



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO BIOMÉDICO DE MARUÍPE
NÚCLEO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

Simone Bravim Maifrede

**Fungos associados às onicomicoses:
Prevalência e suscetibilidade a drogas
antifúngicas**

VITÓRIA
2009

Simone Bravim Maifrede

**Fungos associados às onicomicoses:
Prevalência e suscetibilidade a drogas
antifúngicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia das Doenças Infecciosas do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariceli Araújo Ribeiro

VITÓRIA
2009

Simone Bravim Maifrede

**Fungos associados às onicomicoses:
Prevalência e suscetibilidade a drogas
antifúngicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia das Doenças Infecciosas do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Apresentada em 06 de Março de 2009.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Claudia Maria Leite Maffei

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto

Prof^a Dr^a Elenice Moreira Lemos

Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a Dr^a Mariceli Araújo Ribeiro

Universidade Federal do Espírito Santo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M217f Maifrede, Simone Bravim, 1982-
Fungos associados às onicomicoses : prevalência e
susceptibilidade a drogas antifúngicas / Simone Bravim Maifrede. –
2009.
119 f. : il.

Orientador: Mariceli Araújo Ribeiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Onicomicose. 2. Dermatofitos. 3. Fungos. 4. Antimicóticos. I.
Ribeiro, Mariceli Araújo. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 09 de março de 2006

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Profa. Mariceli Araújo Ribeiro
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado:
"Dermatomicoses em Pacientes Imunocomprometidos"

Senhora Pesquisadora,

Através deste informamos à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado: "**Dermatomicoses em Pacientes Imunocomprometidos**", bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, em reunião ordinária realizada em 08 de março de 2006.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Biomédico / UFES

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a todos que estiveram ao meu lado, em especial meus pais, Isair e Eladir, pelo imenso amor, incentivo e enorme compreensão, a quem devo minha vida e formação moral.

AGRADECIMENTOS

- À Deus pelo dom da vida e oportunidades, e por me amparar nos momentos de dificuldade, dando-me força para superar as dificuldades.
- À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Mariceli Araújo Ribeiro pela orientação, ajuda na elaboração desta tese e pelos conhecimentos transmitidos. Um especial agradecimento por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência e contribuir para o meu crescimento profissional.
- Ao Técnico do Laboratório de Micologia do Departamento de Patologia José Mauro da Vitória pelo auxílio em todos os momentos que precisei e, principalmente pela paciência.
- À Técnica de Laboratório do Departamento de Patologia Idenir Rezende, pela atenção e boa vontade.
- À minha amiga de laboratório Adrielle Hoffmann pela amizade e pelo congelamento das amostras de fungos.
- À minha amiga de pós-graduação Ludmila Baltazar pelo companheirismo.
- A todos os funcionários e amigos de laboratório que indiretamente estiveram envolvidos nesta pesquisa possibilitando sua conclusão.
- Um especial agradecimento à FAPES (Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Espírito Santo) pelo financiamento do projeto de pesquisa que viabilizou minha dissertação e pela minha bolsa de mestrado.
- A toda minha família pelo apoio e incentivo. Especialmente aos meus pais, a minha eterna gratidão, pois foi graças a todo o seu apoio que tive a oportunidade de estudar. É também por eles que sinto a maior alegria ao concluir esta tese, podendo retribuir um pouco do orgulho que sinto.
- Aos pacientes que participaram do estudo, pois sem eles seria impossível a sua realização.
- A todos os colegas e professores do Programa de Pós-graduação em Patologia das Doenças Infecciosas pelo convívio e aprendizado.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Onicomicose é a infecção da unha causada por amplo espectro de espécies fúngicas, incluindo leveduras e fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos. Devido à variável suscetibilidade dos diversos agentes etiológicos às drogas antifúngicas, o diagnóstico laboratorial vem sendo considerado uma ferramenta importante para se estabelecer a etiologia e auxiliar na escolha do tratamento da onicomicose. Com base na elevada porcentagem de falha terapêutica no tratamento da onicomicose, tem-se evidenciado o interesse na padronização de testes de suscetibilidade *in vitro* de fungos filamentosos. **OBJETIVOS:** Estabelecer a frequência das onicomicoses em relação a outras dermatomicoses; definir a etiologia das onicomicoses através do isolamento e identificação dos fungos; comparar o padrão de suscetibilidade entre fungos dermatófitos e não-dermatófitos às drogas fluconazol, cetoconazol, itraconazol, miconazol, ciclopirox, terbinafina e griseofulvina. **MÉTODOS:** As amostras clínicas foram colhidas através de raspagem e/ou fragmentação da unha e o exame microscópico direto foi realizado através do tratamento destas amostras com hidróxido de potássio (KOH) a 20% e tinta Parker. As culturas foram realizadas nos meios de ágar Sabouraud dextrose adicionado de 0,05 mg.mL⁻¹ de cloranfenicol e ágar Mycosel®, incubados à temperatura ambiente e por um período de até 15 dias. A identificação dos fungos filamentosos foi baseada na observação de suas características macroscópicas e microscópicas e os testes de suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas foram baseados no Documento M38-A do CLSI. **RESULTADOS:** O diagnóstico laboratorial das dermatomicoses foi estabelecido em 69% dos 1.008 pacientes com lesões sugestivas de dermatomicoses encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico Micológico do Depto. de Patologia / UFES, no período de 12/03/2004 a 14/08/2008. Onicomicose foi diagnosticada em 333 pacientes e os grupos de fungos mais isolados foram: leveduras 55,6%, fungos filamentosos não-dermatófitos 27,2% e dermatófitos 17,3%. Fungos dermatófitos foram mais inibidos *in vitro* que fungos não-dermatófitos. As drogas fluconazol e griseofulvina inibiram apenas fungos dermatófitos, enquanto a terbinafina foi a droga que mais inibiu os dois grupos de fungos e em baixas concentrações. A quantificação do inóculo por contagem em hemocitômetro e em placas de ágar Sabouraud revelou que o acerto do inóculo em espectrofotômetro pode ter uma boa correspondência se estabelecido em faixas de transmitância

diferenciadas para os diversos tipos de fungos. **CONCLUSÃO:** É necessário estabelecer o diagnóstico laboratorial das onicomicoses, já que estas podem ser causadas por diversos agentes etiológicos e com diferentes suscetibilidades *in vitro* a várias drogas antifúngicas.

Palavras-chave: onicomicose. dermatófitos. fungos filamentosos não-dermatófitos. teste de suscetibilidade. agentes antifúngicos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Onychomycosis is the nail infection caused by a wide spectrum of fungi species, including yeasts, dermatophyte and nondermatophyte mould. Due to the variable susceptibility of the several etiologic agents to the antifungal drugs, the laboratorial diagnosis is being considered an important tool to establish the etiology and to help in the choice of the treatment of onychomycosis. Based on the high percentage of therapeutic flaw in the treatment of onychomycosis, there has been some evident interest in the standardization of the susceptibility tests *in vitro* of filamentous fungi. **OBJECTIVES:** To establish the frequency of the onychomycosis in relation to other dermatomycosis; to define the etiology of the onychomycosis by the isolation and identification of the fungi; to compare the pattern of susceptibility among dermatophytes and nondermatophytes mould to drugs such as fluconazole, cetoconazole, itraconazole, miconazole, ciclopirox, terbinafine and griseofulvine. **METHODS:** The clinical samples were collected by the scratching and/or fragmentation of the nail and the direct microscopic examination was made by the treatment of these samples with potassium hydroxide (KOH) at 20% and Parker ink. The cultures were made in dextrose agar Sabouraud with 0,05 mg.mL⁻¹ of cloranphenicol and agar Mycosel®, incubated to room temperature and for a period of up to 15 days. The identification of the filamentous fungi was based on the observation of its macroscopic and microscopic characteristics and the tests of susceptibility *in vitro* to the antifungal drugs were based on CLSI M38-A reference method. **RESULTS:** The laboratorial diagnosis of the dermatomycosis was established in 69% of the 1.008 patients with lesions that suggested dermatomycosis sent to the Laboratory of Mycologic Diagnosis from the Dept. of Pathology / UFES, in the period of 03/12/2004 to 08/14/2008. Onychomycosis was diagnosed in 333 patients and the groups of more isolated fungi were: yeasts 55,6%, nondermatophyte mould 27,2% and dermatophytes 17,3%. Dermatophytes were more inhibited *in vitro* than nondermatophytes ones. Drugs such as fluconazole and griseofulvine inhibited just dermatophytes fungi while terbinafine was the drug which most inhibited both groups of fungi and in low concentrations. The quantification of the inoculum for counting in haemocytometer and in plates of agar Sabouraud revealed that the correctness of the inoculum in espectrofotometer may have established a good

correspondence in transmission bands differentiated for the various types of fungi.

CONCLUSION: It is necessary to establish the laboratorial diagnosis of the onychomycosis, as these may be caused by several etiologic agents and with different susceptibilities *in vitro* to several antifungal drugs.

Key-words: Onychomycosis. Dermatophytes. Filamentous fungi . Non-dermatophytes. antifungal susceptibility. antifungal agents.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados gerais dos exames micológicos realizados para o diagnóstico das dermatomicoses.....	45
Tabela 2: Freqüência (%) de fungos dermatófitos com relação à localização da lesão e sexo do paciente	47
Tabela 3: Freqüência (%) de leveduras com relação à localização da lesão e sexo do paciente	47
Tabela 4: Freqüência (%) de fungos filamentosos não-dermatófitos em relação à localização da lesão e sexo do paciente.....	48
Tabela 5: Resultados dos exames micológicos para pacientes com suspeita de onicomicoses	49
Tabela 6: Distribuição dos grupos de fungos agentes de onicomicoses em relação ao sexo do paciente e unha envolvida	50
Tabela 7: Freqüências dos agentes fúngicos relacionados com as onicomicoses nos pacientes com cultura positiva para fungos	52
Tabela 8: Faixas de variações das CIM _s (µg/mL) de sete antifúngicos frente a 100 isolados de fungos filamentosos	54
Tabela 9: Comparações das CIMs de sete drogas antifúngicas necessárias para inibir 50% e 90% dos isolados de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos.....	55
Tabela 10: Comparações entre faixas de transmitância do n ^o de conídeos/mL e de UFC/mL observadas para os 100 isolados de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos	57
Tabela 11: Freqüência de espécies de dermatófitos em algumas regiões do Brasil.....	65
Tabela 12: CIM _s das espécies de <i>Fusarium</i> estudadas comparadas com investigações realizadas por outros autores	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição dos pacientes com suspeita clínica de dermatomicose de acordo com o sexo..... 44
- Figura 2:** Distribuição do grupo de fungos isolados dos casos de dermatomicoses 45
- Figura 3:** Frequência (%) dos sítios anatômicos diagnosticados com dermatomicoses..... 46
- Figura 4:** Distribuição das onicomicoses de acordo com a unha envolvida.....50
- Figura 5:** Distribuição dos grupos de fungos relacionados com a etiologia das onicomicoses51
- Figura 6:** Comparações entre as porcentagens de inibição de sete drogas antifúngicas testadas contra 50 isolados de fungos dermatófitos e 50 isolados de fungos não-dermatófitos 56
- Figura 7:** Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 066 e 228 de *S. dimidiatum*, na presença e ausência (controle) de itraconazol.....59
- Figura 8:** Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 066 e 228 de *S. dimidiatum*, na presença e ausência (controle) de miconazol.....59
- Figura 9:** Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 066 e 228 de *S. dimidiatum*, na presença e ausência (controle) de ciclopirox60
- Figura 10:** Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 066 e 228 de *S. dimidiatum*, na presença e ausência (controle) de terbinafina60
- Figura 11:** Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 369 e 997 de *T. rubrum*, na presença e ausência (controle) de itraconazol.....61
- Figura 12:** Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 369 e 997 de *T. rubrum* para miconazol.....61
- Figura 13:** Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 369 e 997 de *T. rubrum*, para ciclopirox62
- Figura 14:** Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 369 e 997 de *T. rubrum*, na presença e ausência (controle) de terbinafina.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. - *Aspergillus*

ABD - Ágar Batata Dextrose

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC - "American Type Culture Collection"

CBM - Centro Biomédico de Maruípe

CLSI - "Clinical and Laboratory Standart Institute"

CLX - Ciclopirox

CTC - Cetoconazol

Depto - Departamento

DMSO - Dimetil sulfóxido

F - Feminino

F. - *Fusarium*

FLC - Fluconazol

et al. - e outros

EUA - Estados Unidos da América

GRI - Griseofulvina

HIV - "Human Imunedeficiency Virus" (Vírus da Imunodeficiência Humana)

ITC - Itraconazol

KOH - Hidróxido de potássio

M - Masculino

MCZ - Miconazol

MOPS - 3-N-morpholine-propane sulfonic acid

PAS - "Periodic acid-Schiff" (Ácido periódico de Schiff)

PCR - "Polymerase Chain Reaction" Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

S. - *Scytalidium*

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

T. - *Trichophyton*

TRB - Terbinafina

UFC - Unidades formadoras de colônias

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

mm - Milímetros

mL - Mililitros

µg - Microgramas

°C - Graus Celsius

nº- número

= igual a

& - e

≥ - maior ou igual

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	17
1.2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.2.1 - Anatomia das unhas.....	18
1.2.2 - Prevalência das onicomicoses.....	19
1.2.3 - Aspectos clínicos das onicomicoses.....	22
1.2.4 - Etiologia das onicomicoses.....	23
1.2.5 - Onicomicose causada por fungos dermatófitos.....	24
1.2.6 - Onicomicose causada por leveduras.....	26
1.2.7 - Onicomicose causada por fungos filamentosos não-dermatófitos.....	27
1.2.8 - Diagnóstico laboratorial das onicomicoses.....	31
1.2.9 - Tratamento das onicomicoses.....	32
1.2.10 - Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> a drogas antifúngicas.....	35
2 – OBJETIVOS.....	37
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 - TIPO DE ESTUDO	38
3.2 – LOCAL.....	38
3.3 - AMOSTRA CLÍNICA	38
3.4 – PROCEDIMENTOS.....	38
3.4.1 - Colheita do material clínico.....	38
3.4.2 - Exame microscópico direto das amostras.....	39
3.4.3 - Isolamento de fungos.....	39
3.4.4 - Identificação dos fungos.....	39
3.4.5 - Critério para diagnóstico de onicomicose causada por fungos filamentosos não-dermatófitos.....	40
3.5 - TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>in vitro</i> A DROGAS ANTIFÚNGICAS.....	40
3.5.1 - Meio de cultura.....	40
3.5.2 – Fungos.....	40
3.5.3 - Agentes Antifúngicos.....	40
3.5.4 - Preparação do inóculo.....	41
3.5.5 - Cálculo para a concentração de conídeos no inóculo (conídeos/mL).....	42

3.5.6 - Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima “CIM”.....	42
3.5.7 - Controles	43
3.5.8 – Interpretação.....	43
3.5.9 - Determinação da inibição <i>in vitro</i> em macrodiluição.....	43
4 - RESULTADOS	44
4.1 - ETIOLOGIA DAS DERMATOMICOSSES	45
4.2 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ONICOMICOSSES	48
4.3 - TESTE DE SUSCETIBILIDADE	53
4.4 - QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO	57
4.5 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DA MACRODILUIÇÃO	57
5 – DISCUSSÃO	63
6 – CONCLUSÕES	77
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8 – ANEXOS	97

1 – INTRODUÇÃO

As dermatomicoses são infecções fúngicas superficiais que acometem tecidos queratinizados como estrato córneo, pêlos e unhas (OKEKE *et al.*, 2000). Onicomicose é um tipo de dermatomicose localizada nas unhas e causada por amplo espectro de espécies fúngicas, incluindo fungos filamentosos dermatófitos, não-dermatófitos e leveduras (HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005). Neste trabalho, as onicomicoses foram abordadas, relacionando a sua freqüência em relação a outras dermatomicoses.

As onicomicoses são as enfermidades mais freqüentes das unhas, constituindo 50% das onicopatias (GHANNOUM *et al.*, 2000; CHANUSSOT & ARENAS, 2007; GUPTA *et al.*, 2007) e 30% de todas as infecções fúngicas cutâneas (MISHRA *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2007). Seus agentes possuem distribuição variável, que depende de fatores como clima, área geográfica e migração (KARDJEVA *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007).

A prevalência das onicomicoses no mundo é extremamente variável. Estudos realizados no Canadá demonstraram taxas de prevalência de onicomicose na população geral variando de 6,5% a 6,8% (GUPTA & LYNDE, 1997). Na Austrália e Inglaterra, a prevalência foi estimada em torno de 3% do total da população, elevando-se na população idosa (ROBERTS, 1992; ELLIS *et al.*, 1997a). Alguns estudos sugerem que mais de 48% da população possa estar infectada na idade de 70 anos (DRAKE *et al.*, 1998; SCHER, 1999).

Onicomicose desenvolve-se na presença de fatores predisponentes. Os fatores mais comumente relacionados são angiopatia, neuropatia periférica, uso de sapatos fechados, deformidade nas unhas, traumas recorrentes, predisposição genética e distúrbios metabólicos como diabetes (SEEBACHER *et al.*, 2007). Pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) podem apresentar uma freqüência mais alta quando comparados com a população não infectada (KAUR *et al.*, 2008).

O diagnóstico micológico é extremamente importante para estabelecer a etiologia e auxiliar na escolha da terapia que será aplicada no tratamento da onicomicose

(RUBIO *et al.*, 1999), pois muitas vezes, não é possível definir o diagnóstico da infecção fúngica com base somente nas características clínicas das lesões (TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000). A confirmação laboratorial positiva de infecção fúngica na unha é de grande importância para a prática clínica, já que o tratamento das onicomicoses requer extensiva terapia oral com agentes antifúngicos, e com o uso prolongado desses fármacos, existe grande probabilidade do desenvolvimento de reações adversas (SAVIN *et al.*, 2007).

A resposta terapêutica em casos de onicomicoses é considerada difícil e essa infecção freqüentemente desempenha um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (JAISWAL *et al.*, 2007), podendo levar a desenvolvimento de problemas emocionais, sociais e ocupacionais (ELEWSKI, 1998).

Com base na elevada porcentagem de falhas terapêuticas no tratamento das onicomicoses e à suscetibilidade variável aos agentes antifúngicos, o alvo deste estudo foi conhecer a freqüência das espécies fúngicas mais relacionadas com onicomicose e avaliar uma metodologia para o desenvolvimento de um teste de suscetibilidade “*in vitro*” para os fungos filamentosos a drogas antifúngicas, realizando algumas adaptações ao documento M38-A (2002), proposto pelo CLSI, visando auxiliar na indicação terapêutica bem como no prognóstico durante o tratamento.

1.2 – REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Anatomia das unhas

A unha é um anexo cutâneo constituído por queratina, situado na extremidade dorsal dos dedos, sobre as últimas falanges e possui função de proteção da porção distal dos dedos (RIBEIRO *et al.*, 1995).

O aparelho ungueal é constituído pelos seguintes componentes epidérmicos: prega ungueal proximal e lateral, cutícula, matriz, lúnula, placa ungueal, leito ungueal e hiponíquio (Anexo 1). A cutícula está localizada na prega proximal do leito ungueal, sendo constituída de estrato córneo modificado que protege a matriz de infecções

(ELEWISKI, 1998). A matriz é o centro de crescimento da unha. Quando a unha cresce, células da matriz se dividem, diferenciam-se, sofrem processo de queratinização e então, são incorporadas à placa ungueal (COHEN *et al.*, 1992). A maior parte do aparelho ungueal consiste na lâmina, aderida ao leito, que recobre a parte distal da falange (DAWBER & BARAN, 1993), possui forma triangular ou quadrangular, sendo dura, porém flexível (TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000). A placa ungueal é limitada pelas pregas ungueais proximais e laterais. Junto à primeira, encontra-se a lúnula, em forma de meia lua, que corresponde à porção mais distal da matriz ungueal, e, adjacente a essa, a cutícula (COHEN *et al.*, 1992).

As pregas ungueais laterais representam à continuação da porção epitelial dos dedos e se unem medialmente com o leito ungueal. Sob a parte livre da lâmina ungueal está o hiponíquio, contíguo à epiderme do dedo (COHEN *et al.*, 1992).

As unhas das mãos crescem em média de 2 até 3mm por mês, e as unhas dos pés crescem em média 1mm por mês. Esta medida de crescimento é freqüentemente diminuída na presença de doença vascular periférica e de onicomicose em idosos (ELEWISKI, 1998; TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000).

A estrutura normal da unha se altera com a idade produzindo alterações de cor, espessura, flexibilidade e aspecto. Aumento da fragilidade e perda do brilho da superfície são as principais conseqüências do aumento da idade, e em alguns casos são marcadas por distúrbios distróficos, principalmente as unhas dos pés. Essas alterações das unhas podem levar a perda de função e, é mais propensa a agressões, incluindo infecções por várias espécies de fungos (TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000).

1.2.2 Prevalência das onicomicoses

A onicomicose, ou micose ungueal, é uma infecção fúngica crônica que atinge as unhas das mãos e/ou dos pés, levando a gradual destruição do aparelho ungueal (SEEBACHER *et al.*, 2007). Acomete todas as idades, sendo mais freqüente na população idosa (RODRIGUES-SOTO *et al.*, 1993).

Onicomicose é uma infecção relativamente comum, com valores de prevalência variando de 2 a 50% dependendo da população estudada (VEER *et al.*, 2007). Um estudo realizado em Madrid, Espanha, reportou a prevalência de onicomicose de 2,8% na população adulta (PEREA *et al.*, 2000). Nos Estados Unidos da América, a prevalência é estimada em valores próximos a 15% (SVEJGAARD & NILSSON, 2003) e aproximadamente uma entre cinco pessoas com a idade de 40 a 60 anos apresenta onicomicose (VELEZ *et al.*, 1997; ARAÚJO *et al.*, 2003).

A epidemiologia das onicomicoses é bem estudada em alguns países, mas poucos dados são avaliados em países tropicais (BRILHANTE *et al.*, 2005). Em um estudo realizado em Delhi, Índia, a prevalência de onicomicose foi confirmada em 45% dos pacientes com suspeita de infecção fúngica ungueal, com o valor de prevalência superior àquelas encontradas em Ontário (6,86%), Nordeste da Grécia (20%), Itália (26,3%) e Turquia (41%), (GUPTA & LYNDE, 1997a; KIRAZ *et al.*, 1999, PEREA *et al.*, 2000; KOUSSIDOU, 2002), porém inferior às prevalências observadas no Brasil por LOPES *et al.*, 1999b (Rio Grande do Sul) e PONTES *et al.*, 2002 (João Pessoa, PB) com os respectivos valores de 56,6% e 66,5%.

A onicomicose em crianças é pouco freqüente, contudo, nos últimos 20 anos sua freqüência tem aumentado. Essas infecções, em crianças, parecem ser pouco freqüentes nos países desenvolvidos, mas são comuns na América Latina (ARENAS & OCET, 1997). As porcentagens de onicomicoses por dermatófitos observadas em crianças variam de 0,2% a 0,44% na América do Norte (GUPTA *et al.*, 1997b), mas os índices de prevalência obtido em pesquisas em diferentes partes do mundo variam de 0,1% a 2,6% (média 0,3%) (FINDLAY *et al.*, 1974).

Estudos realizados em diferentes países auxiliam a estabelecer a prevalência de onicomicose no mundo, porém a prevalência obtida por esses estudos é muito heterogênea, limitando a aplicação e generalização desses dados, já que os estudos realizados diferem em vários aspectos metodológicos como população estudada, diferentes faixas etárias, sexo e hábitos culturais (PEREA *et al.*, 2000).

Onicomicose é uma infecção que acarreta prejuízos ao indivíduo, reduzindo a qualidade de vida e a auto-estima; a capacidade funcional por vezes é afetada de maneira a interferir nas atividades rotineiras (ARAÚJO *et al.*, 2003). Vários fatores

predisponentes, além da idade avançada, estão envolvidos no desenvolvimento das onicomicoses, dentre eles, fatores genéticos, imunodeficiências, presença de neuropatia periférica, uso de sapatos fechados apertados, deformidades nos pés, traumas recorrentes (praticantes de esportes), classe social e freqüentadores de saunas (GHANNOUM *et al.*, 2000; KAUR *et al.*, 2007; SEEBACHER *et al.*, 2007). Segundo GUPTA & HEM, 2000, idade avançada, *Tinea pedis*, trauma ungueal repetitivo e diabetes são os principais fatores predisponentes para o desenvolvimento de onicomicose.

Essas infecções ocorrem com maior freqüência em pacientes diabéticos, sendo conhecida por aumentar a exarcebação dos problemas nos pés desses pacientes e por reduzir sua qualidade de vida (RICH *et al.*, 2003). Um estudo comparando freqüências de onicomicose entre grupos de pacientes diabéticos e não-diabéticos, o risco da população diabética desenvolver onicomicose foi três vezes maior do que no grupo de pacientes não-diabéticos (RICH *et al.*, 2003; CHANUSSOT & ARENAS, 2007). Em outros estudos foram demonstrados resultados contrários; não havendo diferença quanto à freqüência de micoses superficiais e ungueais entre pacientes diabéticos e não-diabéticos (ROMANO *et al.*, 2001; CHANUSSOT & ARENAS, 2007). A prevalência de onicomicose nas unhas dos pés de pessoas diabéticas em Ontário e Massachusetts foi estimada em 32,3% e 34,9%, respectivamente (ARAÚJO *et al.*, 2003).

A freqüência de onicomicose em hemodializados também é alta comparando com pacientes controles com valores entre 6,2-52% (KUVANDIK *et al.*, 2007).

Pacientes com SIDA também apresentam freqüência superior quando comparados com os pacientes sem a infecção pelo HIV, com valores entre 15-40% e, está diretamente ligada com o grau de imunossupressão do paciente (SURJUSHE *et al.*, 2007).

Onicomicose nas unhas dos pés é 4 à 7 vezes mais freqüente do que nas unhas das mãos (SZEPIETOWSKI *et al.*, 2006). Os possíveis fatores responsáveis por essa diferença são: o crescimento mais lento da lâmina ungueal dos pés e a maior probabilidade de trauma (ARAÚJO *et al.*, 2003). A maior freqüência de diagnóstico nas unhas das mãos, provavelmente se deve ao fato dessas lesões chamarem mais

atenção, mas certamente são menos freqüentes do que a onicomicose das unhas dos pés (ARAÚJO *et al.*, 2003).

1.2.3 Aspectos clínicos das onicomicoses

As onicomicoses podem ser caracterizadas em quatro tipos de acordo com a apresentação clínica e a rota de invasão do fungo.

Onicomicose subungueal distal: é a forma mais comum de micose ungueal (KAUR *et al.*, 2008). O organismo infectante invade o leito da unha, começando pelo hiponíquio e então migra para a região proximal da unha através da matrix subjacente. Inflamação branda se desenvolve, resultando em paraqueratose focal e hiperqueratose subungueal, com duas conseqüências: onicólise (destacamento da lâmina da unha do leito ungueal) e espessamento da região subungueal. Esse espaço subungueal pode servir como reservatório para bactérias e fungos infectantes, dando a lâmina da unha uma aparência marrom amarelada (ELEWISKI, 1998; KAUR *et al.*, 2008).

Onicomicose subungueal proximal: é um subtipo relativamente incomum, e ocorre quando o organismo infectante invade a unha pela região proximal através da área da cutícula, e migra para a região distal. As apresentações clínicas incluem hiperqueratose subungueal, onicólise proximal, leuconíquia e destruição da lâmina na região proximal. Embora a micose subungueal proximal tenha uma ocorrência pouco freqüente na população em geral, é comum em pacientes com SIDA e é considerado um marcador clínico da infecção pelo vírus da imunodeficiência. A infecção também pode ocasionalmente surgir de traumas secundários. Afeta igualmente unhas dos dedos das mãos e dos pés (ELEWISKI, 1998; KAUR *et al.*, 2008).

Onicomicose superficial branca: é menos freqüente que a onicomicose subungueal distal e ocorre quando certos fungos invadem diretamente a camada superficial da lâmina da unha. Pode ser reconhecida pela presença de uma região bem delineada opaca (ilhas brancas) na lâmina externa da unha, caracterizada pela localização superficial do fungo na superfície dorsal da lâmina ungueal (PIRACCINI

et al., 2004). Essas regiões opacas coalescem e espalham enquanto a infecção progride. A unha se torna áspera, mole e com aspecto esmigalhado. Inflamação é geralmente mínima em pacientes com onicomicose superficial branca, porque o tecido viável não é comprometido. Ocorre primariamente nas unhas dos dedos dos pés (ELEWISKI, 1998; KAUR *et al.*, 2008).

Candidíase ungueal: é uma infecção que se inicia por eritema da pregas proximais e laterais da unha (paroníquia). Depois, ocorre a infecção da matriz ungueal, seguida pela invasão da placa ungueal, tornando-a convexa, irregular e por último distrófica (KAUR *et al.*, 2008).

1.2.4 Etiologia das onicomicoses

As onicomicoses são causadas por vários agentes etiológicos e os mais comuns são os dermatófitos (80 a 90%), seguidos pelas leveduras (5 a 17%) e fungos filamentosos não-dermatófitos (2 a 12%), sendo os dois últimos grupos de fungos freqüentemente relacionados com infecções secundárias, enquanto os dermatófitos causam infecções primárias. Infecções mistas podem ser relatadas, porém raramente (PEREA *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2003; KAUR *et al.*, 2008). A onicomicose está freqüentemente associada com *Tinea interdigitale* ou *Tinea pedis* (ARAÚJO *et al.*, 2003).

Os dermatófitos são responsáveis por aproximadamente 90% das infecções nas unhas dos pés (ELEWISKI, 1998), enquanto espécies de *Candida*, particularmente a *Candida albicans*, prevalecem nas unhas das mãos (LÓPEZ & TORRES, 1999a). Os fungos filamentosos não-dermatófitos são menos freqüentes e algumas espécies de *Fusarium spp.*, *Scytalidium spp.* e *Acremonium spp.*, também são descritas como agentes etiológicos das onicomicoses (TOSTI *et al.*, 2000).

Existem várias fontes de infecção para as onicomicoses, variando conforme o agente etiológico. Nas onicomicoses por *Candida spp.*, o paciente é portador assintomático do agente causal (origem endógena) e, devido a presença de certos fatores, como por exemplo, microtraumatismos nas regiões periungueais associados, em geral, com o aumento da umidade local, contribuem para que a

levedura ultrapasse a condição de sapróbio e, torne-se patogênica. As onicomicoses causadas por fungos dermatófitos são adquiridas por contato direto com seres humanos e animais infectados, ou indiretamente, por contato com ambiente ou fômites contaminados (MINELLI & MARQUES, 2000).

1.2.5 Onicomicose causada por fungos dermatófitos

Os dermatófitos são fungos filamentosos, constituídos por hifas hialinas e septadas. Caracterizam-se principalmente pela atividade queratinolítica, que possibilita a invasão de tecidos queratinizados como pele, pêlos e unhas de seres humanos e outros animais (WAGNER & SOHNLE, 1995; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995; ALIO *et al.*, 2005). Estes fungos são extremamente difundidos e causam as infecções denominadas dermatofitoses, também chamadas de “*Tinhas*” ou “*Tineas*” (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que se distribuem em três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. A descrição dos três gêneros é baseada na morfologia e distribuição dos conídeos ou estruturas de frutificação (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

O gênero ***Microsporum* spp.** caracteriza-se pela presença, em cultura, de estruturas de frutificação conhecidos como macroconídeos. Essas estruturas são conídeos grandes, de forma navicular e são divididos por septos transversais de espessura variável e que apresentam em sua superfície, principalmente na parte distal, uma grande quantidade de protuberâncias que conferem aspecto conhecido como verrucoso. Associados aos macroconídeos, podem ser observados, às vezes, estruturas também de frutificação, bem menores e claviformes, conhecidas como microconídeos. Tanto os macroconídeos como os microconídeos ficam distribuídos ao longo das hifas (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

O gênero ***Trichophyton* spp.** caracteriza-se pela presença de uma grande quantidade de microconídeos de forma arredondada ou claviformes e disposição peculiar nas hifas, associados a poucos macroconídeos de forma cilíndrica, divididos

em septos finos e transversais, com superfície externa lisa (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

O gênero *Epidermophyton spp.* em cultura apresenta apenas macroconídeos na forma de clava, divididos por finos septos e com superfície lisa; esses macroconídeos freqüentemente são evidenciados agrupados uns aos outros. Não se observa a presença de microconídeos. Desse gênero somente a espécie *Epidermophyton floccosum* é patogênica (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

Com base no habitat, os dermatófitos podem ser agrupados em geofílicos, zoofílicos, e antropofílicos. Os dermatófitos antropofílicos são primariamente associados com infecções em humanos e raramente infectam animais. Dermatófitos zoofílicos freqüentemente infectam animais, mas ocasionalmente infectam os seres humanos; já os dermatófitos geofílicos são primariamente associados a resíduos queratinosos como pêlos, penas, lã, fragmentos de chifres e escamas de pele, presentes nos solos. A importância de se reconhecer a que habitat pertence determinada espécie de dermatófito, está relacionada com a resposta inflamatória que ele pode desencadear no hospedeiro humano, portanto, observa-se que, quanto mais distante filogeneticamente está um dermatófito da espécie por ele parasitada, maior será a resposta inflamatória desencadeada no hospedeiro (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

De acordo com as recomendações da nomenclatura das infecções fúngicas propostas pela “Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal”, o termo onicomicose deve ser substituído por *Tinea unguium* quando o agente for dermatófito (LÓPEZ & TORRES, 1999).

Os fungos dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale* são os patógenos predominantes, causando 80-90% dos casos de *Tinea unguium* dos pés (RICH *et al.*, 2003; ASPIROZ *et al.*, 2007; KAUR *et al.*, 2007). Em um estudo realizado na Croácia, a espécie mais comumente isolada foi *T. interdigitale* (55%). Na Bulgária, *T. rubrum* foi mais freqüentemente isolado (76%), enquanto *T. interdigitale* correspondeu a apenas 2% dos isolados (KARDJEVA *et al.*, 2006). Outros estudos realizados em várias partes do mundo, como Canadá (SUMMERBELL, 1997), Itália (GIANNI *et al.*, 2000) e Estados Unidos (KORTING *et*

al., 1995; GUPTA *et al.*, 2007) demonstram que *T. rubrum* é o dermatófito mais freqüentemente isolado nas onicomicoses. A alta freqüência de *T. rubrum* pode ser atribuída à habilidade de parasitar a dura queratina presente nas unhas (GUPTA *et al.*, 2007). Na Índia, de 130 pacientes com suspeita de onicomicose, os dermatófitos foram isolados em 70% dos casos, sendo *T. rubrum* a espécie mais isolada, com freqüência de 32,6% dos casos (GUPTA *et al.*, 2007).

Tinea unguium pode levar ao envolvimento subungueal distal e proximal, além da infecção micótica superficial branca (KAUR *et al.*, 2008). A micose subungueal distal é geralmente causada pelo dermatófito *T. rubrum* embora *T. interdigitale*, *T. tonsurans*, e *E. floccosum* também possam causar esse tipo de micose acometendo unhas das mãos e dos pés. A micose subungueal distal geralmente esta associada com a presença de *Tinea pedis* (ELEWSKI, 1998; KAUR *et al.*, 2008). Com relação à onicomicose superficial branca o agente etiológico mais freqüente é o *T. interdigitale* (KAUR *et al.*, 2008).

Outros dermatófitos são esporadicamente isolados de *Tinea unguium* e podem ser mais observados em certas regiões geográficas como *T. violaceum*, *T. megnini*, *T. schoenleinii*, e *T. concentricum* e *T. soudanense* (NGWOGU & OTOKONEFUR, 2007).

1.2.6 Onicomicose causada por leveduras

Esta micose é predominantemente causada por leveduras do gênero *Candida* sendo *Candida albicans* a espécie mais freqüente (RAO *et al.*, 2004), correspondendo à cerca de 70% das onicomicoses provocadas por leveduras (KAUR *et al.*, 2008). Entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida ciferii*, *Candida sake*, *Candida haemulonii*, *Candida famata*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides* e *Candida krusei* podem causar onicomicose (LÓPEZ & TORRES, 1999a; RAO *et al.*, 2004). Ambas as unhas das mãos e dos pés podem ser infectadas, porém observa-se o predomínio da infecção nas unhas das mãos (KAUR *et al.*, 2008), apresentando caráter agudo ou crônico (WAGNER & SOHNLE, 1995). A onicomicose por *Candida* spp. geralmente se manifesta como infecção subungueal proximal, ou onicomicose superficial branca ou

onicólise (GUPTA *et al.*, 2003a). Onicólise é a separação da placa ungueal do leito ungueal, ocorrendo na extremidade distal e progredindo irregularmente para a área lateral (RAO *et al.*, 2004). Paroníquia é o tipo mais comum de infecção ungueal causada pelas leveduras do gênero *Candida* e, caracteriza-se pela infecção periungueal da prega ungueal distal e lateral, resultando em típica inflamação e eritema (WAGNER & SOHNLE, 1995). O foco inicial da infecção se inicia na prega cutânea ao redor da unha, e pode se espalhar e invadi-la (TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000). O envolvimento da unha (oníquia) pode ser grave, havendo erosão e espessamento da borda ungueal que, se estende transversalmente pela lâmina ungueal, que se torna distrófica e escurecida (WAGNER & SOHNLE, 1995). Os fatores que favorecem a infecção são maceração, traumatismos e abrasão química (TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000).

A evidência de onicomicose subungueal por *Candida* spp. é vista no exame microscópico direto através da visualização de pseudohifas e blastoconídeos laterais. A presença apenas de células leveduriformes, mesmo em grande número, pode significar apenas colonização (SUMMERBELL, 1997).

As onicomicoses podem ser associadas a outros gêneros de leveduras como *Trichosporon* e *Geotrichum* (LÓPEZ & TORRES, 1999a). O gênero *Trichosporon* corresponde a uma levedura classificada como basideomiceto e, morfológicamente se apresenta como artroconídeos, similares ao do gênero *Geotrichum*, mas diferencia desse gênero principalmente através da produção de urease. Trinta e sete espécies de *Trichosporon* já foram descritas, sendo que algumas apresentam afinidade pela queratina humana (LÓPEZ & TORRES, 1999a). *T. mucoides* e *T. inkin* já foram isolados de alguns casos de onicomicoses (GUEHO, 1994).

1.2.7 Onicomicose causada por fungos filamentosos não-dermatófitos

As onicomicoses também podem ser causadas por espécies de fungos filamentosos hialinos (com exceção dos dermatófitos) ou demáceos. Esses fungos são encontrados normalmente na natureza como sapróbios do solo ou patógenos de plantas (BELL-SYER *et al.*, 2001). Até pouco tempo eram considerados fungos contaminantes, porém nos últimos anos com aumento de sua freqüência entre as

micoses ungueais são considerados fungos emergentes (GIANNI *et al.*, 2000). A identificação desses agentes emergentes é muito importante, não somente para se conhecer a epidemiologia e etiologia da doença, mas também para os médicos e indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de novas opções de tratamento (IORIZZO *et al.*, 2007).

Não se conhece se as infecções provocadas pelos fungos filamentosos não-dermatófitos ocorrem primariamente em unhas saudáveis ou ocorrem somente como invasores secundários, invadindo a placa ungueal que já apresenta algum dano como trauma, isquemia ou outras doenças, como infecção por dermatófitos (BATAWI *et al.*, 2005).

Onicomicose ocasionada por fungos filamentosos não-dermatófitos é mais freqüente nas unhas dos pés do que das mãos e na idade adulta, especialmente depois dos 50 anos de idade (HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005).

Vários pesquisadores demonstram que, como os dermatófitos, fungos filamentosos não-dermatófitos podem também degradar a queratina *in vitro* por produzirem enzimas proteolíticas, incluindo a queratinase (GUGNANI, 2000). Estes fungos não-dermatófitos isolados de unhas constituem um grupo diversificado de gêneros, incluindo *Scytalidium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Acremonium* spp. e *Onychocola canadensis* (MIGDLEY *et al.*, 1994; LOPES *et al.*, 1999a; LALITHA *et al.*, 2007). Outros fungos não-dermatofíticos podem excepcionalmente causar onicomicose (GIANNI *et al.*, 2000).

A freqüência de onicomicose provocada por esse grupo de fungos varia de 0 a 50% dependendo dos autores, mas a maioria dos estudos demonstra valores de freqüência em torno de 3,5% em relação a outros fungos agentes de onicomicose (KARDJEVA *et al.*, 2006). As freqüências de onicomicoses causadas por fungos filamentosos não-dermatófitos em países europeus como Áustria, Estônia, Itália e Espanha são de 5%, 7%, 8% e 17,2% em relação a outros agentes etiológicos, respectivamente (HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005). Na América do Norte, observou-se freqüência de 4,3% no Canadá e de 20% nos Estados Unidos, enquanto que na América do Sul, a freqüência foi cerca de 4,5%, variando de 9,5% (em dois diferentes centros da Colômbia) até 1% na Argentina (HILMIOGLU-POLAT *et al.*,

2005). Na Ásia, as freqüências relatadas foram de 12% em Singapura e 22% na Índia (HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005). Um estudo de onicomicose na Turquia reportou a freqüência de 2,1% para fungos filamentosos não-dermatófitos em relação a outros agentes etiológicos, mas o estudo foi retrospectivo e as culturas não foram repetidas (HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005).

A freqüência das espécies também é variável: na Espanha e Itália, *Scopulariopsis brevicaulis* é o agente dominante, em relação aos outros fungos filamentosos não-dermatófitos, com freqüências de 7,8 e 35%, respectivamente. Na Estônia, *Acremonium* spp. e *Scopulariopsis* spp. são os mais freqüentes, sendo predominantes nas unhas dos pés (HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005). Na América do Norte, *Fusarium* spp. é o agente mais freqüente entre os fungos filamentosos não-dermatófitos, atingido freqüência de 34,1% nos Estados Unidos (HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005). No Brasil, um estudo realizado no Ceará, *Fusarium* spp. foi responsável por 8,19% dos isolados entre as outras espécies de fungos filamentosos não-dermatófitos, sendo o mais prevalente (BRILHANTE *et al.*, 2006).

Scytalidium dimidiatum e *Scytalidium hyalinum* são espécies de fungos filamentosos não-dermatófitos responsáveis por onicomicoses com manifestações clínicas similares as causadas por *Trichophyton rubrum* (ÁLVAREZ *et al.*, 2000; LACROIX & CHAUVIN, 2008). *Scytalidium dimidiatum* é um fungo demáceo que possui a forma anamórfica atroconideal de *Nattrassia mangiferae*, anteriormente denominado de *Hendersonula toruloidea* (ÁLVAREZ *et al.*, 2000; GUGNANI, 2000). Inicialmente foi descrito como patógeno vegetal em áreas tropicais e subtropicais (ÁLVAREZ *et al.*, 2000), sendo isolado de madeira, bem como raízes e solos da Inglaterra, Índia, Itália e Zimbábwe (LACAZ *et al.*, 1999). Nos últimos anos, foi descrito como patógeno capaz de infectar unhas dos pés e mãos. *Scytalidium dimidiatum* é considerado agente de onicomicose nos países tropicais e subtropicais. A ocorrência de onicomicose por *S. dimidiatum* em países de clima temperado, ocorre em pacientes imigrantes que viajaram para áreas endêmicas como África, Caribe, Ásia, Índia e América Central (ÁLVAREZ *et al.*, 2000). Admite-se que a infecção por esse fungo é adquirida por meio de contato com terra e material vegetal contaminado (ÁLVAREZ *et al.*, 2000). CAMPBELL, 1971 e MOORE, 1986 sugeriram a possibilidade de transmissão entre humanos. Em algumas zonas endêmicas como o Sudeste Asiático, as infecções por *S. dimidiatum* são mais importantes do que as provocadas

por fungos dermatófitos (ÁLVAREZ *et al.*, 2000). As unhas afetadas pelo *Scytalidium dimidiatum* podem apresentar onicólise, sendo freqüente o espessamento e aspecto opaco da placa ungueal, que às vezes apresenta coloração escura característica (ÁLVAREZ *et al.*, 2000). A inflamação é menos pronunciada quando comparado com as lesões provocadas por fungos dermatófitos (GUGNANI *et al.*, 2000). No exame direto, é possível distinguir as suas hifas irregulares e curtas, das hifas com presença de artroconídeos características dos dermatófitos (ÁLVAREZ *et al.*, 2000). A colônia do *S. dimidiatum* se caracteriza por apresentar cor cinza escura, com micélio flutuante abundante que facilmente se fragmenta em dois ou mais segmentos de células denominados artroconídeos (RANDHAWA, 2008). A espécie *Scytalidium hyalinum* possui artroconídeos hialinos (LACAZ *et al.*, 1999).

Fusarium é um fungo ubíquo amplamente distribuído no solo, plantas e diferentes substratos orgânicos. As espécies de *Fusarium* podem causar uma grande variedade de infecções em humanos, incluindo as onicomicoses (GUGNANI, 2000). Esse gênero corresponde a mais de 100 espécies, mas *F. solani* e *F. oxysporum* são as espécies mais freqüentemente envolvidas nas onicomicoses (IZQUIERDO *et al.*, 2008). As culturas de *Fusarium* spp. se caracterizam por possuir esporos fusiformes e hifas hialinas, pertencendo ao grupo dos hialohifomicetos (GUGNANI, 2000). A maior parte dos casos de onicomicoses por *Fusarium* spp. ocorre nas unhas dos pés (CAMPOS *et al.*, 2005) e, raramente as unhas das mãos estão envolvidas (GUGNANI, 2000). A infecção pode se apresentar como infecção subungueal distal e lateral, superficial branca ou superficial proximal (GUPTA *et al.*, 2001). O aspecto da unha afetada pelo gênero *Fusarium* é a presença de coloração branco-amarelada e opaca (ARAÚJO *et al.*, 2003). Paroníquia associada com leuconíquia proximal é sugestiva de infecção provocada por *Fusarium* (GUGNANI *et al.*, 2000). Na Costa Rica, *Fusarium* spp. é cada vez mais freqüente nas unhas e inclusive nos espaços interdigitais, sendo importante conhecer as características macro e microscópicas deste fungo para evitar confundi-lo com outros fungos contaminantes, auxiliando a estabelecer um tratamento mais adequado (CAMPOS & HERNÁNDEZ-CHAVARRIA, 2005).

O gênero *Aspergillus* é amplamente distribuído na natureza, sendo isolado facilmente do solo, material em decomposição e na poeira (GUGNANI, 2000). São fungos filamentosos hialinos de rápido crescimento, apresentam distribuição

universal e freqüentemente são considerados como contaminantes de laboratório, podendo passar despercebidos por esse motivo (LÓPEZ & TORRES, 1999a). Esse gênero é isolado com certa freqüência de casos de onicomicoses nas unhas dos pés (LÓPEZ & TORRES, 1999a). *A. versicolor* é uma das espécies mais freqüentemente isolada, com uma freqüência de 5,8% entre as outras espécies de *Aspergillus* (TOSTI *et al.*, 2000). Outras espécies são descritas como agentes de infecções de unha como *A. glaucus*, *A. niger*, *A. unguis*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. flavus* e *A. chevalieri* (GUGNANI, 2000).

Scopulariopsis brevicaulis está freqüentemente associado com casos de onicomicoses (TOSTI *et al.*, 1996; TOSTI *et al.*, 2000), principalmente em países de clima temperado. Propágulos de *S. brevicaulis* são freqüentemente encontrados no meio ambiente, sendo esse gênero conhecido por degradar queratina *in vitro*, e freqüentemente se observa com invasor secundário das unhas depois de infecção primária por dermatófitos (GUGNANI, 2000). As unhas infectadas por esse gênero, apresentam típica hiperqueratose subungueal e lise distal da placa ungueal associada com dor e inflamação periungueal. Ocasionalmente, *S. brevicaulis* pode causar lesões inflamatórias na pele (GUGNANI, 2000).

Onychocola canadensis é um fungo reportado como responsável por onicomicose. É isolado do solo e plantas. Vários casos confirmados de infecção por *O. canadensis* já foram descritos: Sete casos foram no Canadá, três na Nova Zelândia e três na França (GUGNANI, 2000).

Fungos demáceos como *Curvularia*, *Drechslera*, *Ulocaladium*, *Exophiala* e *Stemphylium* podem ser raramente isolados como agentes responsáveis por onicomicose (ELLIS *et al.*, 1997b). Principalmente, e como na maioria das infecções por fungos filamentosos não-dermatófitos, esses infectam as unhas dos primeiros pododáctilos (LÓPEZ & TORRES, 1999a).

1.2.8 – Diagnóstico laboratorial das onicomicoses

O resultado do exame micológico é muito importante para estabelecer a etiologia e a terapia que deve ser utilizada para o tratamento da onicomicose (RUBIO *et al.*,

1999). Não é possível definir o diagnóstico das onicomicoses com base somente nas características clínicas das lesões, entretanto a aparência das unhas permite uma aproximação do possível agente etiológico (TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000). Se a onicomicose está associada com outras injúrias na região interdigital dos pés, é lógico suspeitar de dermatofitose ou infecção por *Scylalidium* spp. nas regiões endêmicas (TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000). Onicomicose provocada por leveduras geralmente levam a paroníquia com acometimento focal ou geral das unhas. Fungos “sapróbios” geralmente acometem as unhas dos pés, inicialmente com lesões que possuem cor amarelada ou marrom, permitindo um diagnóstico aproximado que sempre deve ser confirmado laboratorialmente, através da identificação do agente etiológico (TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000).

O diagnóstico laboratorial deve ser constituído por exame microscópico direto, isolamento e identificação da espécie fúngica pela análise morfológica e/ou bioquímica (LÓPEZ & TORRES, 1999a). Além disso, identificação e a cultura das espécies feitas em laboratório permitem testar sua suscetibilidade *in vitro* aos agentes antifúngicos, essenciais para introdução e controle do tratamento (TORRES-RODRÍGUES & JODRA, 2000).

Em casos suspeitos de onicomicose em que há o quadro clínico de infecção, porém o exame direto e a cultura são negativos, o exame histopatológico deve ser realizado através da coloração PAS. Principalmente nos casos em que foi feito o uso de terapia antifúngica antes da coleta da amostra (SEEBACHER *et al.*, 2007).

Técnicas utilizando PCR têm emergido como ferramentas valiosas no diagnóstico da onicomicose, mas são utilizadas somente em poucos laboratórios de referência e em nível de pesquisa (GARG *et al.*, 2007).

1.2.9 – Tratamento das onicomicoses

Onicomicoses são infecções reconhecidas por apresentarem uma desfavorável resposta ao tratamento (TORRES-RODRÍGUES *et al.*, 1998), por vários fatores, entre eles, baixa resposta terapêutica aos agentes antifúngicos convencionais, terapia com longa duração, alto custo e o lento crescimento inerente das unhas,

requerendo longos períodos para se observar os efeitos positivos do tratamento, além da dureza das unhas que dificulta a penetração dos fármacos na queratina ungueal e a proteção da placa da unha aos agentes etiológicos, através do seqüestro de patógenos entre o leito e a lâmina ungueal (MISHRA *et al.*, 2005).

Os primeiros antifúngicos utilizados na terapia das onicomicoses foram a griseofulvina e o cetoconazol. A griseofulvina atua interagindo no fuso mitótico, provocando a inibição no processo da mitose (KATZUNG, 2003). A terapia com griseofulvina apresentava longa duração e a resposta terapêutica era relativamente baixa, com valores em torno de 0% a 17%, e as recidivas eram freqüentes, com valores que atingiam 33% a 40% (VILLARS & JONES, 1992). Em 1980, o cetoconazol, um importante agente antifúngico oral, começou a ser empregado para o tratamento das onicomicoses, porém as taxas de cura foram igualmente baixas com valores entre 11% a 65% (VILLARS & JONES, 1992). Atualmente, os antifúngicos mais empregados na prática clínica para o tratamento das onicomicoses são: terbinafina, miconazol, fluconazol, itraconazol, clotrimazol, ciclopirox (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2001; MISHRA *et al.*, 2005). O tratamento com esses fármacos pode ser realizado por administração tópica, como cremes, soluções e esmaltes, ou por via oral, com exceção do miconazol e ciclopirox que são usados apenas por administração tópica.

Drogas azólicas como cetoconazol, fluconazol, miconazol e itraconazol atuam inibindo a enzima 14-demetilase, que atua na conversão do lanosterol em ergosterol. Essa enzima microsomal faz parte do complexo citocromo P450 e sua inibição leva a interrupção do crescimento do fungo, caracterizando essas drogas como fungistáticas (MISHRA *et al.*, 2005). O itraconazol é um triazólico que possui espectro de ação contra dermatófitos, leveduras, fungos filamentosos, dimórficos e demáceos. É igualmente efetivo no tratamento contínuo e no tratamento em pulsos (MISHRA *et al.*, 2005). Fluconazol é ativo contra dermatófitos, espécies de *Candida* e alguns fungos filamentosos não-dermatófitos. Esse fármaco não é recomendado para o tratamento de onicomicose, porém, um estudo reportou que a administração oral de fluconazol na dosagem de 450mg semanalmente, durante quatro meses, para o tratamento de onicomicose nas unhas das mãos, correspondeu à cura clínica em 90% dos casos (VILLARS & JONES, 1992).

A terbinafina é um antifúngico pertencente à classe das alilaminas (MISHRA *et al.*, 2005). Sua ação é sobre a enzima esqualeno-epoxidase, bloqueando a biossíntese do ergosterol (TORRES-RODRÍGUES, 1998; MISHRA *et al.*, 2005). É a droga de escolha para o tratamento da *Tinea unguium*, por ser primariamente efetiva contra dermatófitos. Penetra na placa ungueal por difusão pela matriz e leito ungueal e pode ser detectada na placa ungueal durante 30-36 semanas após interrupção do tratamento. Embora o tratamento convencional seja a administração diária, a administração em pulsos é uma opção viável para o tratamento da onicomicose (MISHRA *et al.*, 2005). Terbinafina apresenta atividade superior ao itraconazol em testes *in vitro* e *in vivo*. E deve ser considerada como primeira droga de escolha para o tratamento das onicomicoses provocadas pelos fungos dermatófitos, sendo o itraconazol a segunda alternativa (GUPTA *et al.*, 2003b). Respostas terapêuticas com administração de terbinafina em pacientes com infecções nas unhas das mãos atingem valores de 80-90% e de 70 a 80% para infecções nas unhas dos pés. A terbinafina é altamente efetiva no tratamento de infecções fúngicas, apresentando um amplo espectro de ação (PETRANYI *et al.*, 1987; OSBORNE *et al.*, 2003), porém é notavelmente menos efetiva contra fungos não-dermatófitos, incluindo espécies de *Candida* e filamentosos não-dermatófitos (EFFRON *et al.*, 2004).

Ciclopirox é um agente antifúngico sintético, derivado da hidroxipiridona, seu mecanismo de ação é diverso, atuando sobre diferentes processos metabólicos da célula fúngica. O ciclopirox possui amplo espectro de ação contra dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não-dermatófitos (JAISWAL *et al.*, 2007). Depois da aplicação da solução de ciclopirox a 8% na unha, o solvente evapora e a concentração do fármaco aumenta 34,87%, resultando em um alto gradiente de concentração do agente antifúngico na unha (JAISWAL *et al.*, 2007).

A escolha terapêutica é determinada pela localização, extensão da infecção e pela espécie envolvida, bem como a eficácia, segurança, farmacocinética e custo do fármaco. A eficácia dos distintos antifúngicos tópicos atualmente disponíveis não é similar, tampouco possui o mesmo espectro de ação (BELL-SYER *et al.*, 2001). Sobre essas características influenciam fatores como viscosidade, hidrofobicidade e o pH da formulação que afetará na penetração dos fármacos no sítio infectado (BELL-SYER *et al.*, 2001). Com a existência de espectro de ação característico de cada antifúngico, faz-se necessário realizar a identificação dos agentes etiológicos.

Igualmente, a sensibilidade individualizada dos patógenos implicados, é um fator a considerar, justificando o estudo de sua suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos mais empregados (BELL-SYER *et al.*, 2001).

1.2.10 – Teste de suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas

Nas últimas duas décadas, a frequência de onicomicose aumentou consideravelmente e vários fatores contribuem para este aumento, como o crescimento da população idosa mundial devido à melhoria das condições de saúde e, conseqüentemente, o aumento do número de indivíduos com diabetes e problemas circulatórios que são fatores que contribuem para o desenvolvimento de onicomicose; outro fator é o aumento de pacientes imunocomprometidos incluindo aqueles infectados pelo HIV, além do uso de terapias imunossupressoras, como quimioterapia em pacientes com câncer ou o uso contínuo de antibióticos (KAUR *et al.*, 2008).

Paralelamente, tem-se evidenciado o interesse crescente por testes de suscetibilidade *in vitro* para agentes antifúngicos (VIVAS & TORRES-RODRIGUES, 2001), proporcionando comparações entre as diferentes drogas e, sendo de grande importância clínica, pois auxilia na escolha da melhor terapia a ser utilizada (GUPTA *et al.*, 2003b).

O documento M27-A (1997) foi proposto pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) como primeiro teste padronizado para avaliar a suscetibilidade de leveduras à anfotericina B e algumas drogas azólicas (GUARRO *et al.*, 1998; NORRIS *et al.*, 1999; KHAN *et al.*, 2006). Posteriormente, o mesmo órgão estabeleceu o Documento M38-A (2002), como método padronizado para teste de suscetibilidade para fungos filamentosos. Este documento descreve a realização do teste de suscetibilidade para fungos filamentosos associados com infecções fúngicas invasivas, incluindo *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus arrhizus*, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, e outros agentes fúngicos oportunistas menos comuns (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2005), mas não contempla os fungos dermatófitos, *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, considerados

os fungos mais freqüentes nas infecções micóticas humanas e muito relacionados à falhas terapêuticas (GHANNOUM *et al.*, 2004; SIQUEIRA *et al.*, 2008).

Os testes de suscetibilidade a drogas antifúngicas envolvem muitas variáveis, como temperatura e tempo de incubação, confecção do inóculo (GUARRO *et al.*, 1998), meio de cultura (NORRIS *et al.*, 1999; LASS-FLORL *et al.*, 2006), solvente utilizado para dissolver as drogas antifúngicas, (RANDHAWA, 2006; RANDHAWA, 2008), pH e ainda, para dermatófitos, o número de repiques que foram realizados antes de submeter o fungo isolado ao teste de suscetibilidade, já que algumas espécies de dermatófitos apresentam tendência ao pleomorfismo, fenômeno relacionado à diminuição do número de conídios quando os fungos são repicados inúmeras vezes. A inabilidade do isolado produzir conídeos irá dificultar a determinação de sua suscetibilidade (NORRIS *et al.*, 1999). Todos os fatores acima citados devem ser considerados, pois são capazes de interferir na determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM_s) das drogas. Além disso, diferentes espécies de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos, apresentam conídios com diferentes tamanhos (macroconídios e microconídios) que também alteram a densidade óptica lida no espectrofotômetro durante o ajuste do inóculo (LASS-FLORL *et al.*, 2006). Vários estudos demonstram a importância do uso do hemocitômetro na obtenção de inóculos com acurácia e reprodutibilidade, independentemente da cor e do tamanho dos conídeos (LASS-FLORL *et al.*, 2006).

2 – OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar e identificar os fungos agentes de onicomicose e testar a suscetibilidade *in vitro* dos fungos filamentosos a drogas antifúngicas, considerando que as metodologias existentes ainda não estão padronizadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar as formas de clínicas de dermatomicoses mais freqüentes nos pacientes atendidos nos ambulatórios de Dermatologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) e outras instituições de saúde da grande Vitória, ES;
- Estabelecer a freqüência das onicomicoses em relação a outras dermatomicoses;
- Definir a etiologia das onicomicoses através do isolamento e identificação dos fungos;
- Avaliar uma metodologia para testar a suscetibilidade de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos a drogas antifúngicas, realizando algumas adaptações no documento M 38-A do CLSI (2002);
- Comparar o padrão de suscetibilidade entre fungos dermatófitos e não-dermatófitos para as principais drogas utilizadas no tratamento das onicomicoses;
- Testar a suscetibilidade *in vitro* de dermatófitos e não-dermatófitos durante diferentes fases de crescimento fúngico, através de teste de macrodiluição de droga em caldo, comparando com os resultados da microdiluição.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-TIPO DE ESTUDO

Estudo descritivo e prospectivo.

3.2 – LOCAL

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Diagnóstico Micológico/ Departamento de Patologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

3.3 – AMOSTRA CLÍNICA

A população estudada foi constituída por pacientes atendidos nos ambulatórios de Dermatologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) e de outras instituições de saúde da grande Vitória, Espírito Santo, no período de 12/03/2004 a 14/08/2008. Pacientes com suspeita de dermatomicoses foram encaminhados ao referido laboratório, onde amostras de unhas, pele ou pêlos foram coletados para o diagnóstico laboratorial.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/CCS/UFES em 08 de Março de 2006 e os pacientes foram dispensados da assinatura do termo de consentimento para a realização dos exames.

3.4 - PROCEDIMENTOS

3.4.1 Colheita do material clínico: O material foi colhido através de raspagem subungueal e/ou fragmentação da unha; bem como raspagem de pele ou couro cabeludo, tomando-se o cuidado de retirar o material da área de transição entre a lesão e o tecido sadio. As amostras foram colhidas após anti-sepsia com álcool a 70% para remoção de possíveis fungos contaminantes que poderiam interferir no resultado. Os instrumentos usados para coleta, armazenamento e transporte das

amostras clínicas foram todos previamente esterilizados. Pêlos infectados foram pinçados para que fossem analisados na sua porção intrafolicular.

A coleta das amostras clínicas só foi realizada nos pacientes que não haviam feito o uso de medicação com drogas antifúngicas por um período superior a 15 dias antes da realização da coleta.

3.4.2 Exame microscópico direto das amostras: A preparação para o exame microscópico direto foi realizada através da “clarificação” do material clínico com hidróxido de potássio (KOH) a 20% e tinta Parker, para facilitar a visualização das estruturas fúngicas. O exame microscópico direto foi realizado através da pesquisa das estruturas fúngicas com aumento de 400X.

3.4.3 Isolamento dos fungos: Os espécimes clínicos foram semeados em ágar Sabouraud dextrose adicionado de 0,05 mg.mL⁻¹ de cloranfenicol (Anexo 2a) e em ágar Sabouraud dextrose adicionado de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel®) (Anexo 2b). A semeadura foi em duplicata para cada tipo de meio. A incubação foi à temperatura ambiente e por um período de até 15 dias. Para o isolamento de leveduras lipofílicas, como a maioria das espécies de *Malassezia*, foi empregado meio de ágar Sabouraud dextrose adicionado de 0,05 mg.mL⁻¹ de cloranfenicol e azeite de oliva.

3.4.4 Identificação dos fungos: A identificação dos fungos filamentosos foi realizada através da “técnica do microcultivo em lâmina”, ou técnica de Riddel (Anexo 3) com utilização da solução de lactofenol e corante azul de algodão para observação das características **microscópicas** do fungo: como hifas, microconídeos e macroconídeos e outras estruturas típicas. A observação das características **macroscópicas** das colônias (cor, tamanho, textura, reverso da colônia e pigmentação do meio) também foi utilizada para auxiliar na identificação dos fungos filamentosos (Anexo 4a). Quando necessário houve complementação com provas bioquímicas e fisiológicas, como prova da urease, pigmentação no ágar batata (Anexo 2c, e), padrão de crescimento no meio BCP (Anexo 2f) e requerimentos nutricionais (Anexo 2d e Anexo 4b, c).

3.4.5 Critérios para diagnóstico de onicomicose causada por fungos filamentosos não-dermatófitos (GUPTA *et al.* 2000):

- (1) – Lesão da unha compatível com apresentação clínica de onicomicose;
- (2) – Observação de elementos fúngicos em preparação de KOH 20% em amostras de fragmentos de unha;
- (3) – Crescimento do mesmo fungo não-dermatófito, em duas amostras consecutivas do paciente com intervalo de pelo menos uma semana para cada amostra.

3.5 TESTES DE SUSCETIBILIDADE *in vitro* A DROGAS ANTIFÚNGICAS:

3.5.1 Meio de cultura: O meio usado para o teste de microdiluição foi RPMI com glutamina e sem bicarbonato de sódio: (Sigma, catálogo nº R-6504) com pH ajustado para 7.0 com MOPS (3-N-morpholine-propane sulfonic acid) e adicionado de 2% de glicose (Sigma-Aldrich) (Anexo 2g).

3.5.2 Fungos: Os testes de suscetibilidade foram realizados para 100 amostras de fungos filamentosos, 50 isolados do grupo dos dermatófitos: *Trichophyton interdigitale* (11 isolados), *Trichophyton rubrum* (39 isolados) e 50 isolados do grupo dos fungos filamentosos não-dermatófitos: *Fusarium oxysporum* (04 isolados), *Fusarium solani* (23 isolados), *Aspergillus fumigatus* (2 isolados), *Aspergillus terreus* (2 isolados), *Aspergillus niger* (4 isolados), *Scytalidium dimidiatum* (12 isolados), *Curvularia* spp. (1 isolado), *Aureobasidium* spp. (1 isolado), *Scedosporium* spp. (1 isolado).

3.5.3 Agentes Antifúngicos: Para cada isolado foram testadas sete drogas, obtidas na forma de pó das respectivas indústrias farmacêuticas: Fluconazol (Pfizer), Cetoconazol e Itraconazol (Janssen-Cilag), Terbinafina (Pratti, Donaduzzi & Cia LTDA), Miconazol (Medley SA Indústria farmacêutica), Ciclopirox (SBL Laboratórios Stiefel LTDA) e Griseofulvina (AstraZeneca do Brasil). Todas as drogas cetoconazol (CTC), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC), miconazol (MCZ), griseofulvina (GRI),

terbinafina (TRB) e ciclopirox (CLX) foram dissolvidas em 100% de dimetil sulfóxido para se obter as soluções estoques de 2.000µg/mL para CTC e CLX; 1.000µg/mL para ITC e TRB; 1.600µg/mL para MCZ e 5.000µg/mL para GRI e FLC. As soluções estoques foram armazenadas, em pequenas alíquotas, a -20°C até serem utilizadas. A concentração inibitória mínima para FLC, CTC, ITC e TRB foram determinadas pelo método da microdiluição em caldo RPMI 1640 de acordo com o protocolo aprovado pelo CLSI - M38-A (CLSI, 2002). MCZ, CLX e GRI, de acordo com KORTING *et al.*, 1995 e SANTOS *et al.*, 2006. As concentrações finais das drogas foram ajustadas para as faixas de 0,125µg/mL a 64µg/mL para FLC, TRB e GRI; de 0,015µg/mL a 8µg/mL para CTC; de 0,03µg/mL a 16µg/mL para MCZ, 0,007 a 4 µg/mL para ITR e de 0,0035 a 2µg/mL para CLX (KORTING *et al.*, 1995; CLSI, 2002; GUPTA & KOHLI, 2003c).

3.5.4 Preparação do inóculo: Para a execução do teste, os isolados de onicomicoses foram previamente cultivados em ágar Sabouraud dextrose e repicados para tubos com ágar batata dextrose (ABD) (Anexo 2c), e mantidos na temperatura ambiente durante um período de 7 a 15 dias para os fungos dermatófitos e isolados de *Scedosporium* spp., *Curvularia* spp. e *Aureobasidium* spp. Os demais fungos filamentosos não-dermatófitos, foram mantidos incubados por um período de 2 a 3 dias (INGROFF *et al.*, 1997; GUARRO *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2001; ALIO *et al.*, 2005; LASS-FLORL *et al.*, 2006). Após incubação, as colônias dos fungos cultivados em ABD foram cobertas com aproximadamente 5 mL de água destilada com 0,05% de Tween 80 e raspadas com alça. Esta suspensão contendo conídios e fragmentos de hifas foi aspirada com pipeta de Pasteur e transferida para um tubo estéril. As estruturas fúngicas mais pesadas foram decantadas durante repouso de quinze a vinte minutos e a parte superior da suspensão foi transferida para novo tubo estéril e homogeneizada com auxílio de Vórtex (NORRIS *et al.*, 1999; CLSI, 2002). As leituras de densidade ótica desta suspensão foram realizadas em espectrofotômetro (CELM E 225-D) no comprimento de onda de 530 nanômetros, obtendo-se leituras de transmissão entre 80 e 85% ($T_{80-85\%}$) ou leituras de transmissão entre 65 e 70% ($T_{65-70\%}$) para cada isolado testado (FERNANDEZ-TORRES *et al.*, 2001), ajustadas com adição de solução estéril de água destilada, à suspensão. A quantificação de conídeos dispersos

nessas suspensões, a serem usadas como inóculos, foi estimada por **duas** metodologias distintas:

A) Em hemocitômetro (Câmara de Neubauer): uma alíquota de cada suspensão obtida após ajuste no espectrofotômetro foi retirada para realizar a contagem de conídios em hemocitômetro (Marienfeld, Germany). A concentração final das suspensões foi expressa em nº de conídios/mL após ajuste com água destilada estéril acrescida de Tween 80 e o número de conídeos foi estabelecido na faixa de 1 a 4×10^6 conídeos/mL calculado em relação ao volume da suspensão analisado no hemocitômetro, de acordo com a fórmula abaixo. Após ajuste do inóculo, através de hemocitômetro, as suspensões foram diluídas na proporção de 1:50 no meio RPMI, estimando-se inóculos com concentração de 2×10^4 até 8×10^4 conídeos/mL (Anexo 5 a, b e c).

3.5.5 Cálculo para a concentração de conídeos no inóculo (conídeos/mL):

<p style="text-align: center;">Número de conídeos contados</p> <p>Conídeos por mL: $\frac{\text{Número de conídeos contados}}{\text{Superfície contada}(\text{mm}^2) \times \text{profundidade da câmara} \times \text{diluição}} \times 10^3$</p>
--

B) Em placas de ágar Sabouraud dextrose: A quantificação do número de conídeos após adição destes à placa de microdiluição foi obtida retirando-se 0,01mL da suspensão do poço “controle” (sem a droga), que foi diluída 1:1000 e semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose com auxílio de alça de Drigalskii. As placas foram incubadas a 35°C e observadas diariamente para verificar a presença de colônias do fungo. As colônias foram contadas assim que se tornaram visíveis (períodos de incubação variaram de 48 horas para fungos filamentosos não-dermatófitos e 7 dias para fungos dermatófitos). A contagem de UFC/mL permitiu determinar o número de conídeos viáveis contidos no inóculo adicionado ao poço-controle da placa de microdiluição (Anexo 6).

3.5.6 Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima “CIM”: Cada droga antifúngica foi distribuída, em diluições seriadas, nas colunas 1-10 de

microplacas de 96 poços (Anexo 7). Para o ensaio, foram adicionados 100 µL do inóculo em cada poço e as placas foram incubadas a 35°C sem agitação.

3.5.7 Controles: Para garantir a reprodutibilidade e acurácia do teste, em cada placa foram incluídos: controle positivo, representado pelo crescimento de cada isolado na ausência de droga, e controle negativo, que correspondeu somente ao meio de cultura para verificar sua esterilidade. Além disso, cepas-padrão de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Trichophyton rubrum* ATCC 40051 foram incluídas como controle das CIMs.

3.5.8 Interpretação: As CIM_s foram determinadas, após 48 horas de incubação para os fungos filamentosos não-dermatófitos e após 7 dias para os dermatófitos e alguns isolados de fungos filamentosos não-dermatófitos (*Scedosporium* spp., *Curvularia* spp. e *Aureobasidium* spp.), através da observação visual da inibição de crescimento em cada poço comparado com aquele do controle positivo (sem a droga) (INGROFF *et al.*, 1997; GUARRO *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2001; ALIO *et al.*, 2005; LASS-FLORL *et al.*, 2006). As CIM_s para as drogas foram definidas como as concentrações mais baixas das drogas que resultaram em 100% de inibição do crescimento do fungo. CIM_{50%} e CIM_{90%} foram definidas como as CIM_s capazes de inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

3.5.9 Determinação da inibição *in vitro* em macrodiluição: Paralelamente foram selecionados dois isolados de *Scytilidium dimidiatum* e dois isolados de *Trichophyton rubrum* que foram semeados em erlenmeyers contendo 50 mL de caldo RPMI adicionados de duas concentrações diferentes das drogas antifúngicas: miconazol (0,5 µg/mL e 16µg/mL), itraconazol (0,25 µg/mL e 4 µg/mL), ciclopirox (0,125 µg/mL e 2 µg/mL) e terbinafina (4 µg/mL e 64 µg/mL) para observar o crescimento dos fungos através da contagem de UFC em placa de ágar Sabouraud dextrose diariamente, durante o período de 24 a 96 horas para os dois isolados de *Scytilidium dimidiatum* e 72 a 168 horas para as amostras de dermatófitos, com incubação em shaker com 200 rotações por minuto e temperatura ajustada para 35°C. O controle deste teste foi a contagem das UFC das quatro amostras em meio sem adição de droga (Anexo 8 a,b).

4 - RESULTADOS

No período de 12/03/2004 a 14/08/2008 foram avaliados no Laboratório de Diagnóstico Micológico/Departamento de Patologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 1.008 pacientes que apresentavam lesões sugestivas de dermatomicoses, sendo 37,7% do sexo masculino e 62,3% do sexo feminino (Figura 1).

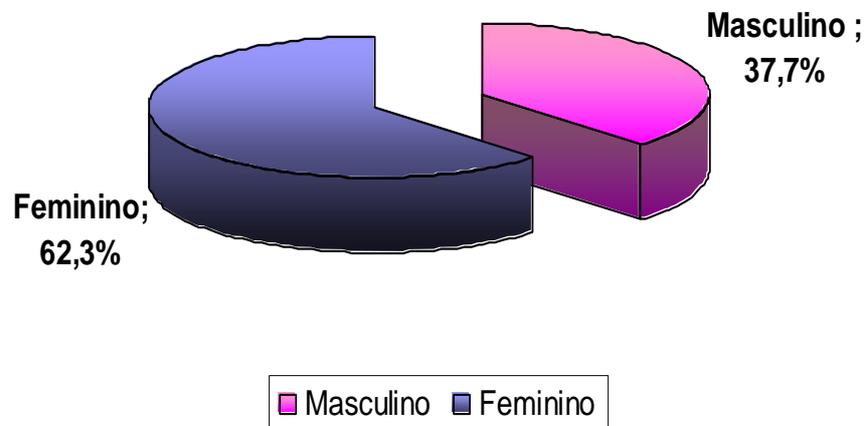


Figura 1: Distribuição dos pacientes com suspeita clínica de dermatomicose de acordo com o sexo.

Desse total de pacientes foram obtidas 1.245 amostras clínicas de lesões de pele, couro cabeludo e unhas, das quais 69% (863/1245) apresentaram resultado positivo para fungos no exame direto. Amostras clínicas com exame direto positivo e cultura negativa para fungos corresponderam a 10,7% (133/1245), enquanto as amostras com exame direto e cultura positivos para fungos corresponderam a 58,6% (730/1245) (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados gerais dos exames micológicos realizados para o diagnóstico das dermatomicoses.

Cultura p/ fungos	Exame Microscópico Direto					
	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
POSITIVO	730	58,6%	1	0,1%	731	58,7%
NEGATIVO	133	10,7%	381	30,7%	514	41,4%
TOTAL	863	69,3%	382	30,8%	1245	100%

Sensibilidade = 84,59%

Especificidade = 99,74%

4.1 ETIOLOGIA DAS DERMATOMICOSSES:

A frequência do grupo de fungos envolvidos na etiologia das dermatomicoses em geral foi 50,3% de leveduras (367/730), 34,4% de dermatófitos (251/730) e 15,3% de filamentosos não-dermatófitos (112/730) (Figura 2).

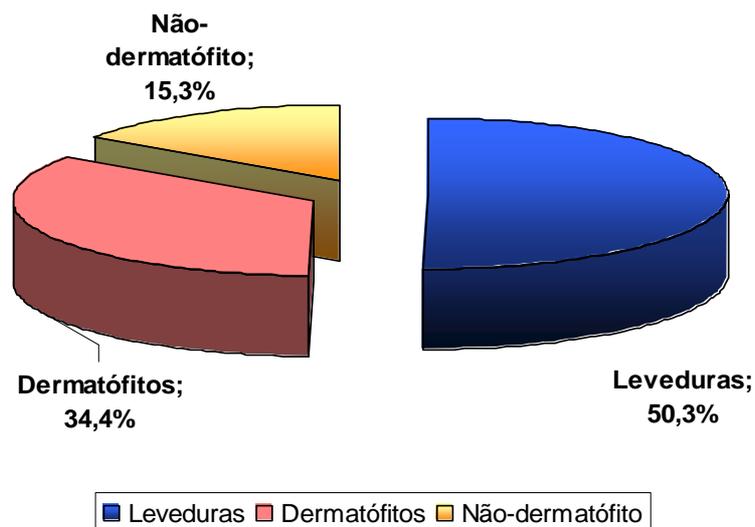


Figura 2: Distribuição do grupo de fungos isolados dos casos de dermatomicoses.

Entre os fungos dermatófitos, a espécie *T. rubrum*, apresentou maior freqüência, correspondendo a 69,3% dos isolamentos, as demais espécies estão representadas na Tabela 2. O grupo de leveduras foi constituído pelos gêneros *Candida* spp.: 52,3% (192/367), *Malassezia* spp.: 43,0% (158/367) e *Trichosporon* spp.: 4,6% (17/367) (Tabela 3). Entre os fungos filamentosos não-dermatófitos, o que apresentou maior freqüência foi *Fusarium* spp. com 52,7% (59/112). Os demais agentes estão representados na Tabela 4.

O sítio anatômico mais freqüentemente envolvido nas dermatomicoses, em geral, foi a unha com freqüência de 43,1% (Figura 3), sendo que os fungos dermatófitos e leveduras, predominaram em lesões no corpo (31,1% e 31,3%, respectivamente) enquanto, fungos filamentosos não-dermatófitos atingiram mais as unhas dos pés, com freqüência de 59% (Tabelas 2, 3, e 4).

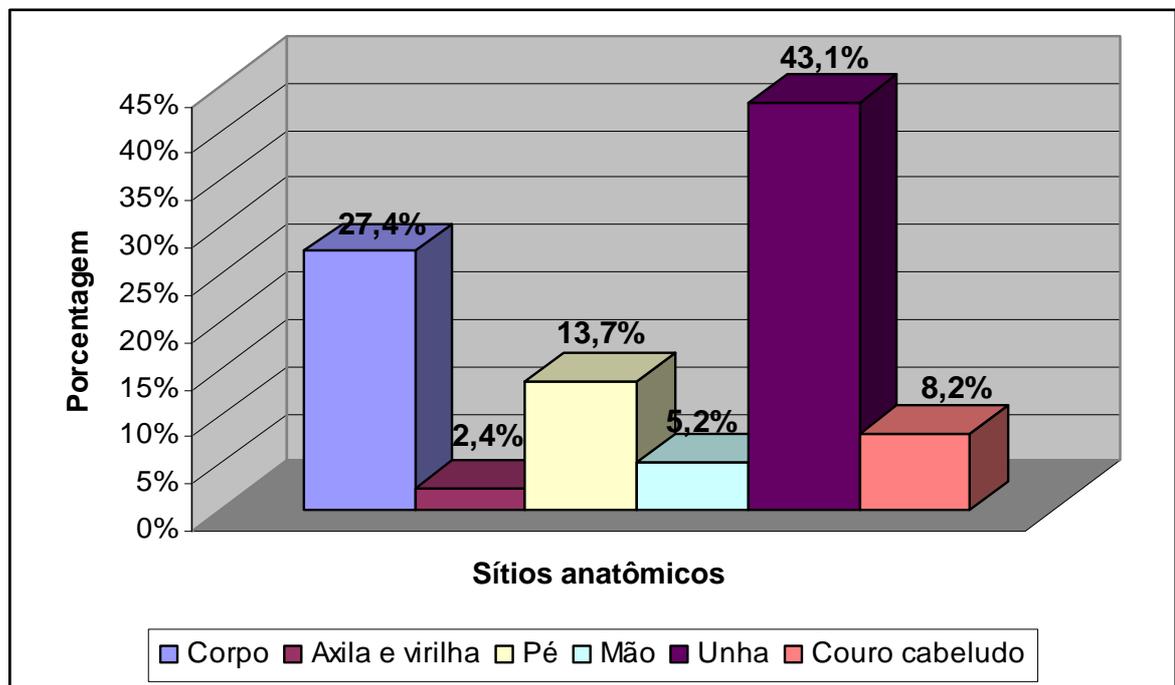


Figura 3: Freqüência (%) dos sítios anatômicos diagnosticados com dermatomicoses.

Tabela 2: Frequência (%) de fungos dermatófitos com relação à localização da lesão e sexo do paciente.

Local da lesão	Virilha e axila		Pé		Corpo		Mão		Unha (pé)		Unha (mão)		Couro cabeludo		Total
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
T. rubrum	7	3	22	21	44	16	8	8	15	12	12	4	2	0	174 (69,3%)
T.interdigitale	0	0	8	16	3	3	1	0	2	8	1	0	1	1	45 (18,0%)
M. canis	0	0	0	0	3	5	0	0	0	0	0	0	7	6	21 (8,4%)
T. tonsurans	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	5 (2,0%)
E. floccosum	0	0	2	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	5 (2,0%)
M. gypseum	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,4%)
Total	10 (3,9%)		71 (28,3%)		78 (31,1%)		17 (6,8%)		39 (15,5%)		17 (6,8%)		19 (7,6%)		251 (100%)

Tabela 3: Frequência (%) de leveduras com relação à localização da lesão e sexo do paciente.

Local da lesão	Virilha e axila		Pé		Corpo		Mão		Unha (pé)		Unha (mão)		Couro cabeludo		Total
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
Candida spp.	3	1	3	6	0	2	3	12	10	58	18	76	0	0	192 (52,3%)
Malassezia spp.	1	2	0	1	53	60	1	1	0	0	0	0	12	27	158 (43,0%)
Trichosporon spp.	0	0	1	1	0	0	0	2	1	4	2	5	0	1	17 (4,6%)
Total	7 (1,9%)		12 (3,3%)		115 (31,3%)		19 (5,2%)		73 (19,9%)		101 (27,5%)		40 (10,9%)		367 (100%)

Tabela 4: Frequência (%) de fungos filamentosos não-dermatófitos em relação à localização da lesão e sexo do paciente.

Local da lesão	Virilha e axila		Pé		Corpo		Mão		Unha (pé)		Unha (mão)		Couro cabeludo		Total
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<i>Fusarium</i> spp.	0	0	2	1	0	0	1	0	6	36	3	10	0	0	59 (52,7%)
<i>Scytalidium</i> spp.	0	0	2	4	0	0	0	0	6	7	1	0	0	0	20 (17,9%)
<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	1	0	0	0	0	0	5	2	3	2	0	0	13 (11,6%)
<i>Scedosporium</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1 (0,9%)
<i>Cladosporium</i> spp.	0	0	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8 (7,1%)
<i>Curvularia</i> spp.	0	0	1	1	2	1	1	0	1	1	0	0	1	0	9 (8,0%)
<i>Aureobasidium</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1 (0,9%)
<i>Paecilomyces</i> spp.	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,9%)
Total	0%		17 (15,2%)		7 (6,2%)		2 (1,8%)		66 (59,0%)		19 (17,0%)		1 (0,8%)		112 (100%)

4.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ONICOMICOSSES

Dos 1.008 pacientes, 408 apresentaram lesões sugestivas de onicomicose, sendo 98 (24%) do sexo masculino e 310 (76%) do sexo feminino (proporção 1:3,1). Entretanto, somente 333 destes pacientes apresentaram onicomicose confirmada pelo exame direto positivo, sendo 89 (26,6%) do sexo masculino e 244 (73,4%) do sexo feminino (proporção de 1:2,7).

Um total de 467 amostras clínicas foram obtidas das unhas das mãos e/ou dos pés de pacientes com suspeita clínica de onicomicose e a confirmação laboratorial foi estabelecida por exame direto e cultura positiva para fungos em 313 (67,0%) dos casos. Exame direto positivo e cultura negativa para fungos corresponderam a 14,8% (69/467), enquanto as amostras clínicas com exame direto e cultura negativos para fungos foram de 18,2% (85/467) (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados dos exames micológicos para pacientes com suspeita de onicomicoses.

Cultura p/ fungos	Exame Microscópico Direto					
	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
POSITIVO	313	67,0%	0	0,0%	313	67,0%
NEGATIVO	69	14,8%	85	18,2%	154	33,0%
TOTAL	382	81,8%	85	18,2%	467	100%

Sensibilidade = 81,94% Especificidade = 100%

Relacionando-se sexo, local da lesão e fungo isolado em cultura, tem-se que, no geral, as unhas dos pés foram mais atingidas do que as unhas das mãos com valores de 53,8% e 31,0%, respectivamente, enquanto 15,2% dos pacientes apresentaram ambas as unhas das mãos e dos pés afetadas (Figura 4).

Nas mulheres, verificou-se maior frequência de leveduras (143/227 – 63,0%), seguida pelos fungos filamentosos não-dermatófitos (60/227 – 26,4%), e por último os fungos dermatófitos (24/227 – 10,6%); já nos homens, verificou-se maior frequência de leveduras (31/86 – 36,0%), seguido pelos fungos dermatófitos (30/86 – 34,9%) e fungos filamentosos não-dermatófitos (25/86 – 29,1%) (Tabela 6).

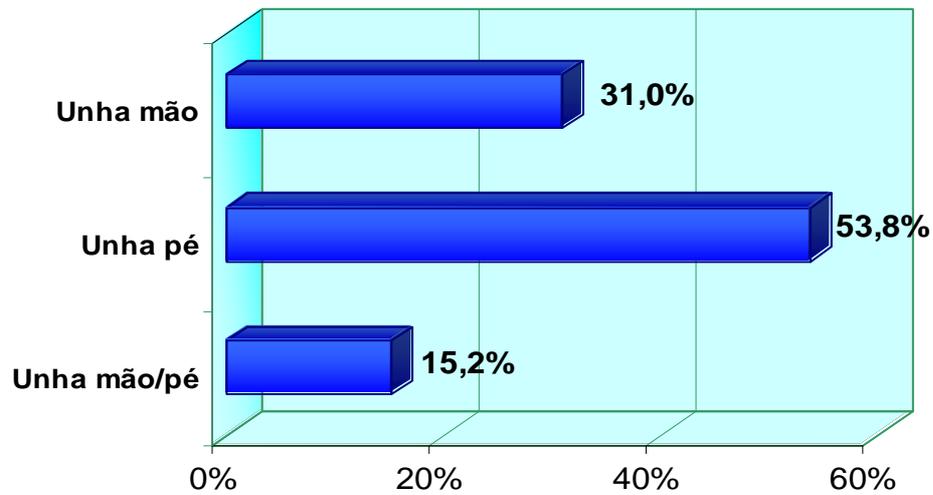


Figura 4: Distribuição das onicomicoses de acordo com a unha envolvida.

Tabela 6: Distribuição dos grupos de fungos agentes de onicomicoses em relação ao sexo do paciente e unha envolvida.

	Sexo					
	Feminino			Masculino		
	Unha pé	Unha Mão	Total	Unha pé	Unha Mão	Total
	N	N	N (%)	N	N	N (%)
Dermatófitos	21	3	24 (10,6%)	17	13	30 (35%)
Leveduras	64	79	143 (63,0%)	11	20	31 (36%)
não-dermatófitos	47	13	60 (26,4%)	18	7	25 (29%)
Total	132 (58%)	95 (42%)	227(100%)	46 (47%)	40 (53%)	86 (100%)

No geral, os grupos de fungos mais isolados de onicomicoses foram: leveduras 55,6% (174/313), fungos filamentosos não-dermatófitos 27,1% (85/313) e dermatófitos 17,3% (54/313) (Figura 5).

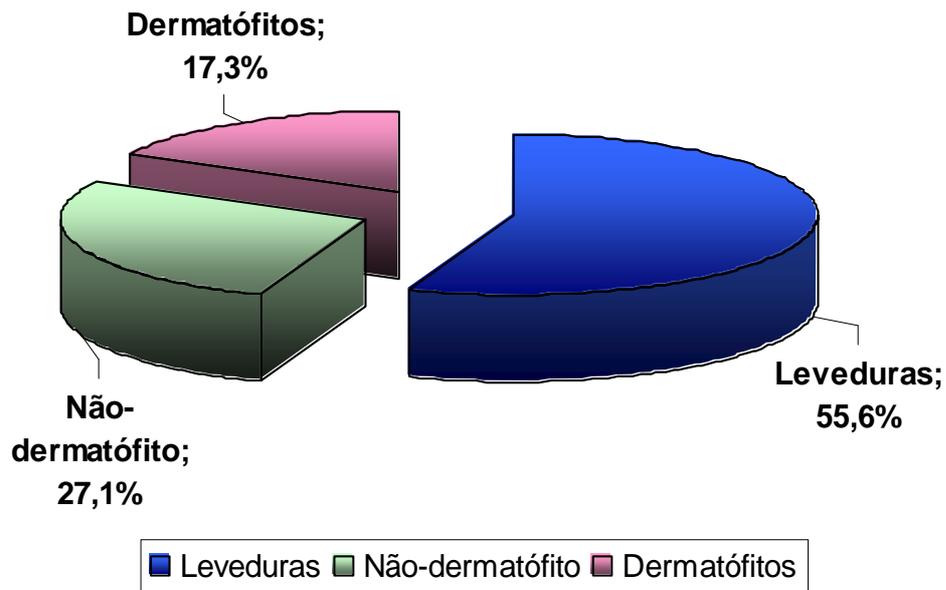


Figura 5: Distribuição dos grupos de fungos relacionados com a etiologia das onicomicoses.

Entre os dermatófitos, *T. rubrum* foi a espécie mais freqüente correspondendo a 13,4% dos isolados, enquanto para as leveduras, o gênero *Candida* foi a mais freqüente, correspondendo a 52,1% dos isolados, já os fungos filamentosos não-dermatófitos o gênero *Fusarium* foi o mais isolado com freqüência de 17,6%, excedendo o valor encontrado para *T. rubrum* (Tabela 7).

Tabela 7: Frequências dos agentes fúngicos relacionados com as onicomicoses nos pacientes com cultura positiva para fungos.

Grupos	Fungos	Frequências	
		N	%
Dermatófitos (espécies)	<i>T. rubrum</i>	42	13,4%
	<i>T. interdigitale</i>	11	3,5%
	<i>E. floccosum</i>	1	0,3%
	Total	54	17,0%
Leveduras (gêneros)	<i>Candida</i> spp.	163	52,1%
	<i>Trichosporon</i> spp.	11	3,5%
	Total	174	55,6%
Filamentosos não-dermatófitos (gêneros)	<i>Fusarium</i> spp.	55	17,6%
	<i>Scytalidium</i> spp.	14	4,5%
	<i>Aspergillus</i> spp.	12	3,8%
	<i>Curvularia</i> spp.	2	0,6%
	<i>Aureobasidium</i> spp.	1	0,3%
	<i>Scedosporium</i> spp.	1	0,3%
Total	85	27,2%	
Total geral		313	100%

Com relação ao diagnóstico laboratorial das onicomicoses causadas por fungos dermatófitos, observou-se no exame direto, que todas as amostras clínicas apresentaram hifas hialinas septadas, regulares e com artroconídeos, estruturas relacionadas às infecções por dermatófitos. Em todos os casos de onicomicoses causadas por fungos filamentosos não-dermatófitos, observou-se no exame direto, estruturas fúngicas sugestivas deste grupo de fungos: nas infecções causadas por *Scytalidium dimidiatum* foi observada a presença de hifas demáceas septadas, já para os fungos do gênero *Fusarium* e *Aspergillus*, foi observada a presença de hifas hialinas septadas, em angulação de 45°, sem artroconídeos (Anexo 9 a e b).

4.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE

Foram testadas 100 amostras de fungos filamentosos isolados de casos de onicomicoses, correspondendo a 50 isolados de dermatófitos (39 *T. rubrum* e 11 *T. interdigitale*) e 50 isolados de fungos filamentosos não-dermatófitos (12 *Scytalidium dimidiatum*, 4 *Fusarium oxysporum*, 23 *Fusarium solani*, 4 *Aspergillus niger*, 2 *Aspergillus terreus*, 2 *Aspergillus fumigatus*, 1 *Scedosporium* spp., 1 *Curvularia* spp., e 1 *Aureobasidium* spp.) para realização dos testes de suscetibilidade a drogas antifúngicas. Todos os dermatófitos testados produziram crescimento detectável depois de sete dias de incubação e os fungos filamentosos não-dermatófitos, depois de 48 horas, com exceção dos gêneros *Scedosporium* spp., *Curvularia* spp. e *Aureobasidium* spp., que requereram sete dias de incubação para visualização do seu crescimento no poço sem a droga (controle positivo). O crescimento das cepas-controles *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Trichophyton rubrum* (ATCC 40051) para as drogas testadas foi dentro das CIM_s esperadas.

A Tabela 1 (Anexo 10a) resume as faixas de variações dos valores das CIM_s (µg/mL) para sete drogas antifúngicas frente aos 50 isolados de fungos dermatófitos. As CIMs necessárias para inibir os dermatófitos distribuíram-se dentro de uma ampla faixa de concentrações de drogas com exceção da terbinafina (0,125-0,5) e ciclopirox (0,0035-0,015), mas foram praticamente equivalentes quando se comparou as espécies *T. interdigitale* e *T. rubrum* entre si.

A Tabela 2 (Anexo 10b) apresentam as faixas de variações dos valores das CIM_s (µg/mL) de sete drogas antifúngicas frente aos 50 isolados de fungos filamentosos não-dermatófitos. Nenhum dos isolados foi inibido *in vitro* pelas drogas fluconazol e griseofulvina (CIM \geq 64). A Tabela 8 compara as faixas das CIM_s (µg/mL) de sete drogas antifúngicas frente aos 100 isolados de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos. Foi possível observar que as variações das CIM_s dos antifúngicos testados frente aos fungos dermatófitos distribuíram-se dentro de faixas mais amplas de variação que as CIM_s observadas para os fungos filamentosos não-dermatófitos.

Tabela 8: Faixas de variações das CIM_s (µg/mL) de sete antifúngicos frente às 100 isolados de fungos filamentosos.

Fungos filamentosos					
DROGA	Dermatófitos		Não-dermatófitos		
	<i>Trichophyton</i> spp. (50)	<i>Scytalidium</i> spp. (12)	<i>Fusarium</i> spp. (27)	<i>Aspergillus</i> spp. (8)	Outros* (3)
Fluconazol (0,125-64)	0,5-≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
Cetoconazol (0,015-8)	0,03-≥ 8	0,25-≥ 8	2-≥ 8	0,5-≥ 8	≥ 8
Itraconazol (0,007-4)	0,015-1	1-≥4	0,5-≥ 4	0,25-≥ 4	0,25-≥ 64
Miconazol (0,03-16)	0,03-1	0,125-2	0,125-≥16	0,25-2	1-≥16
Ciclopirox (0,0035-2)	0,0035-0,015	0,007-0,06	0,015-0,5	0,015-0,25	0,007-0,25
Terbinafina (0,125-64)	0,125-0,5	0,125-2	0,125-≥ 64	0,125-2	0,125-≥ 4
Griseofulvina (0,125-64)	0,125-64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64

*Outros: Fungos dos gêneros *Scedosporium*, *Curvularia* e *Aureobasidium*

Na Tabela 9, observa-se que os dermatófitos apresentaram, em geral, maior suscetibilidade às drogas testadas que os não-dermatófitos (Anexo 10 c e d). Entre estes, *Scytalidium* spp. e *Aspergillus* spp. foram os mais inibidos *in vitro* pelas drogas ciclopirox, miconazol e terbinafina. Para os demais gêneros, os valores das CIMs ultrapassaram as concentrações máximas testadas das drogas, com exceção de ciclopirox, que apresentou CIM_s menores para todos os fungos. *Aspergillus* spp. apresentou padrão de inibição semelhante ao do *Scytalidium*, além de boa inibição pelo itraconazol. Isolados de *Fusarium* spp. também foram inibidos por ciclopirox, mas, ao contrário, não apresentaram o mesmo padrão para demais drogas (Anexo 10d). Fungos dos gêneros *Scedosporium*, *Curvularia* e *Aureobasidium* também sofreram pouca inibição por todas as drogas antifúngicas testadas (Tabela 9). É evidente a eficácia da droga ciclopirox tanto na inibição dos fungos dermatófitos quanto dos não-dermatófitos. A terbinafina também apresentou um excelente padrão

de inibição para ambos os grupos de fungos, porém foi bem menos eficaz para os fungos filamentosos não-dermatófitos (Tabela 9).

Tabela 9: Comparações das CIMs de sete drogas antifúngicas necessárias para inibir 50% e 90% dos isolados de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos.

DROGAS		Fungos filamentosos				
		Dermatófitos		Não-dermatófitos		
		<i>Trichophyton</i> spp. (50)	<i>Scytalidium</i> spp. (12)	<i>Fusarium</i> spp. (27)	<i>Aspergillus</i> spp. (8)	Outros* (3)
Fluconazol	CIM 50%	8	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
	CIM 90%	32	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
Cetoconazol	CIM 50%	0,25	≥ 8	≥ 8	8	≥ 8
	CIM 90%	0,5	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≥ 8
Itraconazol	CIM 50%	0,125	≥ 4	≥ 4	0,5	≥ 4
	CIM 90%	0,5	≥ 4	≥ 4	1	≥ 4
Miconazol	CIM 50%	0,125	0,5	≥16	0,5	1
	CIM 90%	0,5	2	≥16	2	≥16
Ciclopirox	CIM 50%	0,007	0,015	0,25	0,015	0,007
	CIM 90%	0,015	0,015	0,5	0,06	2
Terbinafina	CIM 50%	0,125	0,25	16	0,25	0,25
	CIM 90%	0,125	1	≥ 64	1	≥ 64
Griseofulvina	CIM 50%	2	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
	CIM 90%	4	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64

*Outros: Fungos dos gêneros *Scedosporium*, *Curvularia* e *Aureobasidium*

As representações gráficas apresentadas na Figura 6 trazem uma visão mais clara dos efeitos das drogas antifúngicas sobre os fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos. Observa-se que fungos filamentosos não-dermatófitos apresentaram CIM_s mais elevadas para as drogas fluconazol e griseofulvina, para as quais, os 50 isolados cresceram até nas maiores concentrações testadas. Este grupo de fungos também apresentou pouca suscetibilidade às drogas itraconazol e cetoconazol, onde 43 e 48 dos isolados cresceram nas maiores concentrações testadas para estas drogas, respectivamente. O miconazol demonstrou-se relativamente eficaz para os fungos dermatófitos. A terbinafina e o ciclopirox, como já mencionado, demonstraram elevada eficácia contra os fungos dermatófitos, porém foram menos eficazes para os fungos filamentosos não-dermatófitos.

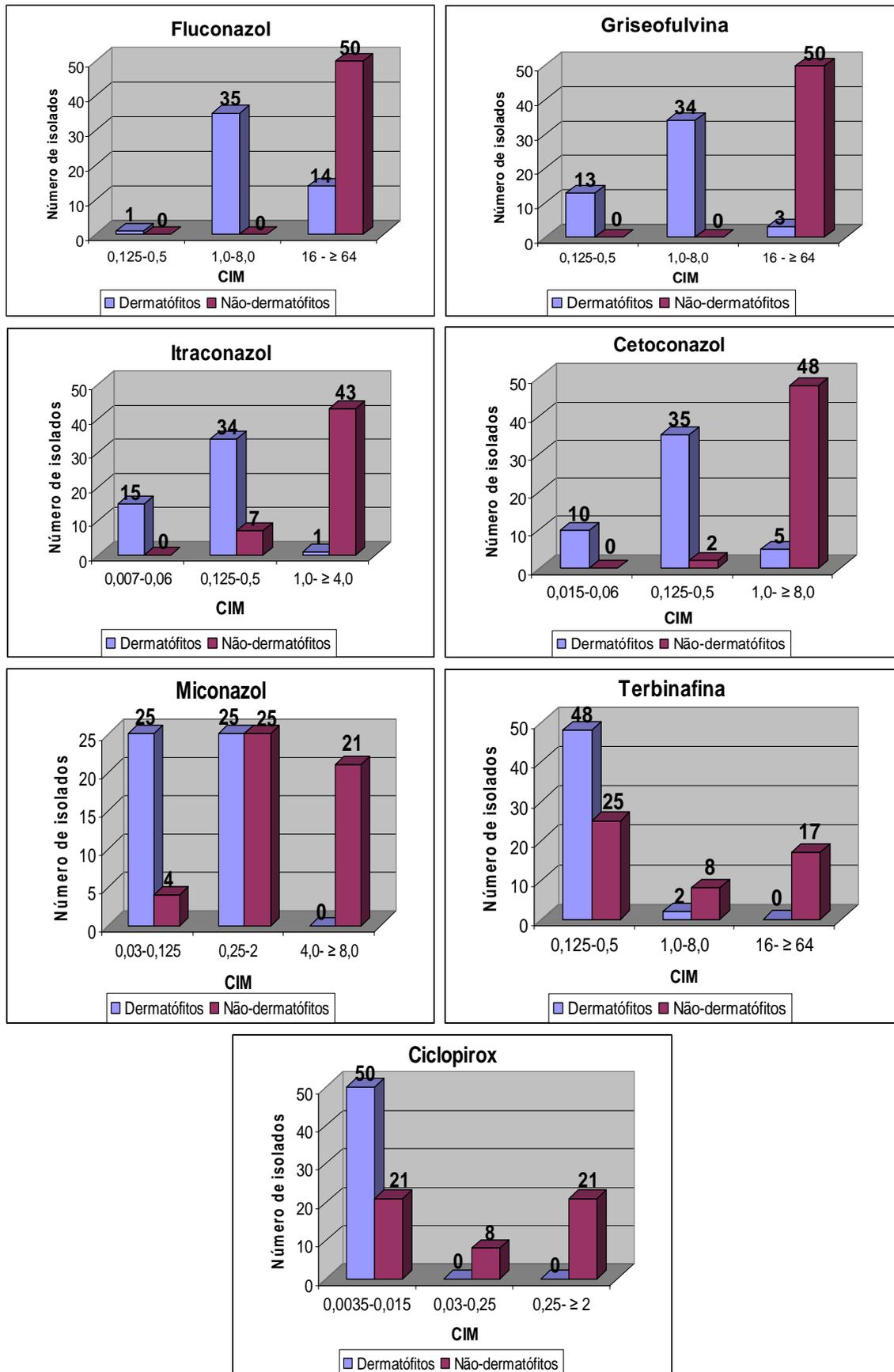


Figura 6: Distribuição das CIM_s para sete drogas antifúngicas testadas contra 50 isolados de dermatófitos e 50 isolados de fungos filamentosos não-dermatófitos.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO

Para melhor avaliação da padronização do teste de suscetibilidade a drogas antifúngicas, além do acerto dos inóculos por transmitância, foram também realizadas contagens dos conídeos em hemocítmetro e das UFC/mL em placas de ágar Sabouraud dextrose. As comparações entre os valores das transmitâncias com o número estimado de conídeos/mL e de UFCs/mL, estão representadas na tabela 10 (Anexo 11). Observou-se menor número de UFC em relação ao número de conídeos, demonstrando que algumas das estruturas observadas no hemocítmetro não estavam viáveis, conferindo maior confiabilidade aos valores de UFC.

Tabela 10: Comparações entre faixas de transmitância dos nº de conídeos/mL e de UFC_s/mL observadas para os 100 isolados de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos.

Grupo de fungo	Gênero/espécie	Valores de T%	Nº de conídeos/mL	Nº de UFC _s /mL
Dermatófitos	<i>T. rubrum</i> (n=39)	65,2 - 85,3	$1,0 \times 10^4 - 9,9 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3 - 7,1 \times 10^4$
	<i>T. interdigitale</i> (n=11)	65,6 - 85,5	$1,03 \times 10^4 - 1,32 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3 - 6,15 \times 10^4$
Não-dermatófitos	<i>Scytalidium</i> spp. (n=12)	65,0 - 70,7	$1,38 \times 10^4 - 2,98 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3 - 2,5 \times 10^4$
	<i>Fusarium</i> spp. (n=27)	64,9 - 70,7	$1,0 \times 10^4 - 3,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3 - 3,7 \times 10^4$
	<i>Aspergillus</i> spp. (n=8)	65,2 - 85,5	$1,42 \times 10^4 - 1,02 \times 10^5$	$3,5 \times 10^3 - 6,0 \times 10^4$
	Outros (n=3)	68,3 - 82,5	$1,17 \times 10^4 - 1,75 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3 - 3,3 \times 10^4$

*Outros: Fungos dos gêneros *Scedosporium*, *Curvularia* e *Aureobasidium*.

4.5 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO *in vitro* ATRAVÉS DA MACRODILUIÇÃO

Através da macrodiluição em caldo foi possível testar a suscetibilidade *in vitro* de dois isolados selecionados de *S. dimidiatum* e dois de *T. rubrum*. O critério para

seleção destes isolados foi baseado nos valores das CIM_s encontradas, selecionando-se pares de isolados que apresentaram menores e maiores CIM_s para algumas drogas. Durante diferentes fases de crescimento fúngico, foram realizadas as contagens das UFC_s/mL permitindo construir curvas para comparar os valores das CIM_s obtidas em microdiluição com o padrão de crescimento dos fungos na presença das mesmas drogas antifúngicas, em macrodiluição.

Os inóculos dos isolados de *S. dimidiatum* corresponderam a concentração entre 2 a 8×10^4 (mesmas concentrações utilizadas para a microdiluição em placa), sendo que o inóculo do isolado 228 de *S. dimidiatum* foi ajustado para a concentração de $1,62 \times 10^6$ conídeos/mL, correspondendo a $1,62 \times 10^4$ UFC/mL e da amostra 066 para $2,36 \times 10^6$ conídeos/mL, correspondendo a $2,36 \times 10^4$ UFC/mL. No Anexo 12a, estão representados os valores das UFC/mL encontrados durante os quatro dias de incubação realizados em shaker com 200 rotações por minuto e temperatura ajustada para 35°C. A confecção das curvas de crescimento para os dois isolados de *S. dimidiatum* a partir da contagem do número de UFC/mL e sua comparação com os valores das CIM_s obtidos na microdiluição, demonstraram que houve concordância entre as curvas de crescimento e as CIM_s para o itraconazol e a terbinafina. A figura 7 demonstra que ambos os isolados de *S. dimidiatum* não foram inibidos nas concentrações $\geq 4\mu\text{g/mL}$, confirmando com as curvas de crescimento que demonstraram crescimento dos dois isolados na concentração $4\mu\text{g/mL}$. A droga terbinafina demonstrou ser muito efetiva para ambos os isolados nas duas técnicas utilizadas, inibindo ambos os isolados na concentração de $0,125\mu\text{g/mL}$ na microdiluição, confirmando com as curvas de crescimento, já que ambos os isolados foram inibidos na concentração de $4\mu\text{g/mL}$ (Figura 10). Já a comparação entre as CIM_s e as curvas de crescimento para as drogas miconazol e ciclopirox evidenciou discordâncias entre os dois resultados dos isolados de *S. dimidiatum*. Na microdiluição realizada para o miconazol, o isolado 066 foi inibido na concentração de $2\mu\text{g/mL}$, porém na curva de crescimento observou-se que a concentração de miconazol igual a $16\mu\text{g/mL}$ não inibiu totalmente o crescimento da amostra. Com relação ao isolado de *S. dimidiatum* 228 também houve discordância, pois na microdiluição houve inibição de 100% do crescimento na concentração de $0,5\mu\text{g/mL}$ e a mesma concentração na macrodiluição não inibiu o crescimento, que só foi atingido na concentração de $16\mu\text{g/mL}$ (Figura 8). A droga ciclopirox demonstrou

excelente ação na microdiluição, já que ambos os isolados foram inibidos na concentração de ciclopirox de 0,007 μ g/mL, porém nas curvas de crescimento obtidas para essa droga demonstraram que a concentração de ciclopirox 0,125 μ g/mL não exerceu efeito inibitório sobre os isolados, e as contagens das UFC/mL apresentaram-se praticamente as mesmas entre o controle e a suspensão contendo a concentração de ciclopirox 0,125 μ g/mL (Figura 9).

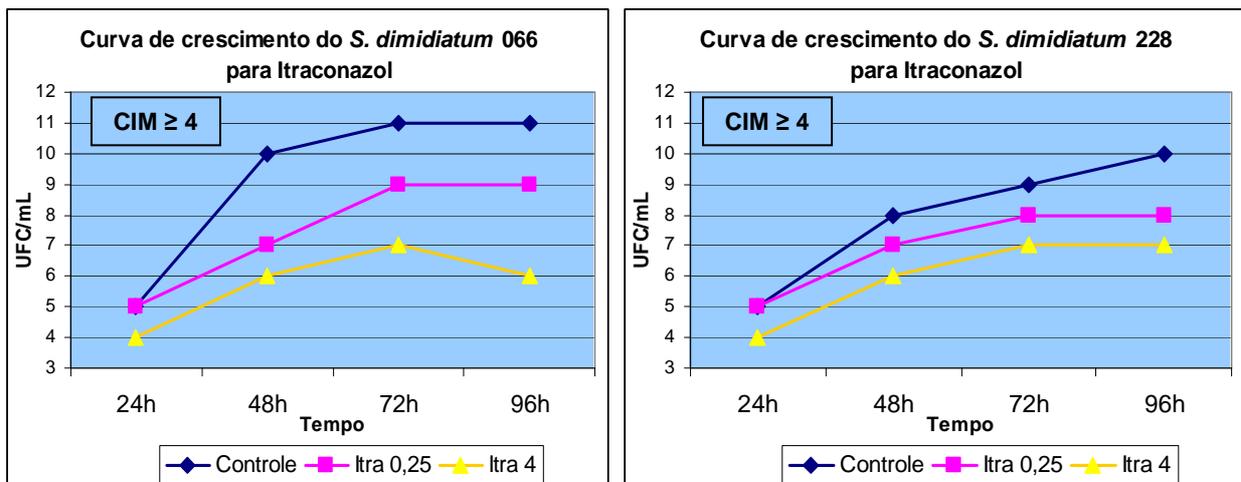


Figura 7: Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 066 e 228 de *S. dimidiatum*, na presença e ausência (controle) de itraconazol (Valores das CIM_s obtidas na microdiluição estão citados).

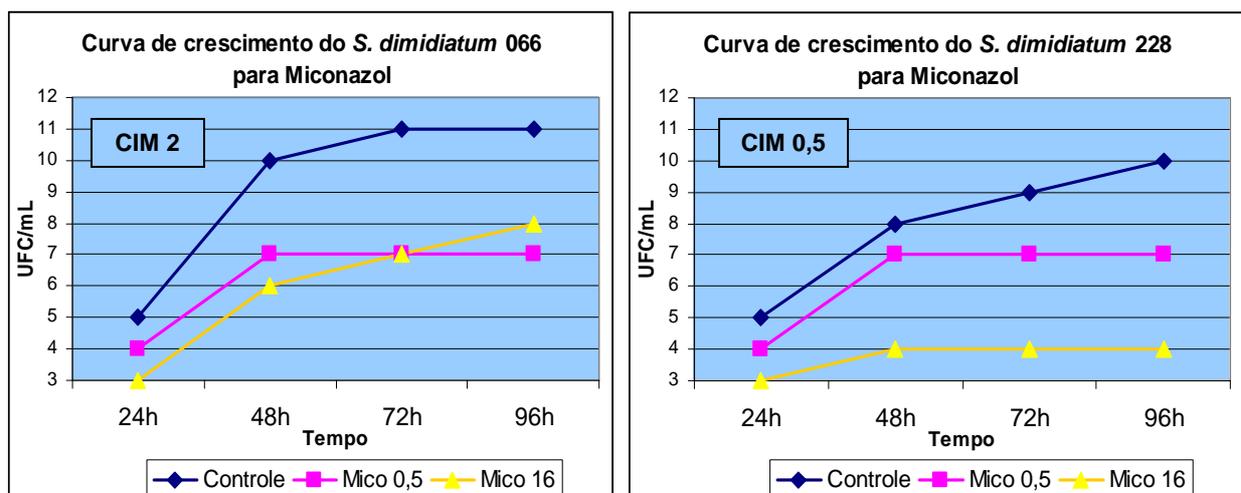


Figura 8: Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 066 e 228 de *S. dimidiatum*, na presença e ausência (controle) de Miconazol (Valores das CIM_s obtidas na microdiluição estão citados).

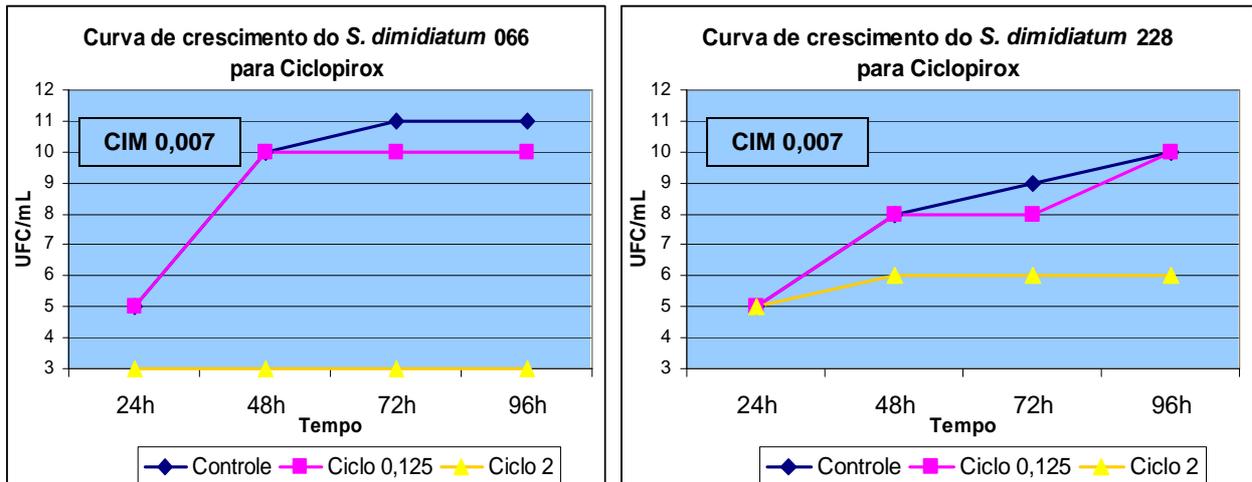


Figura 9: Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 066 e 228 de *S. dimidiatum*, na presença e ausência (controle) de ciclopirox (Valores das CIM_s obtidas na microdiluição estão citados).

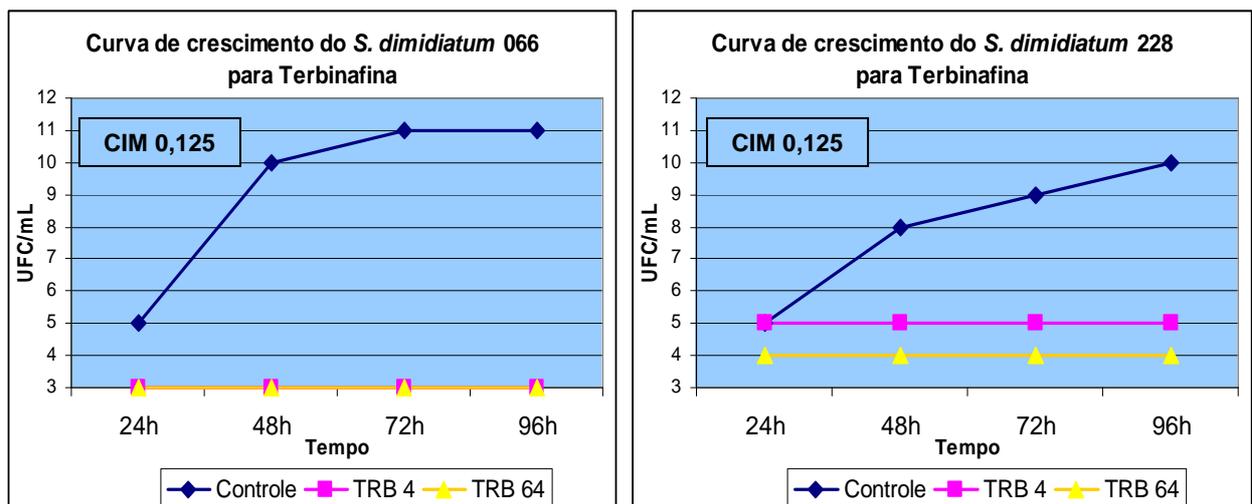


Figura 10: Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 066 e 228 de *S. dimidiatum*, na presença e ausência (controle) de terbinafina (Valores das CIM_s obtidas na microdiluição estão citados).

Da mesma forma, os inóculos dos isolados de *T. rubrum* corresponderam a concentração entre 2 a 8×10^4 conídeos/mL, mesmas concentrações utilizadas na microdiluição em placa, sendo que o inóculo do isolado 369 foi ajustado para a concentração de $2,26 \times 10^6$ conídeos/mL, correspondendo a $2,26 \times 10^4$ UFC/mL e o isolado 997, para a concentração de $2,35 \times 10^6$ conídeos/mL, correspondendo a $2,35 \times 10^4$ UFC/mL. No Anexo 12b, estão representados os valores das UFC/mL encontrados durante os sete dias de incubação realizados em shaker com 200 rotações por minuto e temperatura ajustada para 35°C, representados à

partir de 72 horas. A comparação entre as CIM_s obtidas na microdiluição e as curvas de crescimento para os dois isolados de *T. rubrum* (369 e 997) revelaram que as duas técnicas apresentaram resultados concordantes para todas as drogas, embora as drogas itraconazol, miconazol e ciclopirox tenha ocorrido crescimento para algumas diluições, este crescimento não ultrapassou a concentração inicial do inóculo que continha $2,26 \times 10^4$ UFC/mL e $2,35 \times 10^4$ UFC/mL para as amostras 369 e 997, respectivamente, podendo-se considerar que todas as drogas apresentaram efeito inibitório, como demonstrado pelas CIM_s obtidas na microdiluição (Figuras 11, 12, 13 e 14).

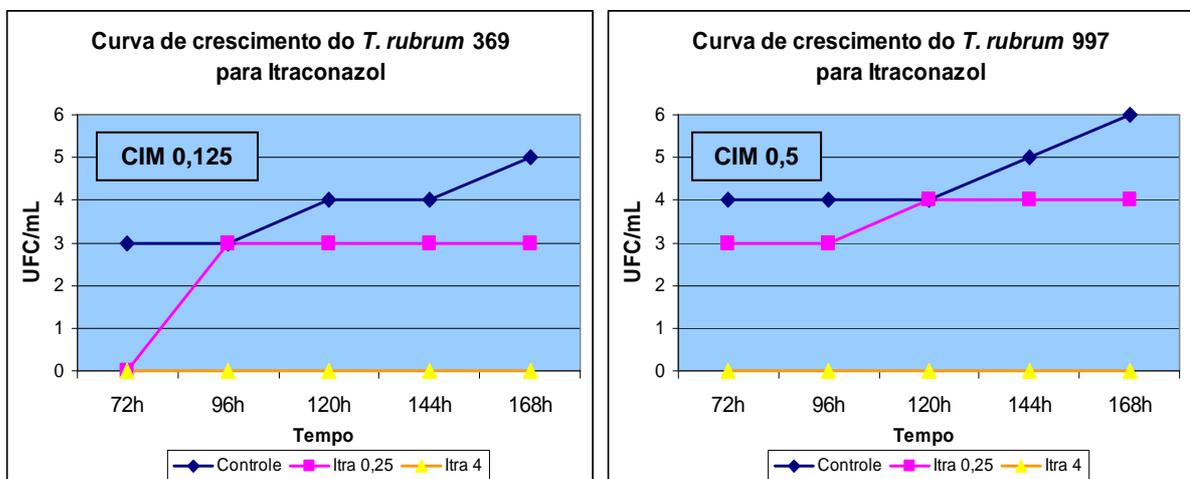


Figura 11: Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 369 e 997 de *T. rubrum*, na presença e ausência (controle) de itraconazol (Valores das CIM_s obtidas na microdiluição estão citados).

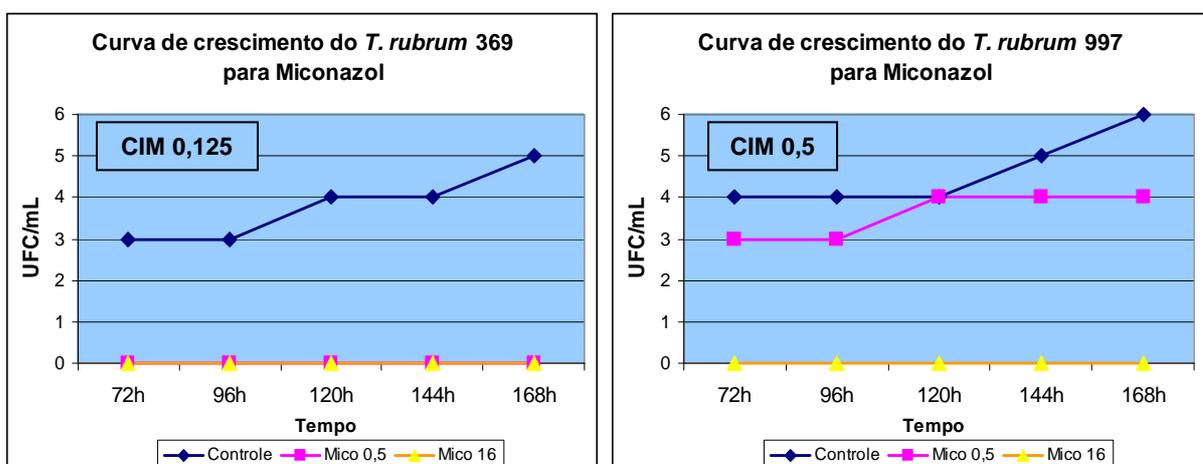


Figura 12: Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 369 e 997 de *T. rubrum*, na presença e ausência (controle) de miconazol (Valores das CIM_s obtidas na microdiluição estão citados).

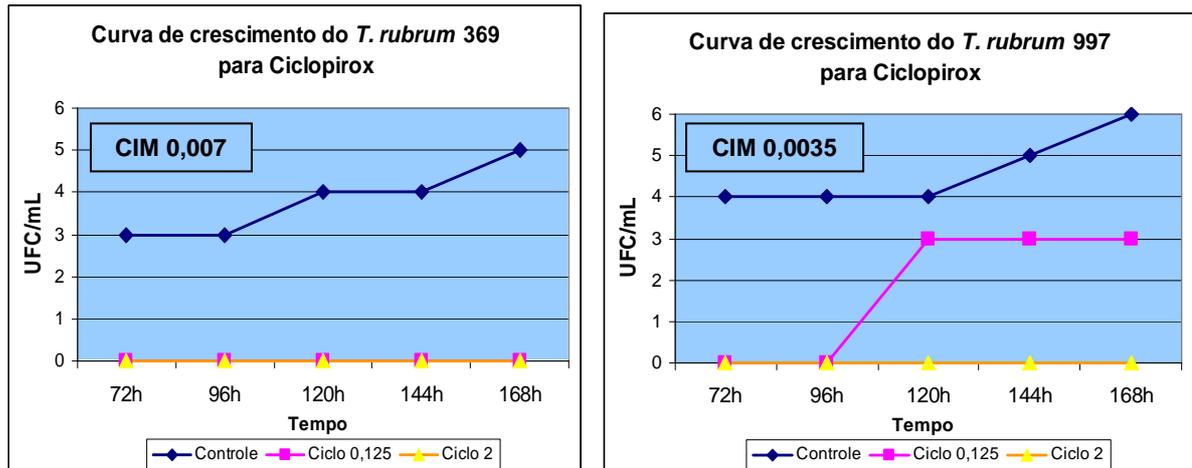


Figura 13: Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 369 e 997 de *T. rubrum*, na presença e ausência (controle) de ciclopirox (Valores das CIM_s obtidas na microdiluição estão citados).

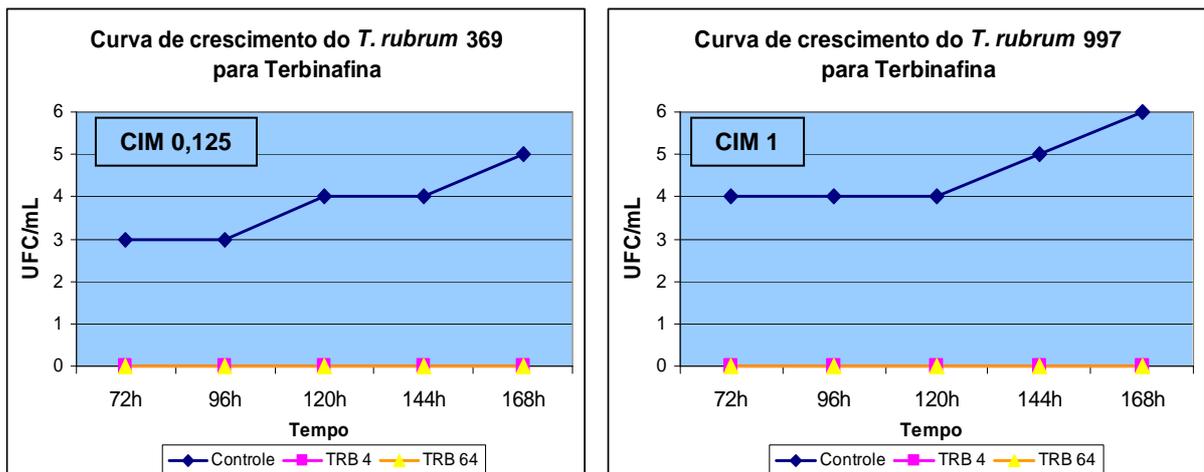


Figura 14: Curvas de crescimento (\log_{10} das UFC/mL X tempo h) dos isolados 369 e 997 de *T. rubrum*, na presença e ausência (controle) de terbinafina (Valores das CIM_s obtidas na microdiluição estão citados).

5 - DISCUSSÃO

As micoses ungueais correspondem a um total de 30% das micoses superficiais (MIGDLEY *et al.*, 1994). Neste estudo, 333 pacientes tiveram diagnóstico confirmado por exame direto positivo, correspondendo a 43,1% dos casos, dentre os 1.008 pacientes com suspeita de dermatomicose (Figura 3).

Um total de 467 amostras clínicas foram obtidas das unhas das mãos e dos pés de pacientes com suspeita de onicomicose. A confirmação laboratorial foi estabelecida por exame direto e cultura positiva para fungos em 313 amostras (67,0%). Amostras com exame direto positivo e cultura negativa para fungos corresponderam a 14,8% (69/467) (Tabela 5). A cultura para fungos apresentou uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 81,94% para o diagnóstico das onicomicoses. A explicação para a baixa sensibilidade obtida para as culturas pode ser explicada pela escassez ou ausência de elementos fúngicos viáveis nas amostras clínicas, provavelmente devido ao uso prévio de medicamentos antifúngicos, o que dificulta o crescimento do microrganismo em meios de cultura, mesmo após a suspensão do uso de medicamentos por um período superior a 15 dias. Outro fator pode ser a alta contaminação das culturas por bactérias que impedem o crescimento dos verdadeiros patógenos.

Os casos que apresentaram exame microscópico direto e cultura negativa para fungos corresponderam a 18,2% (85/467), este alto índice de resultados negativos em pacientes com lesões sugestivas de infecção ungueal fúngica, pode ser explicado pela presença de algumas enfermidades das unhas que podem simular onicomicoses, como psoríase, lichen plano, infecções bacterianas, tumores nas unhas, dermatite de contato, onicolise idiopática. Este fato ressalta a importância de um diagnóstico diferencial para estas doenças (ELEWISKI, 1998; LOPES & TORRES, 1999a; SEEBACHER *et al.*, 2007).

Tinea corporis foi a manifestação clínica mais freqüentemente ocasionada por fungos dermatófitos neste estudo, com uma freqüência de 31%, coincidindo com achados em países da Europa, como Espanha (PALACIO *et al.*, 1999) e Croácia (BABIC-ERCEG *et al.*, 2003). Um estudo na cidade do Cairo (Egito), porém revelou que a *Tinea capitis* foi a manifestação clínica mais comum, seguida pela *Tinea*

corporis (ZAKI *et al.*, 2008), já na Turquia, a *Tinea pedis* foi a manifestação mais freqüente, seguida pela *Tinea unguium* (OZKUTUK *et al.*, 2007). Estas diferentes freqüências de formas clínicas podem ser explicadas pela presença de diferentes fatores ambientais, sócio-econômicos e culturais entre as diferentes populações (OZKUTUK *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foi observada a maior freqüência de dermatófitos antropofílicos nas dermatofitoses, em especial, da espécie *T. rubrum* com freqüência de 69,3% (174/251), e confirmando com levantamentos realizados em outros países como Calicut (Índia) (BINDU & PAVITHRAN, 2002), Madrid (Espanha) (PALACIO *et al.*, 1999), Cidade do México (México) (HERNADEZ-SALAZAR *et al.*, 2007), Lanzhou (China) (TAO-XIANG *et al.*, 2005), Izmir (Turquia) (TUMBAY *et al.*, 1982), Rosário (Argentina) (LUQUE *et al.*, 1997), e em outros estados do Brasil, como Rio Grande do Sul (LOPES *et al.*, 1999b) e Goiás (COSTA *et al.*, 1999). Este fato pode estar relacionado ao processo de urbanização, já que em grandes centros urbanos há maior aglomeração de indivíduos e conseqüentemente, maior facilidade de disseminação do fungo, o que leva a predominância desta espécie como importante agente etiológico das dermatofitoses. Sabe-se também que esta espécie apresenta uma melhor adaptação ao tecido humano queratinizado, o que pode ser notado pela necessidade de um maior tempo de tratamento para obter a cura quando comparado a infecções causadas por dermatófitos zoofílicos e geofílicos.

T. interdigitale também está freqüentemente envolvido na etiologia das dermatofitoses sendo também uma espécie antropofílica e, neste estudo foi isolado em 17,9% (45/251) das dermatofitoses, correspondendo à segunda espécie de dermatófito mais isolada. Segundo ARENAS *et al.*, 2002 um estudo realizado no México com 1.957 pacientes, a freqüência de *T. rubrum* e *T. interdigitale* foi respectivamente, 60% e 17%, sendo valores próximos aos encontrados neste estudo. A freqüência de *Microsporum canis* entre as outras espécies de dermatófitos foi de 8,4% (21/251), correspondendo ao terceiro dermatófito mais isolado e responsável por 68,4% dos casos de *Tinea capitis*. A espécie *T. tonsurans* foi isolada, embora em baixa freqüência quando comparada com isolamentos em outras regiões do Brasil (DAMAZIO *et al.*, 2007), isso pode ser atribuído ao fato desta espécie ser mais adaptada às condições climáticas presentes na região Nordeste, onde há o relato de maior freqüência dessa espécie. A Tabela 11 apresenta dados

referentes à frequência de dermatófitos em algumas regiões do Brasil, destacando a alta frequência de *T. tonsurans* em Fortaleza, CE e em Pernambuco (PE).

Tabela 11: Frequências de espécies de dermatófitos em algumas regiões do Brasil.

Região	<i>T.rubrum</i>	<i>T. interdigilate</i>	<i>E.floccosum</i>	<i>T.tonsurans</i>	<i>M. canis</i>	<i>M.gypseum</i>
MEZZARI, 1998 (Porto Alegre, RS)	68.3%	18.7%	2.43%	0%	8.7%	1.8%
COSTA, 1999 (Goiânia, GO)	37,4%	36,4%	3,6%	5,9%	16,0%	0,6%
CHINELLI, 2003 (São Paulo, SP)	48.7%	9,7%	4,1%	13,8%	20,9%	2,5%
BRILHANTE, 2004 (Fortaleza, CE)	4,41%	1,47%	0,0%	54,41%	38,97%	0.74%
SIQUEIRA, 2006 (Ribeirão Preto, SP)	84,2%	15,8%	0%	0%	0%	0%
DAMAZIO, 2007 (Pernambuco, PE)	26,7%	18%	6,4%	26,2%	18,5%	2,7%
MAIFREDE, 2009 (Vitória, ES)	69,3%	17,9%	2,0%	2,0%	8,4%	0,4%

Dentre as leveduras, o gênero *Candida* foi o mais frequentemente isolado, com frequência de 52,3% (192/367), sendo as unhas das mãos femininas o sítio anatômico mais envolvido por esse agente etiológico. O gênero *Malassezia* foi isolado em 43,1% (158/367) e as regiões mais afetadas foram àquelas próximas ao couro cabeludo, como o tronco e face, pois como descrito na literatura, o couro cabeludo é o reservatório dessa espécie (FURTADO *et al.*, 1997; MIRANDA *et al.*, 2006). E por último, o gênero *Trichosporon* spp. correspondeu a 4,6% (17/367) dos isolamentos afetando com maior frequência as unhas.

A epidemiologia das onicomicoses apresenta inúmeros fatores que torna sua frequência variável, dentre eles: idade, sexo, estilo de vida, presença de doença

concomitante e região geográfica (SVEJGAARD *et al.*, 2003). Entre os 408 pacientes analisados que apresentaram lesões sugestivas de onicomicose, o diagnóstico foi estabelecido em 333 pacientes, sendo 89 (26,7%) do sexo masculino e 245 (73,4%) do sexo feminino (proporção de 1:2,6), confirmando com dados de outros autores, onde se observa predominância de onicomicoses no sexo feminino sobre o sexo masculino, com valores de frequência entre 76% a 80% (BRILHANTE *et al.*; 2005; HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2007). Entretanto, outros autores observaram o contrário, valores de frequência de 75,4% no sexo masculino em relação ao sexo feminino (GUPTA *et al.*, 2007). FOULLET *et al.*, 2004 afirmam que as onicomicoses predominam em 2,8% dos homens e em 2,6% das mulheres. As causas para essas discrepâncias seriam principalmente os diferentes hábitos culturais existentes entre as populações.

A maioria das infecções ungueais (53,8%) ocorreu nas unhas dos pés, enquanto as unhas das mãos foram afetadas em 31,0% dos casos de onicomicose. Unhas das mãos e pés foram simultaneamente afetadas em 15,2% dos pacientes. As justificativas para as unhas dos pés serem mais afetadas do que as unhas das mãos são a menor velocidade de crescimento destas e a maior frequência de traumas nessa região, como o uso de sapatos fechados e com saltos, que facilita a penetração dos fungos. A maior frequência de *Tinea pedis* em relação a *Tinea mannum* também é uma explicação para a maior frequência de onicomicoses nas unhas dos pés, já que essas infecções favorecem a invasão dos fungos no aparelho ungueal (KASZUBA *et al.*, 1998; GHANNOUM *et al.*, 2000; RICH *et al.*, 2003; CHANUSSOT *et al.*, 2007).

Com relação à etiologia das onicomicoses, os grupos de fungos mais isolados foram: leveduras 55,6% (174/313), fungos filamentosos não-dermatófitos 27,2% (85/313) e dermatófitos 17,3% (54/313) (Tabela 6 e Figura 5). Esses dados são controversos com a maioria dos dados da literatura, que registram geralmente os dermatófitos como os maiores responsáveis pelas onicomicoses, representando cerca de 69 a 80% dessas infecções (GUPTA & LYNDE, 1997a; LÓPEZ & TORRES, 1999a; GHANNOUM *et al.*, 2000; GUPTA & HEM, 2000). MARTELOZZO *et al.*, 2005, entretanto, encontraram proporções diferentes dos autores acima citados, com frequência de 33,85% para dermatófitos, 52,17% para leveduras e de 13,97% para fungos filamentosos não-dermatófitos. Outros autores brasileiros como MEIRELES

et al., 2008 também reportaram baixa freqüência de dermatófitos envolvidos na etiologia da onicomicose em Fortaleza, no nordeste brasileiro, sendo que as leveduras foram os agentes mais freqüentes (64,4%), seguidas pelos fungos filamentosos não-dermatófitos (25,4%) e dermatófitos (10,2%), assim como reportado neste trabalho. Casos de onicomicoses por fungos filamentosos não-dermatófitos não podem ser considerados raros na grande Vitória, devendo-se considerar a importância da correta identificação destes agentes etiológicos para um melhor sucesso terapêutico.

Entre os dermatófitos responsáveis pelos casos de *Tinea unguium*, *T. rubrum* foi a espécie mais freqüente correspondendo a 13,4% dentre todos os fungos isolados e 77,8% entre os dermatófitos, atingido ambas as unhas das mãos e dos pés, e predominando no sexo masculino. Com relação às leveduras, o gênero *Candida* foi o mais freqüente, correspondendo a 52,1% dos fungos isolados e 93,7% entre as leveduras. Foi observada maior freqüência de infecções por *Candida* spp. nas unhas das mãos de mulheres (46,9%) em relação aos homens (11,1%), em concordância com outros estudos (MERCANTINI *et al.*, 1996; VELEZ *et al.*, 1997; KOUSSIDOU, 2002). A maior suscetibilidade das mulheres a esse tipo de infecção pode ser explicada pelos hábitos de trabalho, já que muitas mulheres desenvolvem trabalhos domésticos, permanecendo por longos períodos com as mãos úmidas, além de manter contato com substâncias químicas como os detergentes que favorecem o aparecimento de candidíase cutânea, podendo ser considerada uma micose ocupacional.

Entre os fungos filamentosos não-dermatófitos, o gênero *Fusarium* foi o mais isolado neste estudo com freqüência de 17,6% dos isolados dentre todos os agentes etiológicos e de 64,7% dentre os fungos filamentosos não-dermatófitos. Nos Estados Unidos, *Fusarium* spp. foi reportado como o agente etiológico mais freqüente de onicomicose dentre os fungos filamentosos não-dermatófitos, atingindo a freqüência de 34,1% (HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005). Segundo BRILHANTE *et al.*, 2005, *Fusarium* spp. foi o fungo filamentoso não-dermatófito mais isolado com freqüência de 8,19% em um estudo realizado no Ceará (Nordeste brasileiro).

Em conseqüência de intensos movimentos migratórios nas últimas décadas, os fungos do gênero *Scytalidium*, que são mais freqüentes na África, Tailândia,

Inglaterra, Austrália e eram raríssimos no Brasil, têm agora sido isolados com maior frequência (ARAÚJO *et al.*, 2003). *Scytalidium dimidiatum* obteve frequência de 4,47% dentre todos os agentes de onicomicoses e de 16,4% entre o grupo de fungos filamentosos não-dermatófitos, seguido por *Aspergillus* spp. Na Índia, *Aspergillus* spp. foi responsável por 86,4% dos isolamentos de fungos filamentosos não-dermatófitos e, um estudo realizado na Espanha, *Aspergillus versicolor* foi a espécie mais frequente nos casos de micose ungueal (HILMIOGLU-POLAT *et al.*, 2005). Esses dados confirmam um amplo espectro de fungos como agentes de onicomicoses apresentando uma importante implicação terapêutica. Em relação aos fungos filamentosos não-dermatófitos, foi possível observar o curioso isolamento de *Fusarium* spp. em unhas das mãos e dos pés, e predominantemente no sexo feminino. Já *Scytalidium dimidiatum* e *Aspergillus* spp. foram isolados em ambos os sexos, porém mais frequentemente nas unhas dos pés, concordando com TOSTI *et al.*, 2000.

Com relação ao diagnóstico laboratorial das onicomicoses, só foi considerada infecção por *Candida* as lesões em que o exame microscópico direto apresentou blastoconídeos e pseudohifas associado ao isolamento de *Candida* spp. em cultura. Já para os fungos filamentosos não-dermatófitos, seu isolamento só foi considerado nos casos onde foram observados elementos fúngicos (hifas sem artroconídeos, irregulares e/ou demáceas) em exame microscópico direto e o crescimento do mesmo fungo filamentoso não-dermatófito em duas amostras consecutivas do mesmo paciente com intervalo de pelo menos uma semana para cada amostra.

Embora os dermatófitos e, recentemente os fungos filamentosos não-dermatófitos sejam expressivamente isolados no laboratório de diagnóstico micológico, os testes de suscetibilidade a drogas antifúngicas para estes fungos permanecem pouco desenvolvidos, quando comparado com os testes realizados para bactérias e leveduras (PUJOL *et al.*, 1996; FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2002; LASS-FLORL *et al.*, 2006). Recentemente, os testes de suscetibilidade aos antifúngicos têm ganhado credibilidade na literatura (LALITHA *et al.*, 2007). Existem vários métodos para se determinar a suscetibilidade *in vitro*; sendo que o método de referência para fungos filamentosos, documento M38-A publicado pelo CLSI em 2002, é recomendado para a determinação da CIM para algumas espécies de fungos filamentosos, porém não é direcionado para os fungos dermatófitos, dependendo de validação para esse grupo

de fungos. Essa metodologia exhibe algumas limitações e vários pontos ainda dependem de otimização para permitirem a padronização deste teste (GEHRT *et al.*, 1995, GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2005).

Concentração do inóculo, tipo de meio de cultura, pH, solvente, tempo e temperatura de incubação e o método de preparação do inóculo são alguns dos pontos principais que influenciam nos valores das CIM_s (NORRIS *et al.*, 1999; ALIO *et al.*, 2005; JOHNSON, 2008). Segundo PUJOL *et al.*, 1996, os dois fatores mais importantes para a confiabilidade do teste de suscetibilidade são o método de confecção e a concentração do inóculo. Vários estudos demonstram a importância do preparo do inóculo utilizando o hemocitômetro para aumentar a acurácia e reprodutibilidade, (PETRIKKOU *et al.*, 2001; LASS-FLORL *et al.*, 2006), já que os conídeos dos fungos filamentosos variam extremamente em número, tamanho e cor, de acordo com a espécie, podendo assim, influenciar na concentração do inóculo, principalmente quando se adota apenas o método espectrofotométrico. Este método tem mostrado ser reprodutível, contudo é necessário utilizar diferentes faixas de transmissão dependendo da espécie (PUJOL *et al.*, 1996).

Existem várias publicações propondo métodos de padronização do teste de suscetibilidade para dermatófitos e fungos filamentosos não-dermatófitos, através de testes de microdiluição e macrodiluição em caldo, e são geralmente extensões das metodologias propostas pelos documentos M27-A2 ou M38-A. Contudo, os resultados obtidos ainda mostram grande variabilidade dos resultados (JESSUP *et al.*, 2000; FERNANDEZ-TORRES, 2001), provavelmente devido à dificuldade de padronização das diversas variáveis. Considera-se, por exemplo, de extrema importância a contagem do número de conídeos/mL no inóculo ao invés de ajustes espectrofotométricos da turvação da suspensão de esporos.

Outro importante fator para determinação da suscetibilidade de fungos dermatófitos e filamentosos não-dermatófitos é a seleção de um meio de cultura que induza a produção de conídeos (JESSUP *et al.*, 2000). Neste trabalho, utilizou-se o ágar batata dextrose (ABD), que demonstrou apropriada indução na produção de conídeos para todos os fungos testados. Entre as duas espécies de dermatófitos testadas, especialmente *T. rubrum* apresenta processo de conidiação mais difícil, quando comparado com os outros dermatófitos (JESSUP *et al.*, 2000), mas

demonstrou considerável esporulação no ABD, permitindo a obtenção de uma suspensão com concentração de conídeos adequada para confecção do inóculo. Com relação aos fungos filamentosos não-dermatófitos, o ABD também foi igualmente eficaz na produção de conídeos.

O solvente em que as drogas antifúngicas foram diluídas para a confecção da solução estoque também é um fator que pode ocasionar alterações nos valores das CIM_s (RANDHAWA, 2008). DMSO é uma substância altamente polar e estável com excepcional propriedade solvente e empregada como solvente de drogas antifúngicas auxiliando na penetração desses fármacos na pele (RANDHAWA, 2008). A utilização do DMSO como solvente das drogas no teste de suscetibilidade é um dos fatores que altera a reprodutibilidade do teste, já que essa substância pode inibir o crescimento de alguns isolados de dermatófitos, afetando a germinação dos conídeos e causando variações nos resultados (RANDHAWA, 2008). Neste estudo, todas as drogas foram diluídas em DMSO para que essa variável não interferisse nos resultados, permitindo comparar as diferentes CIM_s entre as diferentes drogas testadas.

Com relação ao tempo de incubação do teste, vários autores têm proposto diferentes períodos, variando de 3 até 20 dias para dermatófitos. Segundo SANTOS *et al.*, 2006, depois de 4 dias de incubação, *T. rubrum* apresentou escasso crescimento, contudo, após 7 dias de incubação observou-se crescimento proeminente nos poços contendo o controle positivo sem a droga. FERNANDES-TORRES *et al.*, 2002 obtiveram resultados similares. Diferentes achados foram encontrados por JESSUP *et al.*, 2000; GHANNOUM *et al.*, 2006, que verificaram que 4 dias de incubação foram suficientes para observar crescimento proeminente nos poços controles. Neste trabalho, todos os isolados de dermatófitos produziram crescimento proeminente após sete dias de incubação, quando foram então estabelecidas as CIM_s. O tempo também é uma variável nos teste de suscetibilidade para fungos filamentosos não-dermatófitos. Alguns autores realizam as leituras com 48 horas de incubação e outros com 72 horas (REUBEN *et al.*, 1989; JESSUP *et al.*, 2000). Essas variações dificultam a interpretação e a comparação entre os resultados. Neste estudo, 48 horas de incubação foram suficientes para obter bom crescimento de fungos filamentosos não-dermatófitos nos poços controles.

A obtenção do inóculo homogêneo é a principal dificuldade encontrada para atingir a reprodutibilidade e acurácia do teste de suscetibilidade para fungos filamentosos. O protocolo do CLSI estabelece o ajuste do inóculo apenas pela leitura da transmitância no espectrofotômetro, não levando em conta discrepâncias entre tamanhos e possíveis colorações de conídeos e transmitâncias apresentadas pelas suspensões dos inóculos. Neste estudo, as recomendações do Documento M38-A do CLSI foram seguidas, considerando algumas adaptações. Primeiramente, a preparação do inóculo incluiu a contagem do número de conídeos em um hemocítmetro, além da leitura espectrofotométrica, que permitiu o exato ajuste e conhecimento da concentração de 1×10^6 - 4×10^6 conídeos/mL contidos no inóculo. Essas variáveis não são controladas quando os inóculos são ajustados apenas pela leitura de transmitância em espectrofotômetro. Os resultados demonstraram que a contagem do número de conídeos é facilmente realizada, sendo uma técnica prática e econômica e que não requer aparelhagem de alto custo. Já o método espectrofotométrico, igualmente não é difícil de ser realizado, mas as faixas de transmitâncias devem ser estabelecidas para as diferentes espécies fúngicas. Nesse estudo, foram utilizadas duas faixas de transmitância: $T_{80-85\%}$ e $T_{65-70\%}$. Os inóculos dos fungos dos gêneros *Scytalidium* e *Fusarium* se apresentaram dentro da faixa de $T_{65-70\%}$, com contagens de $1 - 4 \times 10^6$ conídeos/mL, porém, para *Aspergillus*, *T. rubrum* e *T. interdigitale* foram necessárias leituras nas faixas $T_{80-85\%}$ ou $T_{65-70\%}$ para atingir inóculos nas concentrações de $1 - 4 \times 10^6$ conídeos/mL, diferenças atribuídas à heterogeneidade nos tamanhos dos conídeos e/ou pigmentação dos mesmos. O gênero *Scytalidium* por apresentar coloração demácea, produz um inóculo escuro que interfere na concentração final da suspensão, tornando necessário ajustar o inóculo para faixas de transmitância mais baixas para atingir a concentração desejada. O gênero *Fusarium* apresenta conídeos de tamanhos maiores quando comparados com os conídeos do *Aspergillus*, *T. rubrum* e *T. interdigitale*, sendo também, necessário utilizar faixas de transmitâncias mais baixas (65-70%), enquanto que para alguns isolados de dermatófitos e *Aspergillus* foram utilizadas faixas mais altas 80-85% (mais diluídas) para alcançar a concentração de conídeos dentro da faixa determinada. Além do tamanho dos conídeos, a produção de pigmentação, observada em várias espécies pode influenciar substancialmente no valor da transmissão. A produção de pigmento depende do meio de cultura usado e varia de isolado para isolado dentro de uma mesma espécie (GUARRO *et al.*, 1998),

portanto devido aos diferentes tamanhos dos conídeos e pigmentação entre as diferentes espécies fúngicas, verifica-se que a contagem dos conídeos em hemocitômetro é a técnica mais confiável e que permite maior reprodutibilidade ao se fazer o ajuste do inóculo.

Alguns estudos têm demonstrado que os conídeos apresentam maior sensibilidade às drogas antifúngicas que os fragmentos de hifas (SANTOS *et al.*, 2005). O documento M38-A do CLSI recomenda a separação entre hifas e conídeos através da sedimentação por 15 a 20 minutos, usando-se apenas a parte superior da suspensão para realizar o teste de suscetibilidade. Neste estudo, foi observado, durante contagem de conídeos em hemocitômetro, que estes foram predominantes, sendo visualizados poucos fragmentos de hifas e concluindo-se que a sedimentação é eficiente para a eliminação das hifas (Anexo 5 a, b,c). Recentemente, autores propõem a remoção de fragmentos de hifas do inóculo através de filtração em filtros com poros de 8µm de diâmetro para obtenção de inóculo ainda mais homogêneo (BARROS *et al.*, 2007, SIQUEIRA *et al.*, 2008).

A avaliação, em geral, da atividade *in vitro* das drogas testadas revelaram que para os fungos dermatófitos, as drogas mais potentes foram o ciclopirox e a terbinafina. Entre as drogas azólicas, itraconazol foi a mais ativa, seguida pelo miconazol, cetoconazol e fluconazol (Tabela 9), em concordância com os resultados de FERNANDEZ-TORRES *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2003b e BARROS *et al.*, 2007. Fluconazol apresentou os maiores valores de CIM_s, para os dermatófitos, demonstrando ser a droga menos efetiva *in vitro* para este grupo, confirmando os resultados de ALIO *et al.*, 2005 e SIQUEIRA *et al.*, 2008. PUJOL *et al.*, 2002 reportaram altas CIM_s para fluconazol para as espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale* com valores de 4 a 8 µg/mL e de 8 a 128 µg/mL, respectivamente.

Ciclopirox apresentou ótima atividade nos testes *in vitro* para os fungos dermatófitos, com valores de CIM_{90%} abaixo de 0,015 µg/mL, enquanto que griseofulvina apresentou CIM_{90%} de 4 e 8 µg/mL para isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale*, respectivamente, valores mais elevados que aqueles encontrados por BARROS *et al.*, 2007 (Anexo 10c).

Neste trabalho, evidenciou-se variações na suscetibilidade entre os dois grupos de fungos filamentosos: as drogas antifúngicas foram muito mais eficazes contra fungos dermatófitos que não-dermatófitos (Tabela 9 e Figura 6). *Fusarium* spp. foi o gênero que apresentou menor variabilidade nos valores das CIM_s dentro deste grupo e é importante ressaltar que isolados desse gênero podem apresentar resistência intrínseca a drogas antifúngicas, não sendo inibidos dentro das faixas de diluições de drogas testadas, confirmando a tendência a resistência *in vitro* e *in vivo* desses isolados contra vários antifúngicos licenciados para o tratamento de onicomicoses (REUBEN *et al.*, 1989; PUJOL *et al.*, 1996, CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2006) (Tabela 12). A espécie *F. solani* é considerada a mais resistente (IZQUIERDO *et al.*, 2008) e neste estudo, *F. solani* apresentou CIM_{90%} ligeiramente mais elevadas que *F. oxysporum* (Anexo 10d). As onicomicoses causadas por *Fusarium* spp. são preocupantes e devido a uma baixa resposta terapêutica aos tratamentos convencionais, alguns pacientes imunocomprometidos estão desenvolvendo quadros sistêmicos de infecções por *Fusarium*, cuja fonte de infecção pode estar relacionada com onicomicose (ARRESE *et al.*, 1996), demonstrando a importância do correto diagnóstico e tratamento das onicomicoses ocasionadas por esses fungos.

Tabela 12: CIM_s das espécies de *Fusarium* estudadas comparadas com investigações realizadas por outros autores.

Drogas	Nosso estudo		CUENCA-ESTRELLA, 2005		REUBEN <i>et al.</i> , 1989
	<i>F.solani</i> (23)	<i>F.oxysporum</i> (4)	<i>F.solani</i> (24)	<i>F. oxysporum</i> (19)	<i>Fusarium</i> spp.
Itraconazol	CIM 50%	≥ 4	0,5	≥ 8	≥ 32
	CIM 90%	≥ 4	≥ 4	≥ 8	≥ 32
Miconazol	CIM 50%	≥ 16	1	-	≥ 32
	CIM 90%	≥ 16	4	-	≥ 32

Scytalidium dimidiatum apresentou alto padrão de resistência às drogas fluconazol (CIM_{90%} ≥ 64), itraconazol (CIM_{90%} ≥ 4), cetoconazol (CIM_{90%} ≥ 8), miconazol (CIM_{90%} ≥ 16), griseofulvina (CIM_{90%} ≥ 64) e terbinafina (CIM_{90%} ≥ 64), apresentando somente

certa suscetibilidade ao ciclopirox ($CIM_{90\%} \geq 0,25$). Esses altos valores de $CIM_{90\%}$ em testes *in vitro* sugerem má resposta dos agentes antifúngicos *in vivo* e alguns autores consideram as infecções por *S. dimidiatum* habitualmente incuráveis, tanto utilizando antifúngicos orais como tópicos (ÁLVAREZ *et al.*, 2000). A dificuldade no tratamento da onicomicose ocasionada por esse fungo pode ser confirmada pelos altos valores encontrados nas $CIM_{90\%}$ em testes *in vitro*, que foram reportados por outros autores (LACROIX *et al.*, 2008).

Já o gênero *Aspergillus* apresentou altos valores de $CIM_{90\%}$ para fluconazol, cetoconazol e griseofulvina (≥ 64 , ≥ 8 , ≥ 64), porém certa suscetibilidade ao ciclopirox, miconazol, itraconazol e terbinafina. Em um estudo realizado por GIANNI *et al.*, 2004, a terbinafina também apresentou atividade *in vitro* superior ao itraconazol para o gênero *Aspergillus*. As drogas fluconazol e griseofulvina não inibiram os isolados de fungos filamentosos não-dermatófitos nem nas maiores concentrações testadas, demonstrando que este grupo apresenta tendência para um alto padrão de resistência a essas drogas.

Comparando os resultados obtidos nos testes de suscetibilidade com os valores dos *breakpoints* recentemente publicados no documento M38-A2 (2008), proposto pelo CLSI, verifica-se, em relação ao itraconazol, que $CIM_s \leq 1$ correspondem a isolados de dermatófitos sensíveis, $CIM = 2$ isolados com suscetibilidade intermediária e $CIM \geq 4$, isolados resistentes. Com base nesses valores de *breakpoints* recentemente propostos, todos os isolados de fungos dermatófitos testados no estudo seriam sensíveis, ressaltando que se considerou 100% de inibição do crescimento comparado com o controle positivo, enquanto que o Documento M38-A adota 80% de inibição.

A comparação entre as curvas de crescimento do fungo em macrodiluição, construídas a partir das contagens das UFC/mL, e os respectivos valores das CIM_s obtidas na microdiluição para os pares de isolados de *S. dimidiatum* e de *T. rubrum*, permitiu observar que a terbinafina foi a droga que alcançou maior eficácia para ambos os grupos de fungos. Na microdiluição realizada para o miconazol, o isolado 066 foi inibido na concentração de $2\mu\text{g/mL}$, porém na curva de crescimento observou-se que a concentração de miconazol igual a $16\mu\text{g/mL}$ não inibiu totalmente o crescimento da amostra. Com relação ao isolado de *S. dimidiatum* 228 também

houve discordância, pois na microdiluição houve inibição de 100% do crescimento na concentração de 0,5µg/mL e a mesma concentração na macrodiluição não inibiu o crescimento, que só foi atingido na concentração de 16µg/mL. Para o ciclopirox, foi verificada certa discrepância entre valores de micro e macrodiluição para ambos os isolados de *S. dimidiatum*. Observando-se maior eficácia dessa droga na microdiluição, obtendo-se uma CIM = 0,007, entretanto a concentração de 0,125 µg/mL não foi capaz de inibir o crescimento dos dois isolados de *S. dimidiatum* na macrodiluição (Figura 9). Esta não correspondência entre valores de micro e macrodiluição pode ser atribuída a diferentes condições entre os testes, como o emprego de agitação na macrodiluição, facilitando talvez a solubilização da droga e permitindo melhor oxigenação do meio de cultura, obtendo-se um crescimento maior que os valores das CIM_s obtidas na microdiluição. Este fenômeno não foi observado para as demais drogas onde valores das CIM_s e as curvas de inibição foram concordantes para ambos os grupos de fungos.

O sucesso no tratamento das onicomicoses tem sido desafiador para os dermatologistas (MISHRA *et al.*, 2005). Agentes tradicionais como a griseofulvina apresentam um limitado espectro de ação, requerendo um longo período de terapia e possui altas taxas de recidiva. Cetoconazol, embora seja mais efetivo, apresenta maior risco de hepatotoxicidade, limitando o seu uso (MISHRA *et al.*, 2005). Atualmente, os agentes mais usados no tratamento das onicomicoses são itraconazol e terbinafina. Esses fármacos apresentam melhor farmacocinética, com rápida penetração nas unhas e leito ungueal, permanecendo no sítio de ação durante meses após a interrupção do tratamento, além de apresentar poucas reações adversas (MISHRA *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que a escolha da droga baseia-se também na via de administração da mesma. Tratamento com agentes antifúngicos de ação sistêmica é recomendado para todos os tipos de onicomicoses (SEEBACHER *et al.*, 2007). A terbinafina e o itraconazol administrados por via oral são associados com taxas de cura de 75% ou mais em estudos clínicos de pacientes com onicomicoses confirmada por exames laboratoriais (OSBORNE *et al.*, 2003; RICH *et al.*, 2003).

Agentes tópicos geralmente são considerados ineficazes para o tratamento de onicomicoses, principalmente por apresentar pouca penetração no interior das

unhas (GUPTA *et al.*, 2006). HAY *et al.*, 1987 reportaram a taxa de cura de 22% com o uso de solução de tioconazol três vezes ao dia durante 12 meses. Drogas de uso tópico são recomendadas para o tratamento das onicomicoses somente quando menos de 50% da unha está afetada e não houve comprometimento da matrix ungueal (SEEBACHER *et al.*, 2007).

Os testes de suscetibilidade *in vitro* podem auxiliar nas recomendações terapêuticas. Porém, é necessário obter mais dados clínicos para confirmar se uma boa atividade observada *in vitro* é realmente prognóstico para o sucesso da terapia *in vivo*. Há ainda a necessidade de se estabelecer *breakpoints* para os testes de suscetibilidade para os fungos filamentosos (OZKUTUK *et al.*, 2007).

Segundo CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2002, os resultados de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos dão evidências confiáveis para auxiliar no tratamento clínico. Porém, a correta determinação da etiologia das onicomicoses é importante para um correto planejamento terapêutico.

6 – CONCLUSÕES

1- A dermatomicose mais observada foi nas unhas com freqüência de 43,1%, seguida pelas lesões no corpo (27,4%), pé (13,7%), couro cabeludo (8,2%), mão (5,2%) e axila/virilha (2,4%);

2- No geral, a freqüência dos grupos de fungos envolvidos na etiologia das dermatomicoses foi: leveduras (50,3%), dermatófitos (34,4%) e não-dermatófitos (15,3%);

3- O diagnóstico clínico e laboratorial das onicomicoses pode ser problemático: somente 69% das amostras clínicas coletadas de casos suspeitos foram positivas no exame direto e somente 58,6% apresentaram confirmação através de cultura;

4- Com relação à etiologia das onicomicoses, os grupos de fungos mais isolados foram: leveduras (55,6%), fungos filamentosos não-dermatófitos (27,2%) e dermatófitos (17,3%);

5- Dentre as leveduras, *Candida* spp. foi o gênero mais freqüentemente isolado, (52,3%), sendo as unhas das mãos femininas o sítio anatômico mais envolvido por esse agente etiológico, seguido pelo gênero *Fusarium* com freqüência de 17,6%, sendo mais isolado que o dermatófitos *T. rubrum* com freqüência de 13,4% dentre os agentes etiológicos.

6- A proposta de um protocolo para testes de suscetibilidade *in vitro* de dermatófitos e não-dermatófitos é conveniente e reprodutível;

7- Para a confecção do inóculo, a contagem em hemocitômetro demonstrou ser mais confiável que a leitura em espectrofotômetro;

8- Entre os fungos filamentosos, os não-dermatófitos foram mais freqüentes nas onicomicoses e menos suscetíveis *in vitro* a drogas testadas que os fungos dermatófitos;

9- Em geral, todos os antifúngicos mostraram ser efetivos *in vitro* para os fungos dermatófitos, com exceção do fluconazol. Terbinafina foi a droga que apresentou melhor atividade para ambos os grupos, fungos dermatófitos e não-dermatófitos.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 ALIO, A.B.; MENDOZA, S.M.; ZAMBRANO, E.A.; DIAZ, E.; CAVALLERA, E. Dermatophytes growth curve and in vitro susceptibility test: a broth micro-titration method. **Medical Micology**, v. 43, p. 319-325, 2005.

2 ÁLVAREZ, P.; ENRÍQUEZ, A.M.; TORO, C.; MARTÍNEZ, I.; BUHIGAS, I.; MIGUEL, S de.; LAGO, M.; PUENTE, S.; PALACIO, A. del.; BAQUERO, M. Dermatomicosis de imputación por *Scytalidium dimidiatum*: a propósito de três casos. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.17, p. 102-106, 2000.

3 ARAÚJO, A.J.G.; BASTOS, O.M.P.; SOUZA, M.A.J; OLIVEIRA, J.C. Ocorrência de onicomiose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78(3), p. 299-308, 2003.

4 ARENAS, R.; OCET, D. Onicomiosis: frecuencia actual en estrategias an departamento de dermatologia de la Ciudad del Mexico. **Derm Rev Mex**, v. 41(5), p. 171-176, 1997.

5 ARENAS, R. Dermatofitosis em México. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, p. 63-67, 2002.

6 ARRESE, J.E.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; PIÉRARD, G.E. Fatal hyalohyphomycosis following onychomycosis in an immunocompromised patient. **American Journal of Dermatopathology**, v. 18, p. 196-198, 1996.

7 ASPIROZ, C.; GENÉ, J.; REZUSTA, A.; CHARLEZ, L.; SUMMERBELL, R.C. First spanish case onychomycosis caused by *Chaetomium globosum*. **Medical Micology**, v. 45, p. 279-282, 2007.

8 BABIC-ERCEG, A.; BARISIC, Z.; ERCEG, M.; BABIC, A.; BORZIC, E.; ZORANIC, V.; KALITERNA, V. Dermatophytoses in Split and Dalmatia, Croatia, 1996-2002. **Mycoses**, v. 47, p. 297-299, 2003.

9 BARROS, M.E.S.; SANTOS, D.A.; HAMDAN, J.S. Antifungal susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* by E-Test. **Archives of Dermatological Research**, v. 299, p. 107-109, 2007.

10 BARROS, M.E.S.; SANTOS, A.S.; HAMDAN, G.S. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 514-518, 2007.

11 BATAWI, M.M.; ARNAOT, H.; SHOEIB, S.; BOSSEILA, M.; FANGARY, M.; HELMY, A.S. Prevalence of Non-Dermatophyte Molds in Patients with Abnormal Nails. **International Journal of Dermatology**, v. 44(10), p. 851-854, 2005.

12 BELL-SYER, S.E.M.; HART, R.; CRAWFORD, F. A systemic review of oral treatments for fungal infections of skin and feet. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 12, p. 69-74, 2001.

13 BINDU, V.; PAVITHRAN, K. Clinico-mycological study of dermatophytosis in Calicut. **Indian Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 68, p. 259-261, 2002.

14 BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; MONTEIRO, A.J.; MEIRELES, T.E.R.; SIDRIM, J.C. *Tinea capitis* in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brasil: the role of *Trichophyton tonsurans*. **International Society of Dermatology**, v. 43, p. 575-579, 2004.

15 BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MEDRANO, D.J.A.; ROCHA, M.F.G.; MONTEIRO, A.J.; CAVALCANTE, C.S.P.; MEIRELES, T.E.F.; SIDRIM, J.J.C. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100 (2), p. 131-135, 2005.

16 CAMPBELL, C.K. Studies on *Hendersonula toruloidea* isolated from human skin and nail. **Sabouraudia**, v. 12, p. 150-156, 1971.

17 CAMPOS IS; HERNÁNDEZ-CHAVARRIA F. *Fusarium* como agente etiológico de onicomicosis: Informe estrategias y revisión de la literatura. **Revista Costarricense de Ciências Médicas**, v. 26, p. 1-2, 2005.

18 CHANUSSOT, C.; ARENAS, R. Infección micótica plantar e interdigital en pacientes con onicomicosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 118-121, 2007.

19 CHINELLI, P.A.V.; SOFIATTI, A.A.; NUNES, R.S.; MARTINS, J.E.C. Dermatophyte agents in the city São Paulo, from 1992 to 2002. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45 (5), p. 259-263, 2003.

20 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. **Approved Standard M38-A**, 2002.

21 COHEN, J.L.; SCHER, R.K.; PAPPERT, A.S. The nail and fungus infections. **Cutaneous fungal infections**, p.106-122, 1992.

22 COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; SILVA, M.V.; RODRIGUES, A.B.; FERNANDES, O.F.L.; SOARES, A.J.; SILVA, M.R.R. Etiologia e epidemiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32 (4), p. 367-371, 1999.

23 CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad?. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 133-38, 2002.

24 CUENCA-ESTRELLA, M.; LOPES, A.G.; BUITRAGO, M.J.; MELLADO, E.; EFFRON, G.G.; TUDELA, J.L.R. *In vitro* activities of 10 combinations of antifungal agents against the multiresistant pathogen *Scopulariopsis brevicaulis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2248-2250, 2006.

25 DAMÁZIO, P.M.R.B.C.; LACERDA, H.R.; FILHO, A.M.L.; MAGALHÃES, O.M.C.; NEVES, R.P. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40 (4), p484-486, 2007.

26 DAWBER, R.P.R.; BARAN, R. Disorders of the nails. *Textbook of Dermatology*. Oxford: **Blakwell Scientific Publications**, p. 2497-2532, 1993.

27 DRAKE, L.A.; SCHER, R.K.; SMITH, E.B.; FAICH, G.A.; SMITH, S.L.; HONG, J.J.; STILLER, M.J. Effect of onychomycosis on quality of life. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, p. 702-704, 1998.

28 EFFRON, G.G.; LOPEZ, A.G.; MELLADO, E.; MONZON, A.; TUDELA, J.L.R.; ESTRELLA, M.C. *In vitro* activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 1086-1089, 2004.

29 ELEWISKI, B.E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11(3), p. 415-429, 1998.

30 ELEWSKI, B.; TAVAKKOL, A. Safety and tolerability of oral antifungal agents in the treatment of fungal nail disease: a proven reality. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.1(4), p. 299-306, 2005.

31 ELLIS, D.H.; WATSON, A.B.; MARLEY, J.E.; WILLIAMS, T.G. Nondermatophytes in onychomycosis of the toenails. **British Journal of Dermatology**, v.136, p. 490-493, 1997a.

32 ELLIS, D.H.; MARLEY, J.E.; WATSON, A.B.; WILLIAMS, T.G. Significance of non-dermatophytes moulds and yeast in onychomycosis. **Dermatology**, v. 149, p. 40-42, 1997b.

33 ESPINEL-INGROFF, A.; FORTHERGILL, A.; GHANNOUM, M.; MANAVATHU, E.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PFALLER, M.; RINALDI, M.; SCHELL, W.; WALSH, T.

Quality control and reference guidelines for CLSI broth microdilution susceptibility method (M-38-A document) for Anfotericin B, Itraconazole, Posaconazole and Voriconazole. **Journal of Clinical Microbiolog**, v. 43(10), p. 5243-5246, 2005.

34 FERNANDEZ-TORRES, B.; CARRILLO, A.J.; MARTIN, E.; PALACIO, A.D.; MOORE, M.K.; VALVERDE, A.; SERRANO, M.; GUARRO, J. In vitro of 10 antifungal drugs against 508 dermatophytes strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 459, p. 2524-2528, 2001.

35 FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CABANES, F.J.; CARRILO-MUÑOZ, A.J.; ESTEBAN, A.; INZA, I.; ABARCA, L.; GUARRO, J. Collaborative Evaluation of Optimal Antifungal Susceptibility Testing Conditions for Dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, p. 3999-4003, 2002.

36 FINDLAY, G.H.; VISMER, H.F.; SOPHIANOS, T. The spectrum of pediatric dermatology. **British Journal of Dermatology**, v. 91, p. 379-388, 1974.

37 FOULLET, F.; CREMER, G.; BOURDON-LANOY, E. Les atteintes plantaires a dermatophytes sont-elle sous-estimees? Bude retrospective. **Annales de Dermatologie et de Venereologie**, v. 131, p. 171-172, 2004.

38 FURTADO, M. S. S.; CORTÊZ, A. C. A.; FERREIRA, J. A. Pitiríase versicolor em Manaus, Amazonas-Brasil **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 72 (4), p. 349-351, 1997.

39 GARG, J.; TILAK, R.; SINGH, S.; GULATI, A.K.; GARG, A.; PRAKASH, P.; NATH, G. Evaluation of Pan-dermatophyte Nested PCR in diagnosis of onychomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45 (10), p. 3443-3445, 2007.

40 GEHRT, A.; PETER, J.; PIZZO, P.; WALSH, T. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MIC of antifungal agents by broth microdilution method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1302-1307, 1995.

41 GHANNOUM, M.A.; HAJJEH, R.A.; SCHER, R.; KONNIKOV, N.; GUPTA, A.K.; SUMMERBELL, R, *et al.* A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.43, p. 641-648, 2000.

42 GHANNOUM, M.A.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M.A.; RINALDI, M.G.; YANG, W.; WARNOCK, D.W. Intra - and Interlaboratory study of a method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42 (7), p. 2977-2979, 2004.

43 GIANNI, C.; CERRI A.; CROSTI, C. Non-dermatophytes onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. **Mycoses**, v. 43, p. 29-33, 2000.

44 GIANNI, C.; ROMANO, C. Clinical and histological aspects of toenail onychomycosis caused by *Aspergillus* spp.: 34 cases treated with weekly intermittent terbinafine. **Dermatology**, v. 209, p. 104-110, 2004.

45 GOMEZ-LOPEZ, A.; ABERKANE, A.; PETRIKKOU, E.; MELLADO, E.; RODRIGUES-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Analysis of the influence of tween concentration , inoculum size, assay medium, and ready time on the susceptibility testing of *Aspergillus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43 (3), p. 1251-1255, 2005.

46 GUARRO, J.; PUJOL, I.; AGUILLAR, C.; LLOP, C.; BALLART-FERNÁNDEZ, J. Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 385-387, 1998.

47 GUEHO, E. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**, v. 37, p. 3 - 10, 1994.

48 GUGNANI, H.C. Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. **Revista Iberoamericana de Micología**, p. 109 -114, 2000.

49 GUPTA, A.K.; LYNDE, C.W. Prevalence and epidemiology of unsuspected onychomycosis in patients visiting dermatologists offices in Ontario, Canada-a multicenter survey of 2001 patients, **International Journal of Dermatology**, v. 36, p. 783-787, 1997a.

50 GUPTA, A.K.; SIBBALD, R.G.; LYNDE, C.W.; HULL, P.R.; PRUSSICK, R.; SHEAR, N.H.; DONCKER, P.; ELEWISKI, B.E. Onychomycosis in child: prevalence and treatment strategies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 36, p. 395-402, 1997b.

51 GUPTA A.K.; TABORDA, P., TABORDA, V. *et al.* Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV-positive individuals. **International Journal of Dermatology**, v. 39, p. 746-53, 2000.

52 GUPTA, A.K.; HEM, C.J. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physician's offices: a multicenter Canadian survey of 15000 patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, p. 244-248, 2000.

53 GUPTA, A.K.; GREGUREK-NOVAK, T.; KONNIKOV, N.; LYNDE, C.W.; HOFSTADER, S.; SUMMERBELL, R.C. Itraconazole and terbinafine treatment of some nondermatophyte molds causing onychomycosis of the toes and a review of the literature. **J Cut Med Surg**, v. 5, p. 206-210, 2001.

54 GUPTA, A.K.; KOHLI, Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazol and itraconazol against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. **British journal of dermatology**, v. 149, p. 296-305, 2003c.

55 GUPTA, A.K.; RYDER, J.E.; BARAN, R.; RICHARD, C. Non-dermatophytic onychomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 21, p. 257-268, 2003a.

56 GUPTA, A.K.; RYDER, J.E.; BARAN, R. The use of topical therapies to treat onychomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 21, p. 481-489, 2003b.

- 57 GUPTA, A.K.; TU, L.Q. Therapies for onychomycosis: a review. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 375–379, 2006.
- 58 GUPTA, M.; SHARMA, N.L.; KANGA, A.K.; MAHAJAN, V.K.; TEGTA, G.R. Onychomycosis: Clinico-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73(6), p. 389-392, 2007.
- 59 HAY, R.J.; MACKIE, R.M.; CLAYTON, Y.M. Tioconazole nail solution – an open study of its efficacy in onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.12, p.175–7, 1987.
- 60 HERNADEZ-SALAZAR, A.; CARBAJAL-PRUNEDA, P.; MARTINEZ, R.F.; ARENAS, R. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad del México. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24. p. 122-124, 2007.
- 61 HILMIOGLU-POLAT, S.; METIN, D.Y.; INCI, R.; DERELI, T.; KILINÇ, I.; TUMBAY, E. Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey – a prospective study. **Mycopathologia**, v.160, p. 125-128, 2005.
- 62 IORIZZO, M.; PIRACINI, B.M; TOSTI, A. New fungal nail infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, p. 142-145, 2007.
- 63 INGROFF, A.S.; BARTLETT, M.; BOWDEN, R.; CHIN, X.; COOPER, J.R.; FOTHERGILL, A.; MCGINNIS, M.R.; MENEZES, P.; MESSER, S.A.; NELSON, P.W.; PASARELL, O.F.C.I.; PETER. J.; PFALLER, M.A.; REX, J.H.; RINALDI, M.G.; SHANKLAND, G.S.; WALSH, T.J.; WEITZMAN, I. Multicenter evaluation proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 139-143, 1997.
- 64 IZQUIERDO, A.A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MONZÓN, A.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 805-809, 2008.

- 65 JAISWAL, A.; SHARMA, R.P.; GARG, A.P. An open randomized comparative study to test the efficacy and safety of oral terbinafine pulse as a monotherapy and in combination with topical ciclopirox olamine 8% or topical amorolfine hydrochloride 5% in the treatment of onychomycosis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73(6), p. 393-396, 2007.
- 66 JESSUP, C.J.; WARNER, J.; ISHAM, N.; HASAN, I.; GHANNOUM, M.A. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38 (1), p. 341-344, 2000.
- 67 JOHNSON, E.M. Issues in antifungal susceptibility testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 13-18, 2008.
- 68 KARDJEVA, V.; SUMMERBELL, R.; KANTANRDJIEV, T.; DEVLIOU-PANAGIOTIDOU, D.; SOTIRIOU, E.; GRASE, Y. Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44(4), p. 1419-1427, 2006.
- 69 KASZUBA, A.; SENECKO, F.; LIPOWCZANI, G.; BIENIAS, L.; KOSTUSIAK, M.; LUPA, S. Fungal flora in human skin and skin appendages infections in the region of Łódź, Poland. **Mycoses**, v. 41, p. 249-253, 1998.
- 70 KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003.
- 71 KAUR, R.; KASHYAP, B.; BHALLA, P. A five-year survey of onychomycosis in New Delhi, epidemiological and laboratory aspects. **Indian Journal of Dermatology**, v. 52(1), p. 39-42, 2007.
- 72 KAUR, R.; KASHYAP, B.; BHALLA, P. Onychomycosis - epidemiology, diagnosis and management. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26 (2), p. 108-116, 2008.

73 KHAN, S.; SIMGHAL, S.; MARTHUR, T.; UPADHYAY, D.J., RATTAN, A. Antifungal susceptibility testing method for resource constrained laboratories. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24 (3), p. 171-176, 2006.

74 KIRAZ, M.; YEGENOGLU, Y.; ERTURAN, Z.; ANG, O. The epidemiology of onychomycosis in Istanbul, Turkey. **Mycoses**, v. 42, p. 323-329, 1999.

75 KORTING, H.C.; OLLERT, M.; ABECK, D. Results of German multicenter study of antimicrobial susceptibilities of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* strains causing *Tinea unguium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39 (5), p. 1206-1208, 1995.

76 KOUSSIDOU T; Devliotou-Panagiotidou D; Karakatsanis G; Minas A; Mourellou O, Sâmara K. Onychomycosis in Northern Greece during 1994-1998. **Mycoses**, v. 45, p. 29-37, 2002.

77 KUVANDIK,G.; CETIN, M.; GENTCTOY, G.; HOROZ, M.; DURU, M.; ALKALI, C.; SATAR, S.; Kiykim, A.A.; KAYA, H. The prevalence, epidemiology and risk factors for onychomycosis in hemodialysis patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 7(102), p. 1-5, 2007.

78 LACAZ, C.S.; PEREIRA, A.D.; HEINS-VACARRI, E.M.; CUCÉ, L.C.; BENATTI, C.; NUNES, R.S.; MELO, R.S.T.; FREITAS-LEITE, R.S.; HERNANDEZ-ARRIAGADA, G.L. Onychomycosis caused by *Scytalidium dimidiatum*. Report of two cases. Review of the taxonomy of the synanamorph and anamorph forms of this coelomycete. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41 (5), p. 319-323, 1999.

79 LACROIX, C.; CHAUVIN, M.F. *In vitro* activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and terbinafine against *Scytalidium dimidiatum* and *Scytalidium hyalinum* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 835-837, 2008.

80 LALITHA, P.; SHAPIRO, B.L.; SRINIVASAN, M.; PRAJNA, N.V.; ACHARRYA, N.R.; FOTHERGILL, A.W.; RUIZ, J.; CHIDAMBARAM, J.D.; MAXEY, K.J.; HONG, K.C.; MCLEOD, S.D.; LIETMAN, T.M. Antimicrobial susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus* and other filamentous fungi isolated from keratitis. **Archives of Ophthalmology**, v. 125 (6), p. 789-793, 2007.

81 LASS-FLORL, C.; CUENCA-ESTRLLA, M.; DENNING, D.W.; TUDELA, J.L.R. Antifungal susceptibility testing in *Aspergillus* spp. according to EUCAST methodology. **Medical Micology**, v. 44, p. 5319-5325, 2006.

82 LÓPEZ, J.O.; TORRES, R.J.M. Especies fungicas poco communes responsables de onicomiosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 16(1), p. 11-15, 1999a.

83 LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; MARI, C.R.D.; OLIVEIRA, L.T.O.; BRUM, L.M.; WESTPHALEN, J.B.; FURIAN, F.W.; ALTERMANN, M. A ten-year survey of onychomycosis in central region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, p. 147-149, 1999b.

84 LUQUE, A.G.; RAMOS, L.L.; AMIGOT, S.L.; RICCOMI, A.L. Estudio micológico de 100 casos de lesiones ungueales de la cidade de Rosario-República Argentina. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 14, p. 164-167, 1997.

85 MARTELOZZO, I.C.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T.I.E. Ocorrência de onicomiose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum: Health Science**, v. 27, p. 177-182, 2005.

86 MARTINS, E.A.; GUERRER, L.V.; CUNHA, K.C.; SOARES, M.M.C.N.; ALMEIDA, M.T.G. Onicomiose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40(5), p. 596-598, 2007.

87 MEIRELES, T.E.F.; ROCHA, M.F.G.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A., SIDRIM, J.J.C. Successive mycological nail tests for onychomycosis: a strategy to

improve diagnosis efficiency. **The Brazilian Journal of Infections Diseases**, v.12(4): 333-337, 2008.

88 MERCANTINI, R.; MARSELLA, R.; MORRETO, D. Onychomycosis in Roma, Italy. **Mycopathologia**, v. 1, p. 25-32, 1996.

89 MEZZARI, A. Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40 (2), p. 71-76, 1998.

90 MIGDLEY, G.; MOORE, C.K.; COOK, J.C.; PHAN, Q.G. Mycology in nail disorders. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, p. 68-74, 1994.

91 MINELLI, L.; MARQUES, N.C.M. Micoses superficiais na mulher. **Ver Bras Méd**, v. 57(5), p. 360, 2000.

92 MIRANDA, K. C.; ARAUJO, C. R.; SOARES, A. J.; LEMOS, J. A.; SOUZA, L. K. H. SILVA, M. R. R. Identificação de espécies de *Malassezia* em pacientes com pitiríase versicolor em Goiânia-GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39(6), p. 582-583, 2006.

93 MISHRA, M.; PANDA, P.; TRIPATHY, S.; SENGUPTA, S.; MISHRA, K. An open randomized comparative study of oral itraconazole pulse and terbinafine pulse in the treatment of onychomycosis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 71, p. 262-266, 2005.

94 MOORE, M.K. *Hendersonula* and *Scytalidium hyalinum* infections in London, England. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 24, p. 219-230, 1986.

95 NGWOGU, A.C.; OTOKONEFUR, T.V. Epidemiology of dermatophytoses in a rural community in eastern Nigeria and review of literature from Africa. **Mycopathologia**, v. 164, p.149-158, 2007.

96 NORRIS, H.A.; ELEWISKI, B.E.; GHANNOUM, M.A. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40 (6), p. 9-S13, 1999.

97 OKEKE, C.N.; TSUBOL, R.; KAWAI, M.; OGAWA, H. Fluorometric assessment of in vitro antidermatophytic activities of antimycotics based on their keratin-penetrating power. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38(2), p. 489-491, 2000.

98 OSBORNE, C.S.; HOFBAUER, B.; FAVRE, B.; RYDER, N.S. *In vitro* analysis of the ability of *Trichophyton rubrum* to become resistant to terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3634-3636, 2003.

99 OZKUTUK, A.; ERGON, C.; YULUG, N. Species distribution and antifungal susceptibility of dermatophytes during a one year period at a university hospital in Turkey. **Mycoses**, v. 50, p. 125-129, 2007.

100 PALACIO, A. del; CUETARA, M.S.; VALLE, A.; GONZALEZ, A.; ALMONDARAIN, I.; CASTILLO, M.J.R.; VASALLO, A.M.; MIGUENS, M.P. Cambios epidemiológicos observados en un decenio en las dermatofitosis del hospital universitario "12 de Octubre" de Madrid: nuevas especies emergentes. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 101-106, 1999.

101 PEREA, S.; RAMOS, M.J.; GARAU, M.; GONZALEZ, A.; NORIEGA, A.R.; PALACIO, A. del. Prevalence and risk factors of *Tinea unguium* and *Tinea pedis* in the general population in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38(9), p. 3226-3230, 2000.

102 PETRANYI, G.; MEINGASSNER, J.G.; MIETH, H. Activity of terbinafine in experimental fungal infections of laboratory animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31(10), p. 1558-1561, 1987.

103 PETRIKKOU, E.; RODRIGUES-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GÓMEZ, A.; MOLLEJA, A.; MELLADO, E. Inoculum standardization for antifungal

susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39 (4), p. 1345-1347, 2001.

104 PIRACCINI, B.M.; TOSTI, A. White superficial onychomycosis: Epidemiological, clinical, and pathological study of 79 patients. **Archives of Dermatology**, v.140, p. 696-701, 2004.

105 PONTES, Z.B.; LIMA, E.O.; OLIVEIRA, N.M.; SANTOS, J.P.; RAMOS, A.L.; CARVALHO, M.F. Onychomycosis in João Pessoa city, Brazil. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 34, p. 95-99, 2002.

106 PUJOL, I.; GUARRO, J.; LLOPI, C.; SOLER, L.; FERNANDEZ-BALLART, J. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility testes for the filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40 (9), p. 2106-2110, 1996.

107 PUJOL, I.; CAPILLA, J.; TORRES, B.F.; ORTONEDA, M.; GUARRO, J. Use of sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40(7), p. 2618-2621, 2002.

108 RANDHAWA, M.A. The effect of dimetil-sulfoxide (DMSO) on the growth the dermatophytes. **Journal of Medical Micology**, v. 47, p. 313-318, 2006.

109 RANDHAWA, M.A. Sulfoxide (DMSO) inhibits the germination of *Candida albicans* and arthropores of *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Medical Mycology**, v. 49, p. 125-128, 2008.

110 RAO, S.D.; WAVARE, S.; PATIL, S. Onycholysis caused by *Candida krusei*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 22(4), p. 258-259, 2004.

111 REUBEN, A.; ANAISSIE, E.; NELSON, P.E.; LEGRAND, C.; HO, D.H.; BODEY, P. Antifungal susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* species determined by using a broth microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33 (9), p. 1647-1649, 1989.

112 RIBEIRO, L.H.S.; NOVAES, E.M.C.; NEVES, R.G. A unha: Estudo da anatomia, fisiologia e alterações da cor. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 70 (6), p. 567-577, 1995.

113 RICH, P.; HARKELESS, L.B.; ATILLASOY, E.S. Dermatophyte test medium culture for evaluating toenail infections in patients with diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1480-1484, 2003.

114 ROBERTS, D.T. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: results of an omnibus survey. **British Journal of Dermatology**, v. 126 (39), p. 23-27, 1992.

115 RODRIGUES-SOTO, M.E.; FERNANDEZ-ANDREU, C.M.; DUQUE, S.M.; DIAZ, R.M.R.; MARTINEZ-MACHIN, G. Estudio clínico micológico de onicomicosis en ancianos. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35 (3), p. 213-217, 1993.

116 ROMANO, C.; MASSAL, L.; ASTA, F.; SIGINORINI, A.M. Prevalence of dermatophytic skin and nail infections in diabetic patients. **Mycoses**, v. 44, p. 83-86, 2001.

117 RUBIO, M.C.; REZUSTA, A.; TOMÁS, J.G.; RUESCA, R.B. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 16-22, 1999.

118 SANTOS, D.A.; BARROS, M.E.S.; HAMDAN, J.S. Establishing a Method of Inoculum Preparation for Susceptibility Testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 98-101, 2006.

119 SAVIN, C.; HUCK, S.; ROLLAND, C.; BENDERDOUCHE, M.; FAURE, O.; NOACCO, G.; MENOTTI, J.; CANDOLFI, E.; PELLOUX, H.; GRILLOT, R.; COUPE, S.; DEROUIN, F. Multicenter evaluation of a commercial PCR-enzyme-linked

immunosorbent assay diagnostic kit (onychodiag) for diagnosis of dermatophytic onychomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45(4), p. 1205-1210, 2007.

120 SEEBACHER, C.; BRASH, J.; ABEDK, D.; CORNELLY, O.; EFFENDY, I.; GINTER-HANSELMAYER, G.; HAAKE, N.; HAMM, G.; HIPLER, U.C.; HOF, H.; MAYSER, P.; RUHNKE, M.; TIETZ H.J. Onychomycosis. **Mycoses**, v. 50, p. 321-327, 2007.

121 SCHER, R.K. Onychomycosis: therapeutic update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40, p. 21-26, 1999.

122 SHEMER, A.; TRAU, H.; DAVIDOVICI, B.; AMICHAJ, B.; GRUNWALD, M.H. Onychomycosis: Rationalization of Topical Treatment. **IMAJ**, v. 10, p. 415-416, 2008.

123 SIQUERIA, E.R.; FERREIRA, J.C.; MAFFEI, C.M.L.; CANDIDO, R.C. Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39 (3), p. 269-271, 2006.

124 SIQUEIRA, E.R.; FERREIRA, J.C.; PEDROSO, R.S.; LAVRADOR, M.A.S.; CANDIDO, R.C. Dermatophyte susceptibilities to antifungal azole agents tested in vitro by broth macro and microdilution methods. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 1-5, 2008.

125 SUMMERBELL, R.C. Epidemiology and ecology of onychomycosis. **Dermatology**, v. 194, p. 32-36, 1997.

126 SURJUSHE, A.; KAMATH, R.; OBERAI, C.; SAPLE, D.; THAKRE, M.; DHARMSHALE, S.; GOHIL, A. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73 (6), p. 397-401, 2007.

127 SVEJGAARD, E.L.; NILSSON, J. Onychomycosis in Denmark: prevalence of fungal nail infection in general practice. **Mycoses**, v. 47, p. 131-135, 2003.

128 SZEPIETOWSKI, J.C.; REICH, A.; GARLOWSKA, E.; KULI, M.; BARAN, E. Factors influencing coexistence of toenail onychomycosis with *tinea pedis* and other dermatomycosis. **Archives of Dermatology**, v. 142, p. 1279-1284, 2006.

129 TAO-XIANG, N.; ZHI-CHENG, I.; SAO MAO, W.; WEN-ZHU, L. Analysis of dermatomycoses in Lanzhou district of northwestern China. **Mycopathologia**, v.160, p. 281-284, 2005.

130 TORRES-RODRÍGUES, J.M.; MADRENYS-BRUNET, N.; URREA-ARBELÁEZ, A.; LÓPEZ-JODRA, O. Terbinafina por vía oral em el tratamiento de la tinea unguium de los pies. Eficácia entre 12 y 24 semanas de tratamiento. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 160-162, 1998.

131 TORRES-RODRÍGUES, J.M.; JODRA, O.L. Epidemiology of nail infection due keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, p. 122-135, 2000.

132 TOSTI, A.; PIRACCINI, B.M.; STINCHI, C.; LORENZI, S. Onychomycosis due to *Scopulariopsis brevicaulis*: clinical features and response to systemic antifungals. **British Journal of Dermatology**, v. 135, p. 799–802, 1996.

133 TOSTI, A.; PIRACCINI, B.M.; LORENZI, S. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response of 59 cases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, p. 217–224, 2000.

134 TUMBAY, E.; VAROL, A.; KARAMAN, A.; DEMIR, O. Incidence of dermatophytes in the Aegean region in years 1974-1979. **Tuk Mikro Cem Derg**, v.12, p. 70-80, 1982.

135 VEER, P.; PATWARDHAN, N.S.; DAMLE, A.S. Study onychomycosis: prevailing fungi and pattern of infection. **Indian Journal of Dermatology**, v. 25 (1), p. 53-56, 2007.

136 VELEZ, A.; LINARES, M.J.; FERNÁNDEZ-ROLDÁN, J.C.; CASAL, M. Study of onychomycosis in Cordoba, Spain: prevailing fungi and pattern of infection. **Mycopathologia**, v. 137(1), p. 1-8, 1997.

137 VILLARS, V.V.; JONES, T.C. Special features of the clinical use oral terbinafine in the treatment of fungal diseases. **British Journal of Dermatology**, v. 126, p. 61-69, 1992.

138 VIVAS, J.R.C.; TORRES-RODRIGUES, J.M. Sensibilidad de hongos miceliares dematiáceos a diez antifúngicos empleando un método de difusión en agar. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 113-117, 2001.

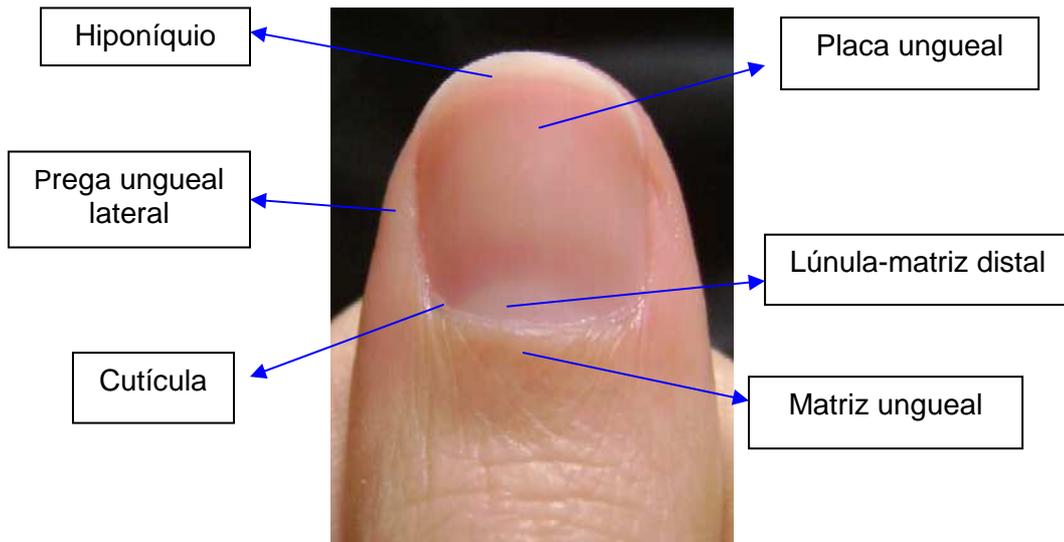
139 ZAKI, S.M.; IBRAHIM, N.; AOYANA, K.; SHETAIA, Y.M.; ABDEL-GHANY, K.; MIKAMI, Y. Dermatophyte Infections in Cairo, Egypt. **Mycopathologia**, 2008.

140 WAGNER, D.K.; SOHNLE, P.G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeast. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8(3), p. 317-335, 1995.

141 WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, RC. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 240-259, 1995.

8 – ANEXOS

Anexo 1: Componentes epidérmicos do aparelho ungueal



Anexo 2: Meios de cultura empregados nesse estudo**a) Ágar Sabouraud dextrose****Composição:**

Peptona _____ 10g
Dextrose _____ 40g
Ágar _____ 20g
Água destilada ____ 1000mL

Preparo:

- Pesar o meio conforme instruções do fabricante;
- Dissolver os constituintes em água;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar até 55°C e distribuir em tubos ou placas estéreis.

b) Ágar Mycosel® (Seletivo)**Composição:**

Peptona _____ 10g
Glicose _____ 10g
Cicloheximida _____ 0,4g
Cloranfenicol _____ 0,05g
Ágar _____ 15,5g
Água destilada _____ 1000mL

Preparo:

- Pesar o meio conforme instruções do fabricante;
- Dissolver os constituintes em água;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar até 55°C e distribuir em tubos estéreis.

c) Ágar Batata dextrose

Composição:

Batata _____	200g
Dextrose _____	15g
Ágar bacteriológico _____	15g
Cloranfenicol _____	0,3g
Água destilada _____	1000mL

Preparo:

- Lavar bem as batatas inglesas e cortar em pedaços grandes com as cascas;
- Cozinhar as batatas em 500mL de água destilada em um béquer, tomando cuidado para não evaporar toda a água durante o cozimento, para isto basta tampar a boca do béquer com papel alumínio. Para o cozimento das batatas basta esperar a água ferver e cozinhá-las por mais 8 a 10 minutos;
- Filtrar todo líquido em gaze utilizando uma proveta de 500 mL e reconstituir o volume final para 500mL;
- Transferir o extrato de batata filtrado para um erlenmeyer, adicionar os demais constituintes do meio e completar o volume para 1000mL;
- Esterilizar em autoclave;
- Resfriar até 55°C e distribuir em tubos estéreis.

d) Meios complementares para identificação de dermatófitos (Requerimento nutricional)

T1: Ágar base caseína

Caseína _____	2,5g
KHPO ₄ _____	1,8g
MgSO ₄ _____	1,0g
Glicose _____	40,0g
Ágar _____	20,0g
Água destilada _____	1000mL

T2: Ágar base caseína inositol

Ágar base caseína _____ 100mL

Solução de inositol _____ 2,0 mL

Solução de inositol: 250mg/100mL de água.

T3: Ágar base caseína com inositol e tiamina

Ágar base caseína _____ 100mL

Solução de inositol _____ 2,0 mL

Solução de tiamina _____ 2,0 mL

T4: Ágar base caseína com tiamina

Ágar base caseína _____ 100mL

Solução de tiamina (10mg/10ml) _____ 2,0 mL

T5: Ágar base nitrato de amônioNH₄NO₃ _____ 1,5gKH₂PO₄ _____ 1,8gMgSO₄ _____ 0,1g

Dextrose _____ 40,0g

Ágar _____ 20,0g

Água _____ 1000mL

Descrição do teste de requerimento nutricional:

- Transferir um fragmento da colônia do dermatófito a ser identificado para tubos T1 a T5;

- O fragmento deve ser do tamanho de uma cabeça de alfinete;
- Evitar transferir fragmentos do meio de cultivo original para o meio nutricional;
- Observar o crescimento após e dias de incubação à temperatura ambiente;
- Atribuir valores de 0 a 4+ de acordo com a quantidade de crescimento observada;
- Comparar com a tabela abaixo.

Espécie	T1 Base	T2 Inositol	T3 Inositol+ tiamina	T4 Tiamina	T5 Ac. nicotínico
<i>T. tonsurans</i>	+/-	+/-	4+	4+	+/-
<i>T. rubrum</i>	4+	4+	4+	4+	4+
<i>T. interdigitale</i>	4+	4+	4+	4+	4+

e) Meio ágar Uréia (CHRISTENSEN)

Preparo:

1. Pesar 2 gramas de ágar e esterilizar em 100ml de água destilada;
2. Pesar 3,9 g de meio uréia e homogeneizar no meio acima (fundido e resfriado a 55°C). Ferver rapidamente no forno de microondas;
3. Distribuir em tubos com tampa rosqueável, estéreis e inclinar (ângulo de 45°).

f) Meio de cultura BCP (Padrão de crescimento fúngico)

Composição:

Meio 1:

Leite em pó _____ 80g

Sol. Alcoólica com 1,6% de púrpura de bromocresol ____ 2mL

Água _____ 1000mL

Meio 2:

Glicose _____ 40,0g

Ágar _____ 30,0g

Água _____ 1000mL

Preparo:

- Dissolver e “cozinhar” o leite em pó na água, com auxílio de agitador automático com aquecimento;
- Esterilizar o Meio 2 separadamente;
- Verter o Meio 2 ao meio com leite cozido;
- Adicionar a solução alcoólica;
- Ferver no forno microondas e distribuir em tubos estéreis.

g) Meio RPMI 1640 (com glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato de sódio) (Sigma-Aldrich).

- O conteúdo do pacote foi dissolvido em 900mL de água destilada, em agitação com barra magnética, mas sem aquecimento;
- Foi adicionada glicose para concentração final de 2% (20g) e 34,5g de MOPS (0,165 M), ajustando para pH 7,0;
- O volume final foi completado para 1000mL e o meio foi esterilizado por filtração em filtro Millipore, membrana com diâmetro de poro de 0,22 μm . Retiramos um pequeno volume para o teste de esterilidade. O restante do volume foi conservado em frasco estéril na geladeira;

Anexo 3: Técnica de microcultivo em lâmina

- 1- Esterilizar placa de Petri contendo uma lâmina apoiada sobre um suporte;
- 2- Em ambiente asséptico (próximo a uma chama), pegar uma placa contendo ágar batata com 4-5 mm de profundidade, e com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, retira-se um pequeno bloco retangular do meio de cultura, com aproximadamente um centímetro quadrado;
- 3- Dispor esse bloco de ágar batata de forma asséptica sobre a lâmina que se encontra acondicionada na placa de Petri;
- 4- Pegar fragmentos da colônia de fungo filamentoso e fazer quatro repiques com auxílio de uma agulha de platina, nas quatro faces do cubo de ágar batata;
- 5- Cobrir com uma lamínula estéril o cubo de ágar batata fazendo uma pequena compressão para aderência da lamínula;
- 6- Incubar em atmosfera úmida, colocando 1 mL de água destilada estéril dentro da placa com uma pipeta, tendo cuidado para não molhar a lâmina que contém o meio de cultura;
- 7- Identificar a placa de Petri com a data e o número do paciente;
- 8- Incubar a placa em temperatura ambiente 27-30°C, até visualização do crescimento fúngico sob a lamínula;
- 9- Para observação microscópica, transfere-se, com uma pinça metálica, a lamínula que esta cobrindo o cubo de ágar batata, para uma nova lâmina adicionada de uma gota de corante lactofenol azul de algodão;
- 10- A observação é realizada em microscópio ótico com aumento de 400x.

Anexo 4: Identificação de dermatófitos

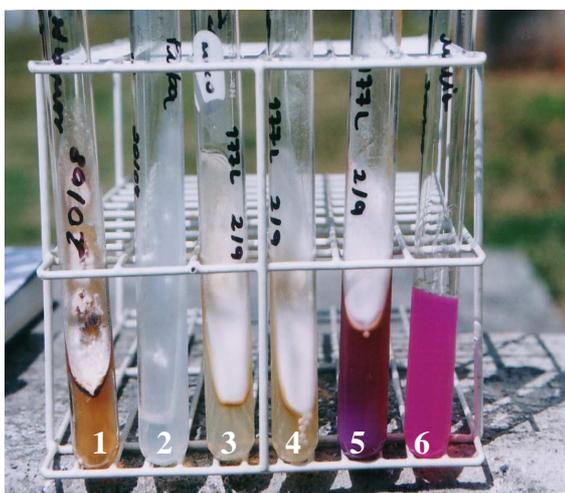
a) Aspectos macroscópicos e microscópicos das espécies de dermatófitos.

Espécie	Colônia	Conídeos	Fotos da micromorfologia
<i>E. floccosum</i>	Coloração amarelada a marrom. Reverso marrom claro.	Apenas macroconídeos com forma de clava arredondadas nas extremidades.	
<i>M. canis</i>	Coloração branco-amarelada, com reverso amarelo escuro.	Numerosos macroconídeos em forma navicular com parede rugosa, com pequenas espículas.	
<i>M. gypseum</i>	Coloração canela a marrom claro. Reverso amarelo claro pardo. Aspecto pulverulento.	Numerosos macroconídeos com formas ligeiramente arredondadas.	
<i>T. rubrum</i>	Colônias brancas, amarelas ou vinho. Reverso vinho. Pigmento vermelho produzido se difunde no meio de cultura.	Microconídeos abundante, em formato piriforme. Macroconídeos em forma de lápis.	
<i>T. tonsurans</i>	Coloração branca, acastanhada. Reverso tende para cor amarela, marrom ou avermelhada. Pigmento avermelhado pode difundir-se no meio. Superfície com aspecto aveludado ou pulverulento.	Macroconídea rara. Pode ser produzida na presença de extrato de levedura. Microconídeos são únicos, irregulares, ovóides ou periformes, são sésseis ou em pedúnculo curto.	
<i>T. interdigitale</i>	Coloração branca a creme. Reverso amarelo, marrom, avermelhado com o tempo. Margem regular, aspecto algodonoso.	Apresenta macroconídeos e hifas em espiral. Numerosos microconídeos esféricos isolados ou em pequenos cachos.	

b) Identificação dos dermatófitos por provas bioquímicas.

Espécie	Meio BCP	Urease	Perfuração do pêlo	Requerimento nutricional
<i>E. floccosum</i>	Cresc. Profuso/Alcalinização	+	–	Não
<i>M. canis</i>	Cresc. Profuso/ sem alteração	+	+	Não
<i>M. gypseum</i>	Cresc. Profuso/ sem alteração	+	+	Não
<i>T. rubrum</i>	Cresc. restrito/ sem alteração	–	–	Não
<i>T. tonsurans</i>	Cresc. Profuso/ alcalinização	+	–	Sim: tiamina
<i>T. interdigitale</i>	Cresc. Profuso/ alcalinização	+	+	Não

c) Figuras das provas bioquímicas realizadas para identificação dos dermatófitos.

1-Identificação de *T. interdigitale*2-Identificação de *T. rubrum*

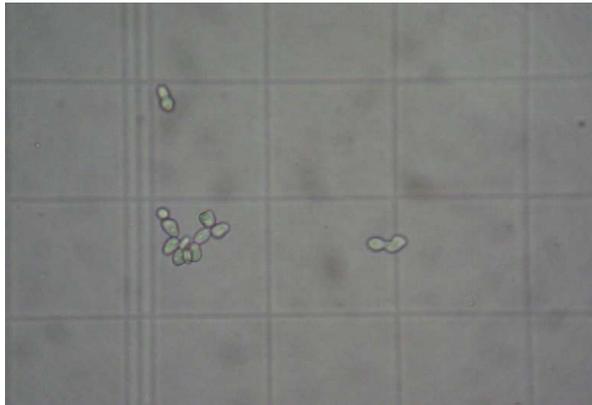
Provas bioquímicas realizadas para a identificação dos fungos dermatófitos. Tubo 1: ASD com cultura positiva para de dermatófito; Tubo 2: prova da pigmentação em ágar batata dextrose; Tubos 3 e 4: prova requerimento nutricional para tiamina; Tubo 5: BCP (padrão de crescimento no meio); Tubo 6: urease.

Anexo 5: Contagem de conídeos em hemocitômetro (Câmara de Neubauer)

a) Contagem de conídeos para *Fusarium* spp.



b) Contagem de conídeos para *Scytalidium* spp.



c) Contagem de conídeos para *Trichophyton* spp.

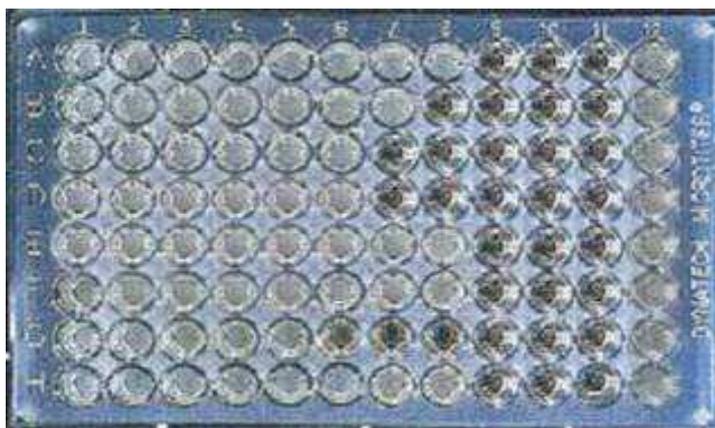


Anexo 6: Contagem de UFC/mL em placas de ágar Sabouraud dextrose



Anexo 7: Montagem da placa de microdiluição para realização do teste de suscetibilidade a drogas antifúngicas.

- As drogas antifúngicas foram dispensadas verticalmente, de modo a se obter concentrações crescentes nos poços das fileiras 1-10 da placa de microdiluição.
- A fileira 11 correspondeu ao controle negativo, onde só foi inoculado o meio de cultura, sem a droga antifúngica e sem o inóculo (Controle de esterilidade da placa de microdiluição).
- A fileira 12 correspondeu ao controle positivo, onde foi distribuído o inóculo do fungo, sem a droga testada.
- Inóculos distribuídos horizontalmente nas placas com as diluições das drogas já previamente preparadas.
- Leituras de A a F das cepas de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos que foram testadas.
- Leituras de G e H das cepas controle (*Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Trichophyton rubrum* ATCC 40051).



Anexo 8: Macrodiluição realizada para confecção da curva de crescimento.

- a) Macrodiluição realizada para o isolado de *S. dimidiatum* 066 para a droga terbinafina.



- b) Macrodiluição realizada para o isolado de *S. dimidiatum* 066 para a droga itraconazol.

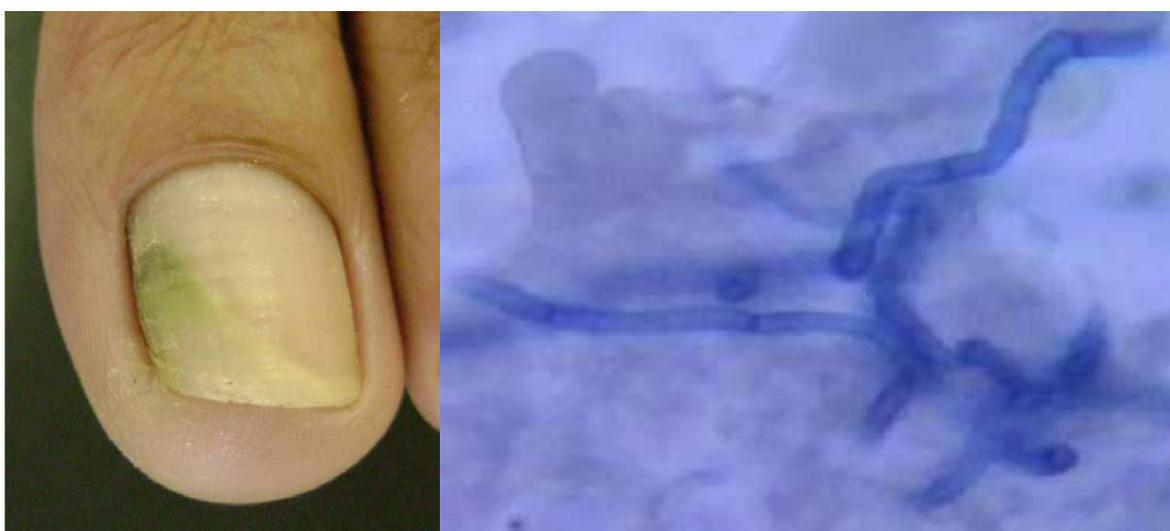


Anexo 9: Aspecto clínico e laboratorial das onicomicoses.

a) Quadro clínico de onicomicose causada por fungos dermatófitos com destruição da queratina ungueal da porção distal (Onicomicose subungueal distal) e exame direto de raspado de unha com hidróxido de potássio (KOH) 20%, demonstrando hifas septadas e arthroconídeos característicos de fungos dermatófitos.



b) Quadro clínico de onicomicose causada por fungos filamentosos não-dermatófitos com coloração amarela opaca da queratina ungueal da porção distal e exame direto de raspado de unha com hidróxido de potássio (KOH) 20%, demonstrando hifas septadas sem arthroconídeos característicos de fungos filamentosos não-dermatófitos. A cultura confirmou *Fusarium solani* como agente etiológico responsável pela infecção ungueal.



Anexo 10: Testes de suscetibilidade de fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos a drogas antifúngicas.

a) Tabela 1 Faixas de variações da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos sete antifúngicos para duas espécies de dermatófitos.

<i>Drogas</i> (faixa testada)	Isolados		
	Dermatófitos (50)	<i>T. rubrum</i> (39)	<i>T. interdigitale</i> (11)
Fluconazol (0,125-64)	0,5- \geq 64	1- \geq 64	0,5- \geq 64
Cetoconazol (0,015-8)	0,03- \geq 8	0,03- \geq 8	0,06-8
Itraconazol (0,007-4)	0,015-1	0,015-1	0,015-0,5
Miconazol (0,03-16)	0,03-1	0,03-0,5	0,06-1
Ciclopirox (0,0035-2)	0,0035-0,015	0,0035-0,015	0,0035-0,015
Terbinafina (0,125-64)	0,125-0,5	0,125-0,5	0,125-0,5
Griseofulvina (0,125-64)	0,125-64	0,5-64	0,125-8

b) Tabela 2: Faixas de variações da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de sete antifúngicos para espécies de fungos filamentosos não-dermatófitos.

AMOSTRAS								
	Filamentoso (50)	<i>S.</i> <i>dimidiatum</i> (12)	<i>F.</i> <i>oxysporum</i> (4)	<i>F. solani</i> (23)	<i>A.</i> <i>fumigatus</i> (2)	<i>A.</i> <i>niger</i> (4)	<i>A.</i> <i>terreus</i> (2)	Outros (3)
FLC	\geq 64	\geq 64	\geq 64	\geq 64	\geq 64	\geq 64	\geq 64	\geq 64
CTC	0,25- \geq 8	0,25- \geq 8	4- \geq 8	2- \geq 8	4- \geq 8	0,5- \geq 8	\geq 8	\geq 8
ITC	0,125- \geq 4	1- \geq 4	0,5- \geq 4	\geq 4	0,25-1	0,5- \geq 4	0,25-1	0,25- \geq 64

MCZ	0,125-≥ 16	0,125-2	0,5-4	0,125- ≥ 16	1	0,5-2	0,25-2	1-≥ 16
CLX	0,007-2	0,007-0,06	0,015-0,25	0,015-0,5	0,03	0,015- 0,25	0,015	0,007-0,25
TRB	0,125-≥ 64	0,125-2	0,5-32	0,125- ≥ 64	0,125- 0,25	0,125- 2	0,25-0,5	0,125-≥ 64
GRI	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64

c) Tabela 3: Valores das CIMs de sete drogas antifúngicas necessárias para inibir 50% e 90% das duas espécies de dermatófitos.

Drogas	Dermatófitos			
		(50)	<i>T. rubrum</i> (39)	<i>T. interdigitale</i> (11)
Fluconazol	CIM 50%	8	8	4
	CIM 90%	32	32	≥64
Cetoconazol	CIM 50%	0,25	0,25	0,25
	CIM 90%	0,5	0,5	8
Itraconazol	CIM 50%	0,125	0,125	0,06
	CIM 90%	0,5	0,5	0,5
Miconazol	CIM 50%	0,125	0,125	0,125
	CIM 90%	0,5	0,5	1
Ciclopirox	CIM 50%	0,007	0,007	0,007
	CIM 90%	0,015	0,007	0,015
Terbinafina	CIM 50%	0,125	0,125	0,125
	CIM 90%	0,125	0,125	0,5
Griseofulvina	CIM 50%	2	4	0,5
	CIM 90%	4	4	8

Anexo 11: Valores de transmitância (T), nº de conídeos e nº de UFC do inóculo, para os fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos.

Tabela 1: Comparação entre valores de T e quantificação do inóculo para *T. rubrum*.

Cepa	Espécie	T (%)	Nº de conídeos/mL antes da diluição em RPMI (hemocitômetro)	Nº de conídeos/mL depois da diluição em RPMI	Nº de UFC /mL
131	<i>T. rubrum</i>	68,9	1,02 x 10 ⁶	1,02 x 10 ⁴	5,0 x 10 ³
158	<i>T. rubrum</i>	69,8	1,32 x 10 ⁶	1,32 x 10 ⁴	4,0 x 10 ³
190	<i>T. rubrum</i>	67	2,17 x 10 ⁶	2,17 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴
445	<i>T. rubrum</i>	65,2	2,65 x 10 ⁶	2,65 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁴
216	<i>T. rubrum</i>	69,5	1,50 x 10 ⁶	1,50 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³
382	<i>T. rubrum</i>	65,8	1,78 x 10 ⁶	2,68 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴
569	<i>T. rubrum</i>	65,3	2,82 x 10 ⁶	2,82 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴
369	<i>T. rubrum</i>	67,7	1,1 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³
233	<i>T. rubrum</i>	68,2	1,7 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴
049	<i>T. rubrum</i>	67,8	1,0 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁴	3,0 x 10 ³
27	<i>T. rubrum</i>	67,9	1,15 x 10 ⁶	1,95 x 10 ⁴	1,75x10 ⁴
136	<i>T. rubrum</i>	69,1	2,52 x 10 ⁶	2,52 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴
084	<i>T. rubrum</i>	65,3	1,03x 10 ⁶	1,03 x 10 ⁴	5,0 x 10 ³
059	<i>T. rubrum</i>	68,7	3,15 x 10 ⁶	3,15 x 10 ⁴	1,35x10 ⁴
597	<i>T. rubrum</i>	67,4	3,68 x 10 ⁶	3,68 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁴
060	<i>T. rubrum</i>	67,4	2,98 x 10 ⁶	2,98 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴
507	<i>T. rubrum</i>	67,4	2,75 x 10 ⁶	2,75 x 10 ⁴	2,35x10 ⁴
493	<i>T. rubrum</i>	65,7	3,11 x 10 ⁶	3,91 x 10 ⁴	3,8 x 10 ⁴
126	<i>T. rubrum</i>	67,4	1,02 x 10 ⁶	1,02 x 10 ⁴	5,0 x 10 ³
490	<i>T. rubrum</i>	68,4	2,50 x 10 ⁶	2,50 x 10 ⁴	1,35 x 10 ⁴
79	<i>T. rubrum</i>	70,5	2,87 x 10 ⁶	2,87 x 10 ⁴	1,75 x 10 ⁴
210	<i>T. rubrum</i>	70,9	1,86 x 10 ⁶	2,36 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴
272	<i>T. rubrum</i>	84,0	1,98 x 10 ⁶	9,9 x 10 ⁴	4,2 x 10 ⁴
197	<i>T. rubrum</i>	70,2	2,56 x 10 ⁶	2,56 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴
226	<i>T. rubrum</i>	82,3	1,05 x 10 ⁶	5,25 x 10 ⁴	9,0 x 10 ³
231	<i>T. rubrum</i>	83,6	1,58 x 10 ⁶	7,9 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁴

600	<i>T. rubrum</i>	67,7	$2,48 \times 10^6$	$2,48 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$
706	<i>T. rubrum</i>	69,7	$2,98 \times 10^6$	$2,98 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$
997	<i>T. rubrum</i>	81,2	$1,92 \times 10^6$	$9,6 \times 10^4$	$5,95 \times 10^4$
113	<i>T. rubrum</i>	65,9	$1,96 \times 10^6$	$1,96 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$
777	<i>T. rubrum</i>	81,5	$1,37 \times 10^6$	$6,85 \times 10^4$	$2,25 \times 10^4$
805	<i>T. rubrum</i>	69,8	$2,96 \times 10^6$	$2,96 \times 10^4$	$3,25 \times 10^4$
952	<i>T. rubrum</i>	85,3	$1,96 \times 10^6$	$9,8 \times 10^5$	$6,75 \times 10^4$
335	<i>T. rubrum</i>	81,9	$2,42 \times 10^6$	$1,21 \times 10^5$	$4,8 \times 10^4$
328	<i>T. rubrum</i>	69,0	$1,62 \times 10^6$	$1,62 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$
559	<i>T. rubrum</i>	68,5	$2,59 \times 10^6$	$2,59 \times 10^4$	$2,45 \times 10^4$
370	<i>T. rubrum</i>	83,8	$2,43 \times 10^6$	$1,22 \times 10^5$	$5,65 \times 10^4$
383	<i>T. rubrum</i>	70,3	$2,64 \times 10^6$	$2,64 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
432	<i>T. rubrum</i>	81,0	$2,05 \times 10^6$	$1,02 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$

b) Tabela 2: Comparação entre valores de T e quantificação do inóculo para *T. interdigitale*.

Cepa	Espécie	T (%)	Nº de conídeos/mL antes da diluição em RPMI (hemocítômetro)	Nº de conídeos/mL depois da diluição em RPMI	Nº de UFC /mL
177	<i>T. interdigitale</i>	69,9	$2,86 \times 10^6$	$2,86 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$
540	<i>T. interdigitale</i>	67,5	$2,80 \times 10^6$	$2,80 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$
812	<i>T. interdigitale</i>	66,5	$3,82 \times 10^6$	$3,82 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$
479	<i>T. interdigitale</i>	65,6	$1,34 \times 10^6$	$1,34 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$
536	<i>T. interdigitale</i>	66,7	$1,03 \times 10^6$	$1,03 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$
150	<i>T. interdigitale</i>	68,9	$1,99 \times 10^6$	$1,99 \times 10^4$	$1,75 \times 10^4$
533	<i>T. interdigitale</i>	68,7	$1,96 \times 10^6$	$1,96 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
293	<i>T. interdigitale</i>	70,0	$2,46 \times 10^6$	$2,46 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
825	<i>T. interdigitale</i>	82,5	$2,65 \times 10^6$	$1,32 \times 10^5$	$6,15 \times 10^4$
446	<i>T. interdigitale</i>	70,5	$1,26 \times 10^6$	$1,26 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$
516	<i>T. interdigitale</i>	85,5	$1,12 \times 10^6$	$5,6 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$

c) Tabela 3: Comparação entre valores de T e quantificação do inóculo para *Scytalidium dimidiatum*.

Cepa	Espécie	T (%)	Nº de conídeos/mL antes da diluição em RPMI (hemocitômetro)	Nº de conídeos/mL depois da diluição em RPMI	Nº de UFC /mL
228	<i>S. dimidiatum</i>	67,6	$1,72 \times 10^6$	$1,72 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
279	<i>S. dimidiatum</i>	68,2	$2,23 \times 10^6$	$2,23 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
606	<i>S. dimidiatum</i>	65,3	$1,28 \times 10^6$	$1,28 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$
781	<i>S. dimidiatum</i>	69,5	$1,92 \times 10^6$	$1,92 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$
066	<i>S. dimidiatum</i>	69,0	$1,54 \times 10^6$	$1,54 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$
093	<i>S. dimidiatum</i>	65,3	$2,05 \times 10^6$	$2,05 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
112	<i>S. dimidiatum</i>	67,8	$2,98 \times 10^6$	$2,98 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$
642	<i>S. dimidiatum</i>	67,2	$1,49 \times 10^6$	$1,49 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$
023	<i>S. dimidiatum</i>	70,7	$1,38 \times 10^6$	$1,38 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$
041	<i>S. dimidiatum</i>	65,0	$1,95 \times 10^6$	$1,95 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$
255	<i>S. dimidiatum</i>	70,5	$1,57 \times 10^6$	$1,57 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$
865	<i>S. dimidiatum</i>	68,1	$1,38 \times 10^6$	$1,38 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$

d) Tabela 4: Comparação entre valores de T e quantificação do inóculo para *Fusarium* spp.

Cepa	Espécie	T (%)	Nº de conídeos/mL antes da diluição em RPMI (hemocitômetro)	Nº de conídeos/mL depois da diluição em RPMI	Nº de UFC /mL
261	<i>F. solani</i>	65,5	$1,57 \times 10^6$	$1,57 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$
277	<i>F. solani</i>	69,9	$1,82 \times 10^6$	$1,82 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
319	<i>F. oxysporum</i>	67,8	$1,98 \times 10^6$	$1,98 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$
881	<i>F. solani</i>	70,5	$1,52 \times 10^6$	$1,52 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$
991	<i>F. solani</i>	67,2	$1,40 \times 10^6$	$1,40 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$
067	<i>F. solani</i>	65,7	$2,78 \times 10^6$	$2,78 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$
078	<i>F. solani</i>	70,7	$1,52 \times 10^6$	$1,52 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
133	<i>F. oxysporum</i>	67,9	$1,2 \times 10^6$	$1,20 \times 10^4$	$1,15 \times 10^4$
152	<i>F. solani</i>	70,0	$1,77 \times 10^6$	$1,77 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$
355	<i>F. solani</i>	66,6	$1,14 \times 10^6$	$1,14 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$

474	<i>F. solani</i>	70,3	$1,93 \times 10^6$	$1,93 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$
504	<i>F. solani</i>	70,7	$2,52 \times 10^6$	$2,52 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
874	<i>F.oxysporum</i>	68,9	$3,10 \times 10^6$	$3,10 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$
687	<i>F. solani</i>	66,8	$1,27 \times 10^6$	$1,27 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
043	<i>F. solani</i>	69,3	$1,34 \times 10^6$	$1,34 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$
047	<i>F. solani</i>	67,8	$1,95 \times 10^6$	$1,95 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$
104	<i>F. solani</i>	70,3	$2,35 \times 10^6$	$2,35 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
234	<i>F. solani</i>	70,1	$2,57 \times 10^6$	$2,57 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
185	<i>F. solani</i>	68,4	$1,58 \times 10^6$	$1,58 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$
273	<i>F. solani</i>	66,5	$1,11 \times 10^6$	$1,11 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$
274	<i>F. solani</i>	69,0	$1,36 \times 10^6$	$1,36 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$
329	<i>F.oxysporum</i>	64,9	$1,00 \times 10^6$	$1,00 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$
332	<i>F. solani</i>	68,0	$1,31 \times 10^6$	$1,31 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$
845	<i>F. solani</i>	69,3	$2,48 \times 10^6$	$2,48 \times 10^4$	$2,65 \times 10^4$
412	<i>F. solani</i>	65,4	$1,57 \times 10^6$	$1,57 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
419	<i>F. solani</i>	67,7	$1,02 \times 10^6$	$1,02 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$
423	<i>F. solani</i>	69,9	$1,35 \times 10^6$	$1,35 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$

e) Tabela 5: Comparação entre valores de T e quantificação do inóculo para *Aspergillus* spp.

Cepa	Espécie	T (%)	N° de conídeos/mL antes da diluição em RPMI (hemocitômetro)	N° de conídeos/mL depois da diluição em RPMI	N° de UFC /mL
38	<i>A. fumigatus</i>	80,0	$2,04 \times 10^6$	$1,02 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$
290	<i>A. niger</i>	65,2	$2,89 \times 10^6$	$2,89 \times 10^4$	$1,55 \times 10^4$
365	<i>A. niger</i>	65,6	$2,98 \times 10^6$	$2,98 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
145	<i>A. terreus</i>	85,5	$3,43 \times 10^6$	$1,75 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
864	<i>A. niger</i>	65,9	$2,03 \times 10^6$	$2,03 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
015	<i>A. terreus</i>	65,5	$2,56 \times 10^6$	$2,56 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$
203	<i>A. niger</i>	69,5	$1,42 \times 10^6$	$1,42 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$
349	<i>A. fumigatus</i>	70,7	$1,46 \times 10^6$	$1,46 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$

f) Tabela 6: Comparação entre valores de T e quantificação do inóculo para fungos dos gêneros *Curvularia*, *Scedosporium* e *Aureobasidium*.

Cepa	Gênero	T (%)	N° de conídeos/mL antes da diluição em RPMI (hemocitômetro)	N° de conídeos/mL depois da diluição em RPMI	N° de UFC /mL
713	<i>Curvularia</i> spp.	82,5	$3,50 \times 10^6$	$1,75 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4$
490	<i>Scedosporium</i> spp.	68,9	$1,17 \times 10^6$	$1,17 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$
737	<i>Aureobasidium</i> spp.	68,3	$1,66 \times 10^6$	$1,66 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$

