 5 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. p.2351-4.
11. Correia O, Faegerman J, Nonicki R, Ro BI. Clinical trial design-towards better practices. *Centro Dermatologia Epidermis, Portugal. J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005;19:1-17.
12. Arenas-Guzman R, Tosti A, Hay R, Haneke E. Pharmacoeconomics an aid to better decision-making. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005;19:9.
13. Elewski B. Diagnostic techniques for confirming onychomycosis. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35(Pt 2):S6-9.
14. Gupta AK, Ryder JE, Summerbell RC. The diagnosis of nondermatophyte mold onychomycosis. *Int J Dermatol.* 2003;42:272-3.
15. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49:193-7.
16. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33: 159-74.
17. Clayton YM. Clinical and mycological diagnostic aspects of onychomycosis and dermatomycosis. *Clin Exp Dermatol.* 1992;17 Suppl 1:37-40.
18. Ellis DH. Diagnosis of onychomycosis made simple. *J Am Acad Dermatol.* 1999; 40(Pt 2):S3-8.
19. Lawry MA, Haneke E, Strobeck K, Martin S, Zimmer B, Romano PS. Methods for diagnosing onychomycosis: a comparative study and review of the literature. *Arch Dermatol.* 2000;136:1112-6.
20. Hull PR, Gupta KA, Summerbell RC. Onychomycosis: an evaluation of three sampling methods. *J Am Acad Dermatol.* 1998;39:1015-7.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Daniela Zanardi

Rua 1500, 1043

88330-526 - Balneário Camboriú, SC

Tel./Fax: (47) 33678300

E-mail: danielazanardi@yahoo.com.br

Como citar este artigo / *How to cite this article:* Zanardi D, Nunes DH, Pacheco AS, Tubone MQ, Souza Filho JJ. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicoses. *An Bras Dermatol.* 2008;83(2):119-24.