

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL DE SAÚDE PÚBLICA

FÁBIO SILVESTRE ATAÍDES

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE FUNGOS
CAUSADORES DE ONICOMICOSE

Goiânia – GO, 2010

FÁBIO SILVESTRE ATAÍDES

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE FUNGOS
CAUSADORES DE ONICOMICOSE**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Tropical, na área de concentração de Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Goiânia – GO, 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

A862i Ataides, Fábio Silvestre.
Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de fungos causadores de onicomicose [manuscrito] / Fábio Silvestre Ataides. - 2010.
64 f. : figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.
Bibliografia: f.45-60
Inclui lista de figuras, tabelas, abreviaturas, símbolos e unidades.
Anexos.

1. *Candida* spp 2. Fungos filamentosos. 3. Suscetibilidade antifúngica. 4. Epidemiologia. I. Título.

CDU: 602.3:582.281.21

"... e nossa história não estará pelo avesso assim, sem final feliz,
teremos coisas bonitas pra contar,
e até lá, vamos viver,
temos muito ainda por fazer,
não olhe pra trás, apenas começamos,
o mundo começa agora,
apenas começamos..."

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. Quando damos conta, são pilares na trajetória de nossas vidas.

Dedico este trabalho a três dessas pessoas que, muito para ele contribuíram. Aos meus pais: Pedro, Odete e Tia Leona, vocês me ensinaram a descobrir o valor da disciplina, da persistência e da responsabilidade, indispensáveis para a construção e conquista do meu projeto de vida.

AGRADECIMENTOS

As dificuldades não foram poucas...

Os obstáculos, muitas vezes, pareciam intransponíveis.

Agora, ao olhar para trás, a sensação de mais uma etapa cumprida se faz presente e posso constatar que a ansiedade em querer fazer e a angústia de muitas vezes não o conseguir, não foram em vão. E somente Deus, Ser Supremo e Superior poderia me dar forças para vencer essa batalha, com dignidade e perseverança, e mostrar que mereço esse presente tão abençoado que me deu: a vida.

Ao meu pai Pedro, minha mãe Odete, Tia Leona e meu irmão Flávio, agradeço a vocês pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter como base dos meus ideais e sonhos, pessoas como vocês, mas também por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas do meu crescimento profissional e pessoal.

Aos queridos familiares, que sempre acreditaram nos meus objetivos. Saibam que pequenos gestos tornam-se grandes demonstrações de apoio. Obrigado por tudo!

À querida professora e orientadora Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva, pela simpatia e paciência que sempre demonstrou desde quando comecei a participar das atividades do laboratório. As palavras se tornam escassas para tentar explicar a satisfação e o orgulho em tê-la como orientadora. Sua simplicidade e dedicação foram fundamentais na realização deste projeto. Meus sinceros agradecimentos, não somente no campo profissional, mas, especialmente pela confiança, amizade e carinho nas palavras do dia a dia.

À professora Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza, que esteve presente na minha graduação, na especialização e agora no mestrado e que construiu a base dos meus conhecimentos em micologia, muito obrigado pela dedicação e amizade!

À professora Dra. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes, que além dos seus ensinamentos, sempre deixou claro que "... quem não trabalha não atrapalha..."

Ao sempre dedicado e amigo Flávio, meu sincero agradecimento pela amizade nas conversas e pelo apoio técnico na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, agradeço a todos que, de alguma forma participaram na realização deste trabalho, em especial: Maysa, Carolina, Hildene, Gustavo, Núbia, Milton, Murilo, Mayara e Cícero.

Aos meus grandes amigos, inseparáveis em todos os momentos, Tânia Franco e William Júnior, saibam que essa vitória também é de vocês.

Aos residentes do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas/UFG, Dr. Marco Henrique, Dra. Lorena, Dr. Bones e Dra. Fernanda, por encaminhar os pacientes para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP/UFG, pela oportunidade e por acreditar no projeto e permitir sua realização.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Todos os valores nos quais acredito, aprendi durante o convívio com muitas pessoas. Algumas delas apenas passaram pela minha vida e logo se foram, algumas outras foram tão importantes que sempre terão um espaço reservado em minhas boas lembranças, algumas outras seguem e seguirão comigo, mas todas serão únicas. A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho, para vocês, ofereço estas palavras...

Muito obrigado a todos.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADE	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
 1 INTRODUÇÃO	 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Características da Unha	3
2.2 Onicomicose	4
2.2.1 Aspectos Clínicos.....	4
2.2.2 Epidemiologia	6
2.2.3 Etiologia das Onicomicoses	7
2.2.3.1 Dermatófitos	7
2.2.3.2 Leveduras.....	10
2.2.3.3 Fungos Filamentosos não-Dermatófitos	11
2.2.4 Tratamento	14
2.3 Testes de Suscetibilidade In Vitro	16
 3 OBJETIVOS.....	 18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
 4 MATERIAL E MÉTODOS.....	 19
4.1 Pacientes	19
4.2 Diagnóstico Laboratorial.....	19
4.2.1 Colheita do Material Clínico	19
4.2.2 Exame Direto com Hidróxido de Potássio 20%.....	20
4.2.3 Isolamento e Características Macroscópicas e Microscópicas das Colônias.....	20
4.2.4 Testes Adicionais para Identificação de Dermatófitos	20
4.2.4.1 Microcultivo em Lâmina	20

4.2.4.2 Teste da Hidrólise da Uréia.....	21
4.2.4.3 Teste de Perfuração do Pêlo <i>In Vitro</i>	21
4.2.5 Identificação de Leveduras.....	21
4.2.6 Identificação dos Fungos Filamentosos não Dermatofíticos.....	22
4.3 Teste de Suscetibilidade In Vitro	22
4.3.1 Microdiluição em Caldo para Dermatófitos e FFND	22
4.3.1.1 Agentes Antifúngicos	23
4.3.1.2 Preparação do Inóculo	23
4.3.1.3 Procedimento do Teste.....	23
4.3.1.4 Incubação e Interpretação dos Resultados	24
4.3.2 Microdiluição em Caldo para Leveduras	24
4.3.2.1 Agentes Antifúngicos	24
4.3.2.2 Preparação do Inóculo	25
4.3.2.3 Procedimento do Teste.....	25
4.3.2.4 Incubação e Interpretação dos Resultados	25
4.3.3 Controle de Qualidade.....	25
5 RESULTADOS.....	26
5.1 Caracterização dos Pacientes com Onicomicose	26
5.1.1 Gênero.....	26
5.1.2 Idade.....	26
5.1.3 Localização das Lesões	27
5.1.4 Profissão.....	28
5.2 Identificação dos Fungos	29
5.2.1 Leveduras	29
5.2.2 Dermatófitos.....	31
5.2.3 Fungos Filamentosos não Dermatofíticos	33
5.3 Manifestações Clínicas.....	34
5.4 Testes de Suscetibilidade In Vitro	35
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÕES	44
8 REFERÊNCIAS	45
9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA:	61
Artigo: Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection	61
10 ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura anatômica do aparelho ungueal.....	3
Figura 2. Aspecto clínico da onicomicose subungueal distal lateral.....	4
Figura 3. Aspecto clínico da onicomicose subungueal proximal.....	5
Figura 4. Aspecto clínico da onicomicose superficial branca.....	5
Figura 5. Aspecto clínico da onicomicose distrófica total.....	6
Figura 6. Procedimento de colheita do raspado subungueal em pacientes com suspeita clínica de onicomicose.....	19
Figura 7. Microcultivo em lâmina: placa de Petri contendo meio de cultura com crescimento fúngico.....	21
Figura 8. Esquema do procedimento para a realização do teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição em caldo.....	24
Figura 9. Distribuição percentual de acordo com o gênero em 95 pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.....	26
Figura 10. Distribuição percentual de onicomicose de acordo com a idade de 95 pacientes atendidos no Depto.Dermatol./HC/UFG.....	26
Figura 11. Distribuição percentual de onicomicose de acordo com o gênero e a localização da lesão em 95 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.....	28
Figura 12. Distribuição percentual das principais atividades profissionais segundo relato das pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.....	28
Figura 13. Leveduras arredondadas com blastoconídios (A) e pseudohifas (B) de raspado subungueal dos pés visualizados ao exame micológico direto com KOH a 20% (400x).....	29
Figura 14. Aspecto macroscópico de leveduras dos gêneros <i>Candida</i> sp (A), <i>Rhodotorula</i> sp (B) e <i>Trichosporon</i> sp (C) cultivadas em meio de ágar Sabouraud dextrose.....	29
Figura 15. <i>Candida albicans</i> . A - Colônia verde em CHROMagar Candida™ B - Clamidoconídios terminais (400x). C - Tubo germinativo (1000x).....	30
Figura 16. Distribuição percentual das leveduras isoladas de lesões de unhas de 95 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.....	30
Figura 17. Exame micológico direto com KOH 20% de raspado subungueal mostrando artroconídios (A) e filamentos hialinos regulares (B) (400x).	31
Figura 18. <i>Trichophyton rubrum</i> . A - Aspecto macroscópico: colônias algodonosas brancas de pigmento avermelhado B - Aspecto microscópico: hifas septadas hialinas e microconídios dispostos em acladio (400x).....	31

- Figura 19. *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. A - Aspecto macroscópico: colônia pulverulenta branco-amarelada. B - Aspecto microscópico: hifas em espiral e microconídios agrupados (400x). 32
- Figura 20. *Trichophyton mentagrophytes*. A - hidrólise da uréia: tubo amarelo → controle negativo; tubo rosa → hidrólise positiva. B – Microscopia do pêlo mostrando órgãos perfuradores ao longo do fio de cabelo (400x). 32
- Figura 21. *Microsporon gypseum*. A - Aspecto macroscópico: colônia pulverulenta com bordas pregueadas. B - Aspecto microscópico: hifas septadas hialinas e macroconídios fusiformes septados, parede rugosa e extremidade arredondada (400x). 33
- Figura 22. Distribuição percentual de 18 isolados de FFND obtidos de 95 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG. 33
- Figura 23. Onicomicose subungueal distal lateral observada em um paciente com lesões ungueais por dermatófitos..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de 136 amostras obtidas de raspado subungueal de 114 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG, de acordo com o local de lesão.....	27
Tabela 2. Distribuição dos 108 isolados de amostras de unhas de 95 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG de acordo com o gênero e o local de infecção.	34
Tabela 3. Classificação clínica de 108 lesões procedentes de 95 pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG de acordo com os agentes etiológicos identificados.	35
Tabela 4. Atividade <i>in vitro</i> de quatro agentes antifúngicos para 59 isolados de leveduras obtidos de pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.....	36
Tabela 5. Atividade <i>in vitro</i> de quatro agentes antifúngicos para 31 isolados de dermatófitos obtidos de pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.....	37
Tabela 6. Atividade <i>in vitro</i> de três agentes antifúngicos para 18 isolados de FFND obtidos de pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADE

ASD	Ágar Sabouraud dextrose
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FFND	Fungo filamentoso não dermatofítico
HC	Hospital das Clínicas
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
KOH	Hidróxido de potássio
MOPS	Ácido morfolinopropanossulfônico
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OSDL	Onicomicose subungueal distal lateral
OSP	Onicomicose subungueal proximal
OSB	Onicomicose superficial branca
OT	Onicodistrófica total
pH	Potencial hidrogeniônico
RPMI	<i>Meio Roswell Park Memorial Institute</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UFG	Universidade Federal de Goiás
°C	Grau Celsius

RESUMO

Onicomicose é a infecção da unha causada por amplo espectro de espécies fúngicas, incluindo leveduras, dermatófitos e fungos filamentosos não dermatofíticos (FFND). Neste trabalho, foram estudados pacientes com lesões de unhas atendidos no Departamento de Dermatologia, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, os quais foram submetidos a exames micológicos. Os agentes etiológicos identificados foram avaliados em testes de atividade *in vitro* para agentes antifúngicos sistêmicos. Durante o período de março de 2008 a março de 2009, foram examinados 114 pacientes com suspeita clínica de onicomicose. As amostras de unhas coletadas foram submetidas ao exame direto com hidróxido de potássio 20% e cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e ágar específico para fungos patogênicos. O teste de suscetibilidade antifúngico foi realizado de acordo com o método de microdiluição em caldo, preconizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), através dos documentos M38-A e M27-A2. O diagnóstico de onicomicose foi estabelecido em 83,3% (95/114) dos pacientes, dos quais a maioria era constituída por indivíduos do gênero feminino e com idade entre 40-59 anos. Os fungos isolados foram identificados como leveduras em 54,6%, dermatófitos em 28,7%, e FFND em 16,7%. Entre as leveduras, *Candida parapsilosis* (52,5%) foi o agente etiológico mais comum; entre os dermatófitos, *Trichophyton rubrum* foi o mais encontrado (74,2%) e, entre os FFND, *Fusarium* spp foi o gênero mais frequentemente isolado (44,4%). Lesões subungueal distal e lateral foram predominantes nos casos de onicomicose por todos os agentes identificados, mostrando que não havia correlação com a clínica e a etiologia. Embora a maioria dos isolados tenha se mostrado suscetível aos diferentes antifúngicos estudados, cinco isolados de *Candida* foram resistentes; um ao voriconazol, um ao itraconazol e três a anfotericina B. O perfil de suscetibilidade *in vitro* para dermatófitos foi semelhante para cada antifúngico analisado. A concentração inibitória mínima (CIM) de itraconazol, cetoconazol e griseofulvina para 50% dos isolados foram menores do que 1 µg/mL, e para terbinafina foi extremamente baixa, com concentração 0,015 µg/mL para 90% dos isolados. A CIM para o itraconazol foi de 16 µg/mL em 90% dos isolados de FFND, e para anfotericina B e voriconazol obteve-se uma concentração de 8 µg/mL. Em resumo, este estudo demonstrou uma maior frequência de onicomicose em mulheres, sendo que os principais fungos envolvidos nesta infecção foram *Candida* spp e dermatófitos, com emergência de FFND, em especial do gênero *Fusarium*. Além disso, em decorrência da resistência observada a alguns antifúngicos, demonstrou-se a necessidade do uso dos testes de suscetibilidade para estes fungos.

ABSTRACT

Onychomycosis is the nail infection caused by a wide spectrum of fungi species, including yeasts, dermatophyte and filamentous fungi nondermatophytes (FFND). In this work, patients with lesions nails from Dermatology Department in Clinics Hospital of the Federal University of Goiás were studied. These patients were submitted to mycologic tests and the etiologic agents identified were evaluated on *in vitro* activity for systemic antifungal agents. During the period of March 2008 to March 2009, 114 patients clinically suspected of having onychomycosis were examined. The nail samples collected were submitted to direct examination with potassium hydroxide 20% and grown in dextrose Sabouraud agar and specific fungal pathogens agar. The antifungal susceptibility test was performed according to the method of broth microdilution, recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), through M38-A and M27-A2 documents. The onychomycosis diagnosis was established in 83.3% (95/114) patients, of which most were women between 40 to 59 years old. The isolated fungi were identified as yeasts in 54.6%; dermatophytes in 28.7%; and filamentous fungi nondermatophytes in 16.7%. Among yeasts, *Candida parapsilosis* was the most common etiologic agent (52.5%); among dermatophytes, *Trichophyton rubrum* was the most found (74.2), and among the filamentous fungi nondermatophytes, *Fusarium* spp was the most isolated genus (44.4%). Both distal and lateral subungual lesions were predominant in cases of onychomycosis by all the agents identified, showing that there was no correlation with the clinical presentation and etiology. Although most of the isolates have showed susceptible to several antifungal agents studied, five *Candida* spp strains were resistant; one to voriconazole, one species to itraconazole and three to amphotericin B. The *in vitro* susceptibility testing profile for dermatophytes was similar for each antifungal agent analyzed. The minimal inhibitory concentration (MIC) of itraconazole, ketoconazole and griseofulvin for 50% of isolates were lower than 1 µg/mL, and terbinafine was extremely low, with concentration 0.015 µg/mL for 90% of isolates. The MIC for itraconazole in 90% isolates of FFND was 16 µg/mL, while for amphotericin B and voriconazole was 8 µg/mL. In summary, this study showed a higher frequency of onychomycosis in women. *Candida* spp and dermatophytes with FFND emergence, especially of the genus *Fusarium*, were the main fungi involved. Besides, the presence of resistant fungi to some antifungal agents showed the need of using susceptibility tests for these fungi.

1 INTRODUÇÃO

Onicomicose é uma infecção fúngica que atinge as unhas das mãos e/ou dos pés, sendo responsáveis por cerca de 50% de todas as infecções que acometem as unhas (Veer et al. 2007; Souza et al. 2009), atingindo aproximadamente 5% da população mundial (Kaur et al. 2008a). Entre os agentes etiológicos destacam-se os dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatofíticos (FFND) (Vinod 2006; Lorizzo et al. 2007; Seebacher et al. 2007).

O aumento da frequência de onicomicose tem sido atribuído a vários fatores predisponentes. Entre estes se destacam angiopatia, neuropatia periférica, uso de sapatos fechados, deformidade nas unhas, traumas recorrentes, predisposição genética e distúrbios metabólicos como diabetes mellitus. Pacientes infectados pelo Human immunodeficiency vírus (HIV) podem ser mais acometidos quando comparados com a população não infectada (Torrez-Rodrigues & López-Jodra 2000; Albert & Weis 2004; McCarthy 2004; Finch & Warshaw 2007; Veer et al. 2007; Kaur et al. 2008a; Hof 2009).

As onicomicoses podem se desenvolver com dor levando a dificuldade na realização das atividades diárias, gerando um desconforto físico e psicológico, que interfere de modo significativo com o bem estar e qualidade de vida dos pacientes (Sehgal & Jain 2000; Straten et al. 2003; Szepietowski et al. 2007; Shirwaikar et al. 2008). As manifestações clínicas são caracterizadas por uma reação de hiperqueratose subungueal, inflamação das pregas ungueais, alteração de cor, onicólise e distrofias, podendo evoluir para uma destruição gradual de toda a placa ungueal (Torrez-Rodrigues & López-Jodra 2000; Hay 2005; Seebacher et al. 2007; Sehgal et al. 2007).

O diagnóstico laboratorial das onicomicoses é considerado de grande importância, pois não é possível definir uma infecção fúngica somente pelas características clínicas das lesões (Torrez-Rodrigues & López-Jodra 2000; Kioshima et al. 2002; Mahoney et al. 2003; Scher et al. 2007). A correta identificação do agente etiológico pode auxiliar na escolha mais apropriada do tratamento, evitando com isso as recidivas desta infecção fúngica (Mahoney et al. 2003; Lorizzo et al. 2007).

Vários antifúngicos como cetoconazol, clotrimazol, griseofulvina, itraconazol e terbinafina são utilizados no tratamento das onicomicoses, no entanto observa-se que alguns pacientes não conseguem responder adequadamente às terapias utilizadas (Gupta & Tu 2006). Entre os fatores que influenciam na escolha do tratamento são incluídos a gravidade e forma

clínica da doença, o uso prévio de antifúngicos e sua resposta clínica e o custo financeiro da terapia (Gupta et al. 2003a).

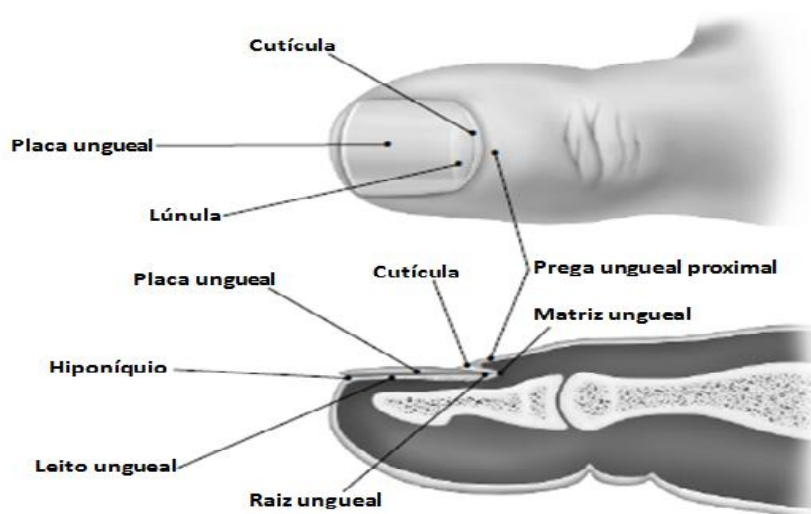
Falhas no diagnóstico, constantes recidivas e dificuldades no tratamento das onicomicoses objetivaram neste estudo, o isolamento e identificação das principais espécies fúngicas envolvidas nesta infecção e a avaliação do perfil de suscetibilidade *in vitro* para dermatófitos, leveduras e FFND aos principais antifúngicos utilizados no tratamento de infecções fúngicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características da Unha

A unha é um anexo cutâneo, formada por uma substância protéica chamada de queratina, que se localiza na superfície dorsal da falange distal dos dedos das mãos e dos pés (Junqueira & Carneiro 2004). Estas estruturas desempenham um importante papel na função de proteção dos dedos, destreza ao manipular objetos e são consideradas parte integrante da estrutura sensorial da mão (Torres-Rodrigues & López-Jodra 2000; Haneke 2006).

O aparelho ungueal (Figura 1) é composto pelas seguintes estruturas:



Fonte: Rodgers & Bassler 2001

Figura 1. Estrutura anatômica do aparelho ungueal.

A matriz ou raiz é responsável pelo crescimento da unha, localizada na porção proximal, sendo formada por células epiteliais que se dividem e diferenciam-se, produzindo a queratina da unha. A matriz é recoberta pelo eponíquio, conhecido popularmente como cutícula, que é uma prega estreita de queratina mole, constituída pelo estrato córneo da pele. A placa ungueal é limitada pelas pregas ungueais proximais e laterais, sendo que junto às proximais encontra-se a lúnula, que corresponde à porção mais distal da matriz ungueal. O leito ungueal é a parte do dedo visualizada através da transparência da unha que se encontra firmemente aderido à placa ungueal. As pregas ungueais laterais representam a continuação da porção epitelial dos dedos e se unem medialmente com o leito ungueal. Sob a parte livre da lâmina ungueal, representando a porção distal, está o hiponíquio, que é formado pelo espaço subungueal e o epitélio que forma a base da unha (Di Dio 1999; Junqueira & Carneiro 2004; Dangelo & Fattini 2007).

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 consequências do aumento da idade, e em alguns casos são marcadas por distúrbios distróficos, principalmente nas unhas dos pés. Essas alterações das unhas podem levar a perda de funções normais tornando-se mais propensas a agressões, incluindo infecções por várias espécies de fungos (Torres-Rodríguez & López-Jodra 2000).

2.2 Onicomicose

2.2.1 Aspectos Clínicos

As manifestações das onicomicoses podem variar de acordo com a localização da lesão, extensão do comprometimento e coloração (Elewski 1998; Ballesté et al. 2003; Alberhasky et al. 2004; Seebacher et al. 2007; Kaur et al. 2008b).

- a) Onicomicose subungueal distal e lateral: é a forma mais comum da infecção. O organismo infectante invade o leito da unha, começando pelo hiponíquio e então migra para a região proximal da unha através da matriz subjacente. Ocorre uma hiperqueratose subungueal, causando o destacamento e a coloração amarelada da lâmina da unha (Figura 2);



Figura 2. Aspecto clínico da onicomicose subungueal distal lateral

- b) 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 podendo observar uma reação iunflamatória leve, onicólise proximal, leuconíquia e destruição da lâmina na região proximal (Figura 3). A infecção também pode ocasionalmente surgir de traumas secundários e afeta igualmente unhas dos dedos das mãos e dos pés;

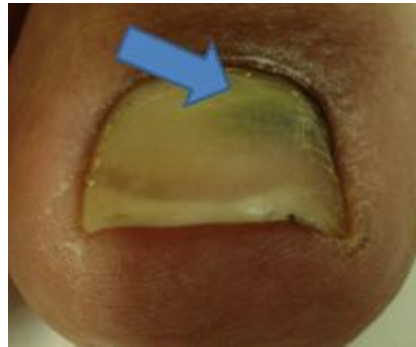


Figura 3. Aspecto clínico da onicomicose subungueal proximal

- c) Onicomicose superficial branca: Os fungos invadem diretamente a camada superficial da lâmina da unha, podendo ser reconhecida pela presença de uma região bem delineada opaca na lâmina externa da unha, caracterizada pela localização superficial do fungo na superfície dorsal da lâmina ungueal. Quando a infecção progride, as regiões opacas coalescem e a unha se torna áspera e mole (Figura 4);



Figura 4. Aspecto clínico da onicomicose superficial branca

- d) Onicomicose distrófica total: representa a evolução das lesões, que se caracteriza pela fragilização e queda de todas as lâminas ungueais, persistindo apenas alguns restos de queratina aderida ao leito ungueal (Figura 5).



Figura 5. Aspecto clínico da onicomicose distrófica total

2.2.2 Epidemiologia

A disseminação e persistência de onicomicoses são responsáveis pelo aumento de sua incidência em várias regiões estudadas (Sarma et al. 2008). Trabalhos realizados no Brasil mostraram uma prevalência de onicomicose de 52% em 976 pacientes no estado do Ceará (Brilhante et al. 2005); no estado de Pernambuco, Lima et al. (2008a) mostraram uma positividade de 58% em 288 amostras de escamas ungueais; em São Paulo, de 588 pacientes analisados, foi confirmado o diagnóstico de onicomicose em 42% (Godoy-Martinez et al. 2009) e Souza et al. (2009) mostraram que em Goiás, houve uma prevalência de 56,4% em 2273 pacientes com suspeita clínica de onicomicose.

A ocorrência de onicomicose aumenta de acordo com a idade da população estudada, observando uma maior predominância em pessoas maiores de 40 anos (Araújo et al. 2003b; Arrese et al. 2005; Hof 2009). Djeridane et al. (2006), demonstraram um maior número de pacientes com onicomicose entre 50-59 anos; Souza et al (2009) verificaram uma maior porcentagem de casos entre 40 e 49 anos; enquanto Godoy-Martinez et al. (2009) verificaram um percentual de 31,5% entre pacientes de 46 a 60 anos.

Onicomicose em crianças é pouco freqüente, sendo que o índice pode atingir aproximadamente 0,16% (Jain & Sehgal 2000). A prevalência de 0,1% de onicomicose em 23235 crianças de escolas primárias foi relatada em Manisia-Turquia (Gunduz et al. 2006) e de 0,87%, em 1148 crianças israelitas (Leibovici et al. 2009). Esta baixa freqüência pode ser explicada por inúmeros fatores como crescimento rápido da unha, menor área de contato para o fungo se instalar, baixa ocorrência de traumas, baixa freqüência de *tinea pedis* e menor contato com o micro-organismo (Arenas & Ruiz-Esmenjaud 2004).

A freqüência de onicomicose em unhas dos pés e das mãos pode variar de acordo com o gênero (Dorko et al. 2002; Ellabib et al. 2002; Brilhante et al. 2005; Souza et al. 2007). Esta

diferença é comprovado por Sayed et al. (2006) e Souza et al. (2009), que demonstraram que onicomicose nas unhas dos pés foram mais frequentes em pessoas do gênero masculino, e nas unhas das mãos em pessoas do gênero feminino

Existem alguns fatores que podem interferir na prevalência de onicomicose. Algumas endocrinopatias como diabetes mellitus predispõem à instalação de infecções fúngicas nas unhas (Torres-Rodríguez & López-Jodra 2000; Saunte et al. 2006; Hof 2009). A prevalência de 17% de onicomicose em pessoas diabéticas, comparado com 6,8% na população normal, demonstra que os indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 possuem risco 2,5 vezes maior de desenvolver onicomicose, em comparação com pessoas normais (Dogra et al. 2002). Esta maior frequência de onicomicose em pacientes diabéticos pode ser explicada, por uma maior sensibilidade a necrose tecidual na região plantar, nos dedos e nas unhas (Gayosso et al. 2008); e além disso a maior ocorrência de infecções fúngicas superficiais em outros sítios anatómicos observados nestes paciente podem favorecer a instalação de onicomicose (Gupta & Hunke 2000; Dogra et al. 2002).

Em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), as onicomicoses podem apresentar variações nas formas clínicas, na sua etiologia e na resposta à terapêutica fúngica convencional (Barber et al. 2006). Geralmente ocorre uma infecção de manifestação clínica grave, causada por fungos emergentes, e normalmente com uma resposta terapêutica pouco eficaz. A prevalência das onicomicoses nestes pacientes pode variar entre 15-40%, sendo que índices elevados são observados em indivíduos que apresentam declínio na contagem de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico (Michelim et al. 2004; Raju et al. 2005).

Em relação a outros fatores de risco tem sido observado que a exposição a traumas, uso de sapatos fechados e um crescimento lento das unhas induz a maior porcentagem de lesões ungueais por fungos (Martelozo et al. 2005; Mügge et al. 2006).

2.2.3 Etiologia das Onicomicoses

2.2.3.1 Dermatófitos

Dermatófitos são fungos filamentosos, septados e hialinos que possuem a capacidade de invadir tecidos queratinizados, como pele, pêlo e unha de humanos e animais, desenvolvendo infecções denominadas de dermatofitoses ou *tineas* (Hay 1992; Weitzman & Summerbell 1995). As onicomicoses causadas por dermatófitos são denominadas *tinea unguium*, sendo que estes fungos são responsáveis por cerca de 80 a 90% destas infecções

(Weitzman & Summerbell 1995; Torres-Rodrigues & López-Jodra 2000; Seebacher et al. 2007).

As espécies de dermatófitos são classificadas em geofílicas, zoofílicas e antropofílicas de acordo com o habitat natural. Os geofílicos são comumente encontrados no solo e são menos frequentemente encontrados causando infecções fúngicas humanas. Zoofílicos são espécies que colonizam primariamente animais, mas são responsáveis por cerca 30% das dermatofitoses humanas com inflamação aguda. As espécies antropofílicas são adaptadas ao homem, não colonizam animais e são responsáveis por cerca de 70% das dermatofitoses humanas. Pelo fato de serem fungos adaptados ao hospedeiro humano as manifestações clínicas apresentam uma evolução bastante lenta (Weitzman & Summerbell 1995; Mahmoudabadi 2005; White et al. 2008; Havlickova et al. 2008).

Existem aproximadamente 40 espécies de dermatófitos, divididos em três gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Weitzman & Summerbell 1995; Havlickova et al. 2008). A caracterização das espécies de dermatófitos é baseada na morfologia e distribuição dos conídios ou estruturas de frutificação (Weitzman & Summerbell 1995).

São conhecidas duas espécies de *Epidermophyton*, denominadas *E. stockdaleae* e *E. floccosum*, sendo que apenas a última é capaz de produzir infecção no homem (Weitzman & Summerbell 1995) e ocasionalmente é descrito como agente de onicomicose, sendo geralmente associado com infecções de pele (Torres-Rodrigues & López-Jodra 2000). *E. floccosum* cresce lentamente, produzindo colônias com aspecto de camurça, e coloração branca que se torna amarela-esverdeada. A microscopia mostra a ausência de microconídios e formação de numerosos macroconídios claviformes septados, isolados ou agrupados, de base larga e com extremidade arredondada. Estruturas de ornamentação como corpos nodulares, hifas em espiral e em raquete também são frequentemente observadas. Esta espécie é extremamente pleomórfica, sendo que os clamidoconídios aparecem frequentemente em grande número com o desaparecimento de macroconídios após alguns dias de crescimento em cultivo (McCarthy 2004).

O gênero *Microsporum* é raramente encontrado como causador de onicomicose. Algumas espécies como *M. gypseum* (geofílica), *M. canis* (zoofílica) e *M. audouinii* (antropofílica) podem causar infecções nas unhas (Torres-Rodrigues & López-Jodra 2000). Estes fungos caracterizam-se por apresentar colônias pulverulentas, algodonosas ou velutíneas, de cores variadas (bege, marrom ou branco amarelada). Microscopicamente mostra raros microconídeos claviformes e numerosos macroconídios fusiformes, com septos transversais, usualmente de parede espessa e espiculada. Em algumas espécies, são

encontrados hifas em raquetes, órgãos nodulares e clamidoconídios terminais e intercalares (Weitzman & Summerbell 1995; Escutia et al. 2001; McCarthy 2004).

O gênero *Trichophyton* é composto por diversas espécies, sendo que as principais envolvidas em onicomicose são *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. Outras espécies, não muito freqüentes, podem ser observadas em certas regiões geográficas como agentes de onicomicose, como *T. tonsurans*, *T. megnini*, *T. schoenleinii*, *T. violaceum*, *T. soudanense* e *T. concentricum* (Torres-Rodrigues & López-Jodra 2000; Ngwogu & Otokonefur 2007). As colônias de *Trichophyton* variam dependendo da espécie, podendo ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas, de cores variadas e com reverso algumas vezes pigmentado (McCarthy 2004). Microscopicamente, estes fungos se caracterizam pela presença de grande quantidade de microconídios piriformes, redondos ou ovalados, dispostos em tirso ou agrupados e macroconídios com vários septos de parede delgada (Weitzman & Summerbell 1995; Larone 1996).

As espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* têm sido predominantes nas casuísticas de *tinea unguium* estudadas. Mügge et al. (2006) em 1918 amostras subungueal, isolaram e identificaram 91% de *T. rubrum* e 7,7% de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. Gupta et al. (2007), em 130 pacientes, verificaram uma freqüência de *T. rubrum* em 32,6%. Souza et al. (2009), mostraram o isolamento de *T. rubrum* em 55,3%, enquanto *T. mentagrophytes* correspondeu a 43,7% dos casos de onicomicose por dermatófitos.

Tinea unguium pode levar ao envolvimento subungueal distal/lateral, proximal além da infecção superficial branca (Kaur et al. 2008a). A micose subungueal distal lateral e proximal é mais comum, sendo causada por *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. Onicomicose superficial branca é freqüentemente causada por *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, sendo identificado em 90% dos casos que caracterizam esta manifestação (Jain & Sehgal 2000; Straten et al. 2003; Alberhasky et al. 2004).

Entre os fatores capazes de influenciar a distribuição e transmissão das infecções por dermatófitos nas unhas destacam-se: condições climáticas, higiene, contatos com animais traumas de repetição, presença de lesões por dermatófitos nos pés (*tinea pedis*), uso de sapatos fechados, duchas comunitárias, insuficiência circulatória periférica e doenças sistêmicas (Costa et al. 2002; Araujo et al. 2003b; Ballesté et al. 2003; Larruskain et al. 2005; Gupta et al. 2007; Maraki et al. 2007; Garmendia et al. 2008).

Confirmação laboratorial de onicomicose por dermatófitos é realizado através do exame direto com hidróxido de potássio (KOH) a 20% e cultivo em meios de cultura específicos para fungos, como o ágar Sabouraud dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol e

ágar seletivo para fungos patogênicos. A identificação das espécies é efetuada mediante a caracterização da colônia, observação microscópica da morfologia e arranjo dos elementos de frutificação, provas bioquímicas, como a produção de uréase, e fisiológicas como o teste de perfuração do pêlo *in vitro* (Mahoney et al. 2003; Robert & Pihet 2008; Kaur et al. 2008a; Zanardi et al. 2008).

2.2.3.2 Leveduras

As leveduras são componentes da microbiota de mucosas, pele e anexos dos animais, e até há pouco tempo eram consideradas contaminantes, sem importância clínica. Atualmente, são responsáveis por um número expressivo de casos de infecções fúngicas, em especial as onicomicoses (Jayatilake et al. 2009).

Juntamente com os dermatófitos, as espécies do gênero *Candida* são as principais responsáveis por onicomicoses, sendo *C. albicans* e *C. parapsilosis* freqüentemente isoladas. Outras espécies não-*albicans* como, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. famata* e *C. krusei* têm sido consideradas agentes emergentes de onicomicoses (Jain & Sehgal 2000; Ellabib et al. 2002; Ballesté et al. 2003; Mügge et al. 2006; Jayatilake et al. 2009).

O envolvimento da unha por leveduras do gênero *Candida* pode ser grave, havendo erosão e espessamento da borda ungueal que se estende transversalmente pela lâmina tornando-se distrófica e escurecida (Jayatilake et al. 2009). Estas manifestações clínicas em decorrência da invasão da unha por estes agentes geralmente apresentam padrões clínicos específicos, podendo ser subdivididas em três categorias (Abad-Gonzáles et al. 2007; Jayatilake et al. 2009):

- a) Paroníquia é o tipo mais comum e caracteriza-se pela infecção da prega ungueal proximal e lateral, resultando em típica inflamação e eritema;
- b) Onicólise é a separação da placa ungueal do leito ungueal, ocorrendo na extremidade distal e progredindo irregularmente para a área lateral;
- c) Granuloma candidótico manifesta-se exclusivamente em pacientes com candidíase mucocutânea crônica, sendo caracterizada por inchaço das pregas ungueais podendo resultar em deformidades dos dedos e uma fragilidade das unhas.

Onicomicoses por *Candida* é observada com mais frequência acometendo as unhas das mãos, quando comparado com unhas dos pés, em pessoas do gênero feminino (Jain et al. 2000; Ellabib et al. 2002; Mügge et al. 2006; Lima et al. 2008a). Este fato pode ser explicado pelo fator ocupacional dos indivíduos afetados, como serviços domésticos, que são mais predispostos a desenvolver infecções fúngicas ungueais devido à grande exposição à umidade, produtos químicos e microtraumas (Ellabib et al. 2002; Jayatilake et al. 2009).

O diagnóstico de onicomiose subungueal por *Candida* spp é realizado através da visualização ao exame microscópico direto de leveduras arredondadas ou ovaladas, pseudohifas e blastoconídios. As leveduras do gênero *Candida* são de crescimento rápido, de 48 a 72 horas formando colônias cremosas, úmidas, branco amareladas em ASD. A diferenciação entre as espécies de *Candida* pode ser obtida principalmente por métodos bioquímicos, como fermentação e assimilação de carboidratos, e fisiológicos onde se observa a formação de tubos germinativos a 37°C em soro animal e produção de clamidoconídios em ágar *Cornmeal* acrescido de *Tween* 80 (Kurtzman & Fell, 1998).

As onicomicoses podem estar associadas a outros gêneros de leveduras, sendo que *Trichosporon* e *Geotrichum* são os mais comumente isolados (Han et al. 2000; Ballesté et al. 2003; Mügge et al. 2006; Koksall et al. 2009). O gênero *Trichosporon* mostra na microscopia artroconídios e blastoconídios, enquanto o *Geotrichum* apresenta somente a presença de artroconídios. A diferenciação desses gêneros pode ser feita utilizando testes bioquímicos, como assimilação de fontes de carbono e produção de urease (Chagas-Neto et al. 2008; Magalhães et al. 2008).

2.2.3.3 Fungos Filamentosos não-Dermatófíticos

As onicomicoses podem ser causadas por espécies de FFND, que são considerados contaminantes do ambiente, apresentando-se como agentes oportunistas ou primários em infecções fúngicas (Kioshima et al. 2002; Mügge et al. 2006, Lima et al. 2008a). Algumas espécies possuem a capacidade de degradar a queratina a partir da produção de enzimas proteolíticas, como as queratinases, produzindo lesões clinicamente semelhantes àquelas causadas por dermatófitos (Gugnani, 2000).

Os gêneros mais freqüentemente isolados nas infecções ungueais são: *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Fusarium* e *Aspergillus*. Outros gêneros como *Alternaria*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Onychocola* podem ser encontrados em alguns casos de onicomicose (Gupta et al. 2003b; Araújo et al. 2003a; Escobar & Carmona-Fonseca 2003; O'Donoghue et al. 2003; Cavallera & Asbati 2006; Bonifaz et al. 2007; Lorizzo et al. 2007; Garmendia et al. 2008).

Os fungos do gênero *Scopulariopsis* são geofílicos, de ampla distribuição geográfica com atividade queratinolítica, sendo considerados patógenos primários em onicomicose. Entre as espécies deste gênero *S. brevicaulis* é a mais freqüente (Marchisio et al. 2000; Ballesté et al. 2003). Estes micro-organismos mostram colônias de coloração branca, que posteriormente torna-se de cor marrom ou canela e microscopicamente visualizam-se filamentos hialinos, com fiálides bem formadas, com conídios em pincel apresentando anelídeos de parede grossa e rugosa distribuídos em cadeias (Araújo et al. 2003a; Cavallera & Asbati 2006). A infecção nas unhas por *S. brevicaulis* geralmente começa nas margens livre ou lateral progredindo até à margem proximal, com alteração de coloração que pode ser branca, cinza ou amarelada (Gupta et al. 2003b).

Scytalidium spp, é um patógeno eventualmene primário, que pode ser adquirido pelo contato com terra ou vegetal, onde são conhecidas duas espécies; uma dematiaceae, *S. dimidiatum* e uma hialina *S. hyalinum* (Oyeka & Gugnani, 1997). Apresentam um crescimento rápido em cultura, desenvolvendo colônias negras ou claras de acordo com a espécie, e a microscopia revela hifas e cadeias de artroconídios ramificados (Gupta et al. 2003b; Pontarelli et al. 2005; Cavallera & Asbati 2006). Lesões subungueal distal e lateral, onicolise, paroníquia e fraturas transversais na região proximal da placa ungueal são geralmente observadas em onicomicose causadas por *Scytalidium* spp (Gupta et al. 2003b; Pontarelli et al. 2005).

As espécies de *Fusarium* são saprófitas do solo, fitopatógenos e freqüentemente agente de infecções oportunistas em humanos, podendo, em alguns casos, ser considerado patógeno primário (Godoy et al. 2004; Hattori et al. 2005; Cavallera & Asbati 2006). *F. solani*, *F. oxysporium* e *F. proliferatum* são as espécies mais freqüentemente encontradas como agente de onicomicose (Godoy et al. 2004; Hattori et al. 2005; Ninet et al. 2005; Cavallera & Asbati 2006). As colônias são algodonosas e de pigmentação variada, mostrando à microscopia macroconídios fusiformes, septados e extremidades afiladas; microconídios ovóides e clamidoconídios de parede rugosa ou lisa (Gupta et al. 2003b; Campos & Hernández-Chavarría 2005). As espécies de *Fusarium* podem provocar comprometimento distal e proximal da unha, associado à dor e inflamação periungueal, apresentando cor branco-amarelada, com superfície opaca (Araújo et al. 2003a; Gupta et al. 2003b).

O gênero *Aspergillus*, incluindo *A. versicolor*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. fumigatus*, são as principais espécies envolvidas. As colônias destas espécies são caracterizadas por um crescimento rápido, textura pulverulenta e coloração que varia de cinza-esverdeada, amarelo-esverdeada a preta. À microscopia, observam-se filamentos hialinos com a formação da cabeça aspergilar, que se caracteriza por um conidióforo formando uma vesícula, onde ficam dispostos as fileiras de fiálides e conídios. As espécies de *Aspergillus* acometem as pregas ungueais proximais com reação inflamatória e descarga purulenta com coloração escura ou esverdeada dependendo da espécie envolvida (Gupta et al. 2003b; Ballesté et al. 2003; McCarthy 2004; Mahmoudabadi & Zarrin 2005; Cavallera & Asbati 2006; Choudhary et al. 2009).

Danos teciduais, idade avançada, pacientes imunocomprometidos, infecção por dermatófitos, isquemia são fatores predisponentes a estas infecções (Mügge et al. 2006; Kaur et al. 2008a). Onicomicose ocasionada por FFND é mais observada nas unhas dos pés do que das mãos e na idade adulta, especialmente depois dos 50 anos de idade (Gupta et al. 2003b).

A prevalência de onicomicose por FFND varia de 1,45-22%, valores que sofrem influência de acordo com a região geográfica estudada e pelos métodos diagnósticos empregados (Hilmioglu-Polat et al. 2005; Palacio et al. 2006; Bonifaz et al. 2007; Sarma et al. 2008). Bonifaz et al. (2007) identificaram no México 34 casos (43,5%) de onicomicoses por *S. brevicaulis*, seguida de espécies do gênero *Aspergillus*, com 27 casos (34,5%). Na Turquia as principais espécies foram *Aspergillus niger* (22%) e *Acremonium* spp (18%) (Hilmioglu-Polat et al. 2005). Em Recife, estado de Pernambuco, Brasil, *Fusarium* spp foi responsável por 59,3%, e *Scytalidium*, por 25% dos casos de onicomicose por FFND (Lima et al. 2008a).

Para confirmar a etiologia das onicomicoses por FFND, os critérios padrões para o diagnóstico micológico devem ser bem aplicados. O aspecto clínico da lesão sugestiva de onicomicose, observação de estruturas fúngicas ao exame direto e crescimento do mesmo agente em três colheitas consecutivas de raspado subungueal devem ser considerados (Hilmioglu-Polat et al. 2005; Cavallera & Asbati 2006; Sarma et al. 2008; Zanardi et al. 2008; Shemer et al. 2009a). A identificação desses agentes emergentes é muito importante, não somente para se conhecer a epidemiologia e etiologia, mas para o tratamento adequado das onicomicoses (Lorizzo et al. 2007).

2.2.4 Tratamento

Para o tratamento das onicomicoses são utilizados procedimentos terapêuticos tópicos e orais (Gupta & Tu 2006; Garmendia et al. 2008; Kaur et al. 2008a).

Os principais medicamentos tópicos utilizados são ciclopirox e amorolfina (Gupta et al. 2004; Finch & Warshaw 2007; Shirwaikar et al. 2008). Ciclopirox atua na inibição da absorção de íons e aminoácidos enquanto a amorolfina atua na inibição da síntese do ergosterol da membrana celular (Gupta et al. 1997; Garmendia et al. 2008; Shirwaikar et al. 2008). Os medicamentos tópicos são mantidos na superfície da unha, difundindo-se por toda a placa ungueal, inativando as estruturas fúngicas (Gupta et al. 2003a; Gupta et al. 2004; Gupta & Tu 2006; Thappa et al. 2007; Shirwaikar et al. 2008). A terapia tópica possui como vantagem uma menor quantidade de efeitos colaterais (Ballesté et al. 2003), mas em contrapartida, seu uso é indicado somente quando menos de 50% da unha é afetada e sem o comprometimento da matriz ungueal (Llambrich & Lecha 2002; Gupta & Tu 2006; Seebacher et al. 2007). Esta terapia pode ser usada em candidíase ungueal, *tinea inguim* e em onicomicose por FFND (Fleckman 2002; Ballesté et al. 2003; Gupta et al. 2003a; Garmendia et al. 2008).

Os antifúngicos de uso oral promoveram grandes avanços ao tratamento das onicomicoses. Com o desenvolvimento de compostos do grupo das alilaminas, como a terbinafina, e dos triazóis, como itraconazol e fluconazol, melhores resultados foram observados em um menor período de duração do tratamento, levando um aumento dos índices de cura e da diminuição das recorrências (Gupta et al. 1997; Rosso 2000; Ballesté et al. 2003; Gupta et al. 2004; Finch & Warshaw 2007; Seebacher et al. 2007; Kaur et al. 2008a; Negroni 2008).

Na terapia oral da onicomicose é utilizado griseofulvina, terbinafina e derivados azólicos. A griseofulvina, derivado benzofurano, atua no núcleo da célula fúngica, interagindo com microtúbulos e desfazendo o fuso mitótico, responsável pela multiplicação celular. Este antifúngico apresenta atividade fungistática para diferentes espécies, em praticamente todas as manifestações clínicas de dermatofitoses (Gupta & Tu, 2006). Entretanto, o tratamento com este fármaco, é pouco utilizado, devido aos vários efeitos colaterais (Huang et al. 2004) como distúrbios gastrointestinais (náuseas, vômitos, dor epigástrica e diarreia), e alterações neurológicas (vertigens, confusão, perda de concentração e memória, visão turva e insônia).

A terbinafina é um antifúngico pertencente à classe das alilaminas, com atividade fungicida sobre os agentes fúngicos (McClellan et al. 1999; Debruyne & Coquerel, 2001). Este antifúngico tem seu mecanismo de ação sobre a enzima esqualeno-epoxidase bloqueando desta forma a biossíntese do ergosterol da membrana celular dos fungos (Ballesté et al. 2003; Gupta & Tu 2006; Finch & Warshaw 2007; Garmendia et al. 2008). Representa o tratamento de escolha para lesões produzidas por dermatófitos (Gupta & Tu 2006; Thappa 2007; Garmendia et al. 2008), porém pouco utilizado para infecções causadas por FFND e espécies de *Candida* (Cavallera & Asbati 2006; Jayatilake et al. 2009).

Respostas terapêuticas com o uso da terbinafina em pacientes com infecções nas unhas das mãos atingem valores de 80-90% e de 70-80% para infecções nas unhas dos pés. (Rodgers & Bassler 2001; Thappa 2007; Negroni 2008). Este antifúngico pode ser administrado na dose diária de 250mg por um período de 6 a 12 semanas ou através de pulsoterapia com dose de 500mg/dia durante uma semana por mês por um período de três meses consecutivos (Finch & Warshaw 2007; Thappa 2007; Garmendia et al. 2008; Negroni 2008).

Os antifúngicos azólicos, como cetoconazol, fluconazol e itraconazol, atuam inibindo a enzima 14- α 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 uma ação fungistáticas contra os fungos (Gupta et al. 1997; Jain & Sehgal 2001; Chen & Sorrel, 2007).

O itraconazol possui um amplo espectro de ação contra dermatófitos, leveduras e FFND (Jain & Sehgal 2001; Cavallera & Asbati 2006; Finch & Warshaw 2007; Negroni 2008; Jayatilake et al. 2009). A acidez gástrica é responsável pela alta absorção sanguínea do itraconazol, que se une em proteínas plasmáticas, como a albumina, alcançando altas concentrações nos tecidos infectados, principalmente na pele e unha, mesmo depois de finalizada sua administração (Jain & Sehgal 2001; Ballesté et al. 2003; Negroni 2008; Korting & Schollmann, 2009). O esquema de tratamento utilizando itraconazol pode ser realizado por pulsoterapia, que consiste em 400mg/dia durante uma semana/mês por um período que pode variar de dois a quatro meses, ou por terapia continua com doses diárias de 200mg por um período de 6 a 12 semanas (Llambrich & Lecha 2002; Ballesté et al. 2003; Thappa 2007; Negroni 2008; Garmendia et al. 2008).

Fluconazol é ativo contra espécies de *Candida*, dermatófitos e alguns FFND. Sua biodisponibilidade pode chegar a 90% após 30-90 minutos após a sua administração, alcançando altos níveis na pele e unha. O esquema de tratamento utilizado consiste em doses que podem variar de 150-300mg por semana durante um período de 3-6 meses dependendo da localização das lesões (Llambrich & Lecha 2002; Ballesté et al. 2003; Thappa 2007; Negroni 2008).

Dos derivados azólicos, o cetoconazol é o antifúngico menos utilizado, pois apresenta uma resposta terapêutica relativamente baixa. (Gupta et al. 1997; Llambrich & Lecha 2002; Ballesté et al. 2003; Kaur et al. 2008a).

As onicomicoses são as infecções fúngicas superficiais de tratamento mais difícil e, mesmo nos casos em que a medicação é adequada ao agente etiológico identificado, nem sempre se obtêm cura, sendo freqüentes as recidivas (Joish & Armstrong 2002; Colella et al. 2006).

2.3 Testes de Suscetibilidade *In Vitro*

Considerando a resistência intrínseca e adquirida de algumas espécies de fungos a determinados fármacos, tornou-se evidente a necessidade de métodos de referência, devidamente padronizados e validados, para que os testes de suscetibilidade sejam amplamente utilizados na prática clínica (Almeida et al. 2009). A terapia prolongada juntamente com a resistência a antifúngicos por alguns fungos são fatores importantes que explicam a crescente utilização destes testes, na tentativa de estabelecer uma terapia mais adequada na cura das infecções fúngicas.

Nos últimos anos têm-se padronizado várias técnicas para detecção de resistência *in vitro* de fungos envolvidos em infecções. A metodologia mais utilizada nas provas de suscetibilidade aos antifúngicos é a de diluição em caldo, padronizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), sendo a técnica de microdiluição a mais utilizada por ser rápida, de fácil execução e menos onerosa.

Os documentos M27-A2 e M38-A, descritos pelo CLSI, padronizam o teste de suscetibilidade antifúngica, para leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e para alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Pseudallescheria boydii*, *Sporotrix schenckii* e *Rhizopus* spp. Estes documentos incluem a padronização de diluições do antifúngico e do inóculo do fungo. Estabelecem o meio de cultura utilizado para crescimento e estimulação da esporulação do fungo (ágar batata dextrose), meio de cultura para o teste de suscetibilidade (RPMI 1640), tamanho do inóculo, período e temperatura de incubação, leitura e interpretação dos resultados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Para dermatófitos não há ainda uma padronização, mas alguns pesquisadores têm encontrado boa reprodutibilidade dos resultados utilizando o documento M38-A com algumas modificações segundo alguns pesquisadores, onde são estabelecidos o tamanho do inóculo, o período de incubação e a interpretação dos resultados (Santos & Hamdan 2007; Barros et al. 2006; Fernández-Torres et al. 2006; Sarifakioglu et al. 2007; Siqueira et al. 2008; Araújo et al. 2009).

Mudanças na etiologia das onicomicoses ocorridas nos últimos anos, como o aparecimento de fungos emergentes apresentando suscetibilidade diminuída aos principais antifúngicos utilizados na terapia, demonstra a extrema importância da realização dos testes de suscetibilidade *in vitro* para o direcionamento do tratamento destas infecções fúngicas ungueais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar os fungos agentes de onicomicose em pacientes procedentes do Departamento de Dermatologia (Depto. Dermatol.) do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás e determinar a suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Determinar a etiologia das onicomicoses através do isolamento e identificação dos fungos;
- 2- Determinar o perfil de suscetibilidade *in vitro* dos isolados de dermatófitos, leveduras e FFND aos principais antifúngicos usados no tratamento das infecções fúngicas;
- 3- Correlacionar as formas clínicas de onicomicose com a etiologia da infecção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Este trabalho foi realizado com 114 pacientes com suspeita clínica de onicomicose que foram encaminhados pelo Depto. Dermatol. do HC em Goiânia – Goiás ao Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG, durante o período de março de 2008 a março de 2009. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do HC/UFG, conforme protocolo número 065/2008 (Anexo 1). Todos os pacientes assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), sendo que as informações que os identificassem foram mantidas em absoluto sigilo.

4.2 Diagnóstico Laboratorial

4.2.1 Colheita do Material Clínico

O material foi colhido através de raspagem subungueal com a utilização de um bisturi “cego” previamente esterilizado por flambagem. Foi realizada uma anti-sepsia na unha com álcool 70%, tomando-se o cuidado de retirar o material nas regiões mais periféricas da lesão, representada pelo limite de transição entre a unha normal e a infectada (Figura 6). Em casos de onicomicose subungueal proximal foi utilizado o método de colheita por via transungueal ou técnica da janela, que consiste em abrir um orifício em profundidade com a ponta do bisturi, para se realizar a colheita da amostra subungueal (Shemer et al. 2009b)



Figura 6. Procedimento de colheita do raspado subungueal em pacientes com suspeita clínica de onicomicose.

4.2.2 Exame Direto com Hidróxido de Potássio 20%

O material clínico foi tratado com KOH a 20% durante 20 minutos e visualizado ao microscópio óptico comum entre lâmina e lamínula. Este procedimento faz com que as células queratinizadas se dilatem e sofram clareamento, proporcionando uma refração ótima em microscopia ótica, facilitando a visualização das estruturas fúngicas.

4.2.3 Isolamento e Características Macroscópicas e Microscópicas das Colônias

Os espécimes clínicos foram semeados em ASD acrescido de cloranfenicol e ágar seletivo para fungos patogênicos distribuídos em tubos de ensaios, incubados a temperatura ambiente por até 30 dias.

A observação macroscópica das colônias obtidas em isolamento primário foi o primeiro critério para a distinção dos fungos filamentosos e de leveduras. Foram analisadas características como: cor, textura, relevo, e pigmento difusível no meio de cultura. O subcultivo em placas de Petri contendo ASD ou ágar batata dextrose (Difco[®]) proporcionou o crescimento de uma “colônia gigante”, sendo que foi realizado para uma melhor caracterização da colônia.

A visualização das estruturas microscópicas, tais como hifas, conídios, leveduras (morfologia e disposição) e estruturas de ornamentação, foi realizada com o auxílio de lactofenol azul de algodão (Newprov[®]).

4.2.4 Testes Adicionais para Identificação de Dermatófitos

4.2.4.1 Microcultivo em Lâmina

Esta técnica consiste na estimulação da produção das estruturas de frutificação com características microscópicas íntegras. O fungo foi subcultivado em pequena quantidade de ágar batata dextrose (meio de cultura pobre em nutrientes) para estimular a formação de estruturas de reprodução assexuada, as quais foram visualizadas à microscopia ótica. A técnica do microcultivo está esquematizada na Figura 7.

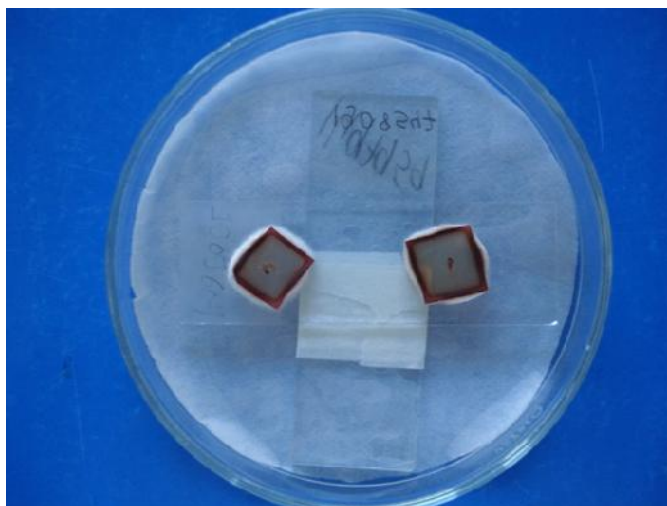


Figura 7. Microcultivo em lâmina: placa de Petri contendo meio de cultura com crescimento fúngico.

4.2.4.2 Teste da Hidrólise da Uréia

Para a realização desta prova, foi utilizado o ágar uréia de Christensen's (Difco[®]), contendo vermelho de fenol como indicador de pH. A degradação da uréia em duas moléculas de amônia e uma de anidrido carbônico ocorre quando o fungo é produtor de urease, sendo que esta característica é um importante critério para a identificação de algumas espécies de dermatófitos. Todos os isolados de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* foram semeados no ágar uréia de Christensen's (Difco[®]) e incubados a temperatura ambiente por 96 horas. O teste foi considerado negativo quando permaneceu a tonalidade amarela do meio, e positiva, quando houve mudança da coloração para rosa intenso.

4.2.4.3 Teste de Perfuração do Pêlo *In Vitro*

Este teste é utilizado para distinção entre *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Fragmentos da cultura de dermatófitos foram semeados em 25 mL de uma solução de água e extrato de leveduras 10%, contendo pêlos autoclavados. Em seguida, esta solução foi incubada a temperatura ambiente por até 40 dias. A formação de perfurações perpendiculares no pêlo que foi observada em microscopia óptica em um aumento de 400 vezes, permitiu a identificação das espécies de *T. mentagrophytes*.

4.2.5 Identificação de Leveduras

As colônias características de leveduras foram submetidas a métodos de identificação segundo Kurtzman & Fell (1998). Foram realizados a produção de clamidoconídios em ágar *Cornmeal* (Difco[®]) acrescido com *Tween* 80, produção de tubo germinativo em soro fetal

bovino, assimilação e fermentação de fontes de carbono e crescimento em meio de CHROMagar™ *Candida* (Microbiology, France). Quando a identificação da espécie de levedura não foi possível pelos métodos citados acima foi utilizado o kit comercial denominado API 20C AUX® (BioMérieux, France).

A diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi realizada através de crescimento das leveduras a 45°C em ASD, assimilação de xilose e α metil-D-glicoside e crescimento em meio de CHROMagar™ *Candida* (Dolapci et al. 2002; Faggi et al. 2005)

Outras leveduras não pertencentes ao gênero *Candida* foram identificadas através das características macroscópicas e microscópicas das colônias, e quando necessário através dos testes bioquímicos, como assimilação de fontes de carbono e teste da hidrólise da uréia de *Christensen's* (Difco®). A confirmação diagnóstica de onicomicose por leveduras não-*Candida* foi realizada através da colheita de três amostras com crescimento do mesmo agente etiológico.

4.2.6 Identificação dos Fungos Filamentosos não Dermatofíticos

Os FFND causadores de onicomicose foram identificados através de macroscopia e microscopia das colônias e microcultivo em lâmina quando necessário.

Os critérios para confirmação destes fungos como agentes de onicomicose, foram seguidos de acordo com Gupta et al. (2003c), nos quais se verificava a manifestação clínica, estruturas fúngicas observadas ao exame micológico direto com KOH 20% e crescimento do mesmo agente obtida em três amostras consecutivas com um intervalo de 15 dias entre uma colheita e outra.

4.3 Teste de Suscetibilidade *In Vitro*

4.3.1 Microdiluição em Caldo para Dermatófitos e FFND

Esta técnica foi realizada seguindo o documento M38-A proposto pelo CLSI (2002) com algumas modificações.

4.3.1.1 Agentes Antifúngicos

Cetoconazol, itraconazol (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), terbinafina (Novartis Research Institute, Vienna, Austria) e griseofulvina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo) foram utilizados para avaliar a suscetibilidade *in vitro* dos dermatófitos. Para os FFND foram utilizados voriconazol (Pfizer International, New York, NY), itraconazol (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium) e anfotericina B (Squibb, USA). Todos os antifúngicos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), e diluídos ao dobro em caldo RPMI 1640 (Sigma Chemical Co) sem bicarbonato de sódio tamponado a pH 7,0 com ácido morfolino-propanossulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co), de tal modo que as concentrações finais desejadas variaram de 0,031 a 16 µg/ml para cetoconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e terbinafina e 0.031 a 8 µg/mL para griseofulvina.

4.3.1.2 Preparação do Inóculo

Os dermatófitos e os FFND foram subcultivados em tubos contendo ágar batata dextrose, durante 7-15 dias para dermatófitos, e 2-3 dias para os FFND a 28°C. Ao meio de cultivo, foram adicionados aproximadamente 5 mL de salina estéril (0,85%), e a superfície das colônias foram raspadas suavemente com o auxílio de alça bacteriológica. A suspensão resultante contendo conídios e hifas foram transferidas para um tubo estéril, e deixada em repouso por 10 a 15 minutos para sedimentação das partículas mais pesadas. As partículas suspensas foram utilizadas para o inóculo, o qual foi ajustado em espectrofotômetro para uma transmitância de aproximadamente 70% a 72%, em um comprimento de onda de 530 nm, que equivale a aproximadamente 2 a 4×10^6 UFC/mL (Santos et al. 2006). Em seguida, a suspensão contendo o inóculo foi diluída a 1:50 e 1:20 em caldo RPMI 1640 de tal modo que se obtivesse uma concentração final de 0.4 a 5×10^4 UFC/mL.

4.3.1.3 Procedimento do Teste

Foram utilizadas placas de microdiluição contendo 96 poços, nos quais a cada poço, foram pipetados 100µL do agente antifúngico e 100µL do inóculo. Controle dos agentes antifúngicos, do inóculo e do meio de cultura (RPMI 1640) foi realizado em cada teste (Figura 8) e todos os ensaios foram realizados em duplicata.

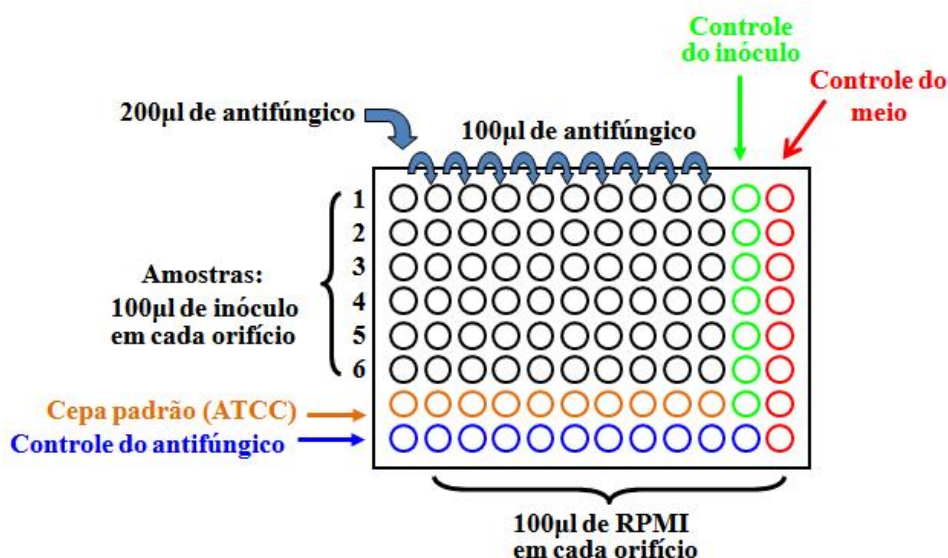


Figura 8. Esquema do procedimento para a realização do teste de suscetibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo.

4.3.1.4 Incubação e Interpretação dos Resultados

As placas de microdiluição foram incubadas a 28°C, sendo a leitura da CIM realizada até sete dias de crescimento (com visualização diária) de acordo com o controle do inóculo. Para os derivados azólicos a CIM foi definida como a concentração que apresentou uma inibição de 50% e para terbinafina e griseofulvina, uma inibição de 80% do crescimento fúngico, comparadas ao controle do inóculo. Para a anfotericina B a CIM foi considerada como a concentração que inibiu 100% do crescimento fúngico. CIM₅₀ e CIM₉₀ foram definidas como as CIMs capazes de inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

4.3.2 Microdiluição em Caldo para Leveduras

Esta técnica foi realizada seguindo os documentos M27-A2 (2002) propostos pelo CLSI.

4.3.2.1 Agentes Antifúngicos

Fluconazol, voriconazol (Pfizer International, New York, NY), itraconazol (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), e anfotericina B (Squibb, USA) foram utilizados para avaliar a suscetibilidade *in vitro* dos isolados de leveduras. Anfotericina B, itraconazol e voriconazol foram solubilizados em DMSO, enquanto fluconazol em água destilada. Todos os agentes antifúngicos foram diluídos ao dobro em caldo RPMI 1640 (Sigma®) sem bicarbonato de sódio tamponado a pH 7,0 com MOPS de tal modo que as concentrações variaram de

0,125 a 64µg/mL para fluconazol, 0,031 a 16µg/mL para anfotericina B, voriconazol e itraconazol.

4.3.2.2 Preparação do Inóculo

Os isolados de leveduras foram subcultivados em ASD, por 24-48 horas a 28°C. A concentração do inóculo foi ajustada em espectrofotômetro a 85% de transmitância no comprimento de onda 530 nm. Essa suspensão foi diluída, a 1:50 e em seguida 1:20, em RPMI 1640 de tal modo que se obtivesse uma concentração final de 1 a 5×10^3 UFC/mL.

4.3.2.3 Procedimento do Teste

O procedimento deste teste foi realizado conforme o descrito no Item 4.3.1.3.

4.3.2.4 Incubação e Interpretação dos Resultados

As placas de microdiluição foram incubadas em estufa a 37°C, sendo que a leitura da CIM foi realizada em 48 horas. Para os derivados azólicos a CIM foi considerada aquela que apresentou uma inibição de 50% comparadas ao controle do inóculo e para a anfotericina B a CIM foi considerada como a concentração que inibiu 100% do crescimento fúngico.

Isolados de leveduras foram considerados como resistentes seguindo valores de CIM preconizados no documento M27-S3 (2008) do CLSI em concentrações de ≥ 1 µg/mL para itraconazol), ≥ 64 µg/mL para o fluconazol e ≥ 4 µg/mL para voriconazol. Para anfotericina B valores de CIM > 1 µg/mL foram considerados resistentes, como sugerido por estudos de Nguyen et al. (1998).

4.3.3 Controle de Qualidade

Em todos os testes foi incluída a suscetibilidade para a cepa padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos Pacientes com Onicomicose

5.1.1 Gênero

Dentre os 114 pacientes, que apresentavam lesão nas unhas, 95 (83,3%) obtiveram a confirmação do diagnóstico de onicomicose. Desses pacientes, 79 (83,2%) pertenciam ao gênero feminino, e 16 (16,8%) ao masculino (Figura 9).

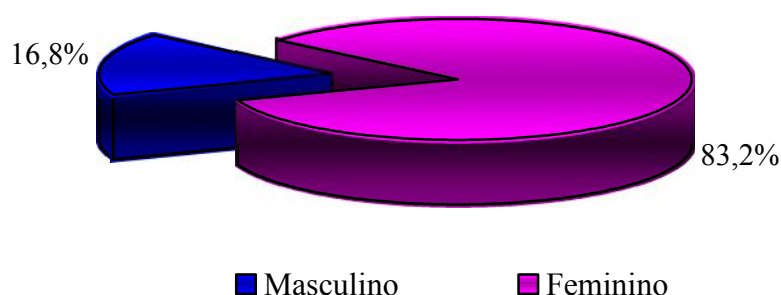


Figura 9. Distribuição percentual de acordo com o gênero em 95 pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol/HC/UFG.

5.1.2 Idade

A análise da faixa etária dos indivíduos com onicomicose variou de 19 a 85 anos. Destes, os mais jovens entre 19-29 anos foram menos acometidos, com um percentual de 8,4%. A faixa de 40-49 anos apresentou-se com maior número de casos de onicomicose com um percentual de 36,8%, como mostra a Figura 10.

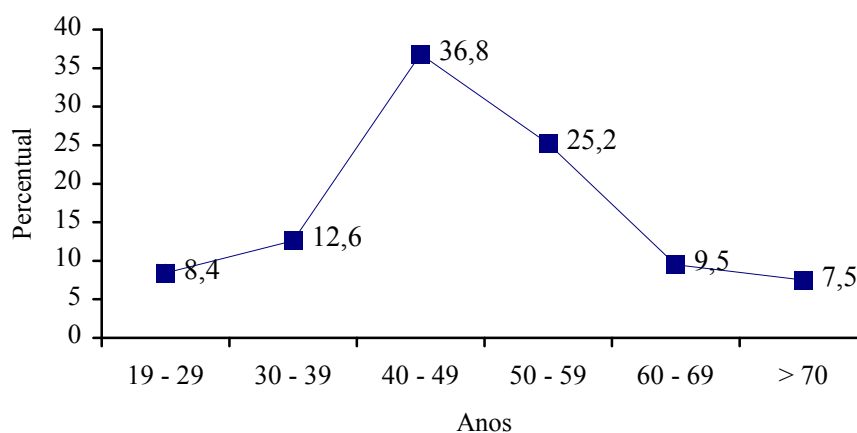


Figura 10. Distribuição percentual de onicomicose de acordo com a idade de 95 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.

5.1.3 Localização das Lesões

Dos 114 pacientes analisados, foram obtidas 136 amostras de raspados subungueais das mãos e dos pés, nas quais 108 (79,4%) apresentaram positividade aos exames micológico direto com KOH e em cultura. As amostras foram colhidas mais de uma vez quando apenas um dos exames micológicos resultava positividade.

Das 25 amostras obtidas das unhas das mãos, 21 (84%) mostraram crescimento fúngico, enquanto das 111 obtidas das unhas dos pés, 87 (81,6%) verificou-se o isolamento de fungos (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de 136 amostras obtidas de raspado subungueal de 114 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG, de acordo com o local de lesão.

Local de lesão	Exames micológicos				Total de amostras	
	Positivos		Negativos			
	n	%	n	%	n	%
Pés	87	64	24	17,6	111	81,6
Mãos	21	15,4	4	3	25	18,4
Total	108	79,4	28	20,6	136	100

Considerando a localização das lesões, as unhas dos pés foram mais acometidas tanto no gênero feminino como no masculino. Nas mulheres haviam sete (7,4%) lesões nas mãos e 59 (62,1%) nos pés. Nos homens verificou-se ausência de lesões com localização apenas nas mãos, mas observou-se 15 (15,8%) lesões nos pés. Lesões nos pés e nas mãos foram verificadas em um (1%) paciente do gênero masculino (Figura 11).

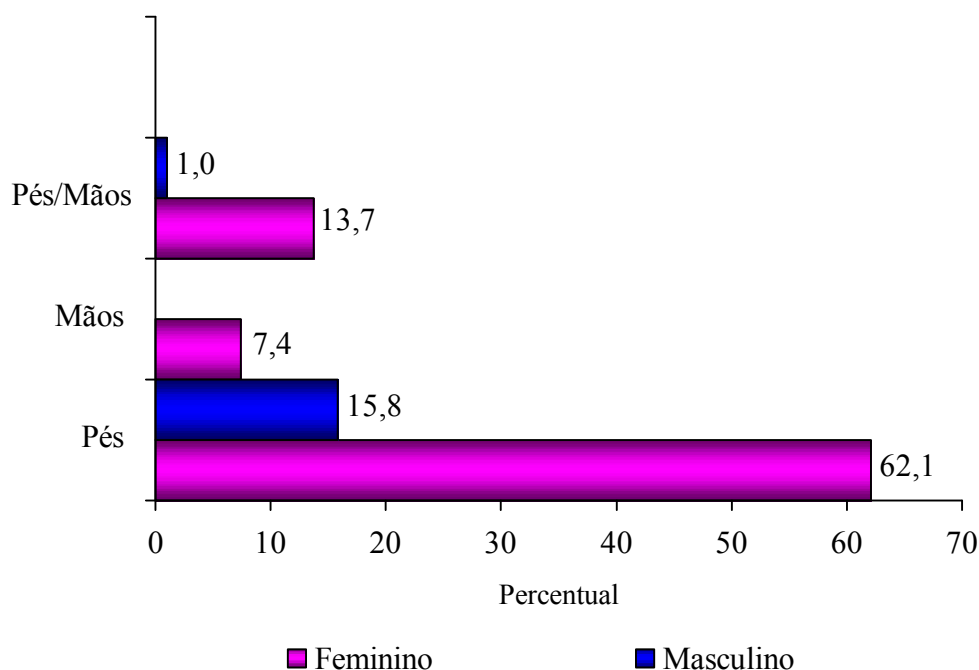


Figura 11. Distribuição percentual de onicomicose de acordo com o gênero e a localização da lesão em 95 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.

5.1.4 Profissão

Em relação à profissão dos pacientes que apresentaram diagnóstico de onicomicose, observou-se que 48,4% deles estavam diretamente ligados aos serviços domésticos, sendo representado por donas de casa e serviços gerais. A Figura 12 mostra as principais atividades profissionais mais freqüentes relatadas pelos pacientes com onicomicose.

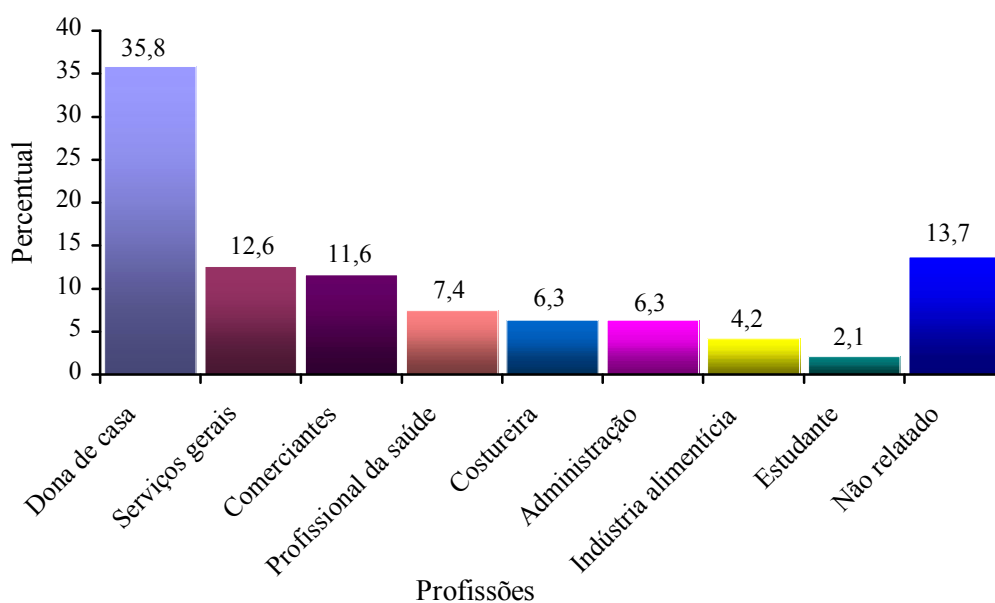


Figura 12. Distribuição percentual das principais atividades profissionais segundo relato das pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.

5.2 Identificação dos Fungos

O cultivo das 108 amostras de raspado subungueal dos 95 pacientes permitiu o isolamento e identificação de leveduras em um total de 59 (54,6%), dermatófitos em 31 (28,7%) e FFND em 18 (16,7%).

5.2.1 Leveduras

As leveduras mostraram-se ao exame direto do raspado subungueal elementos arredondados com blastoconídios e, em determinados casos, visualizou-se a presença de pseudohifas (Figura 13).

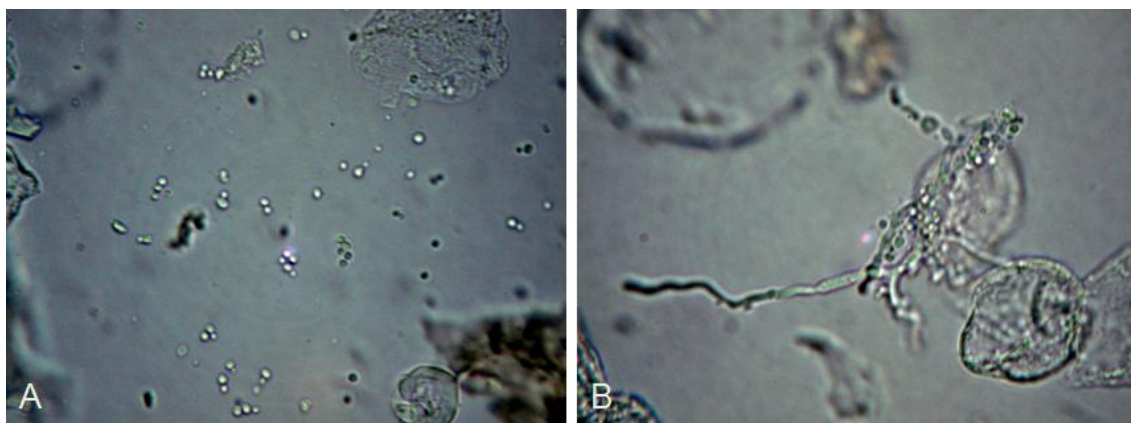


Figura 13. Leveduras arredondadas com blastoconídios (A) e pseudohifas (B) de raspado subungueal dos pés visualizados ao exame micológico direto com KOH a 20% (400x).

As colônias de leveduras obtidas do isolamento das amostras de unhas mostraram-se cremosas e úmidas com variação na coloração e textura. A Figura 14 mostra as características macroscópicas de *Candida* sp, *Rhodotorula* sp e *Trichosporon* sp isoladas dos pacientes.



Figura 14. Aspecto macroscópico de leveduras dos gêneros *Candida* sp (A), *Rhodotorula* sp (B) e *Trichosporon* sp (C) cultivadas em meio de ágar Sabouraud dextrose.

Na identificação das espécies de *Candida*, o meio de CHROMagar™ *Candida*, permitiu a identificação presuntiva de *C. albicans* que apresentou-se uma colônia de coloração esverdeada, e em seguida foi observado a capacidade de produzir tubo germinativo e clamidoconídios confirmando a identificação desta espécie (Figura 15).

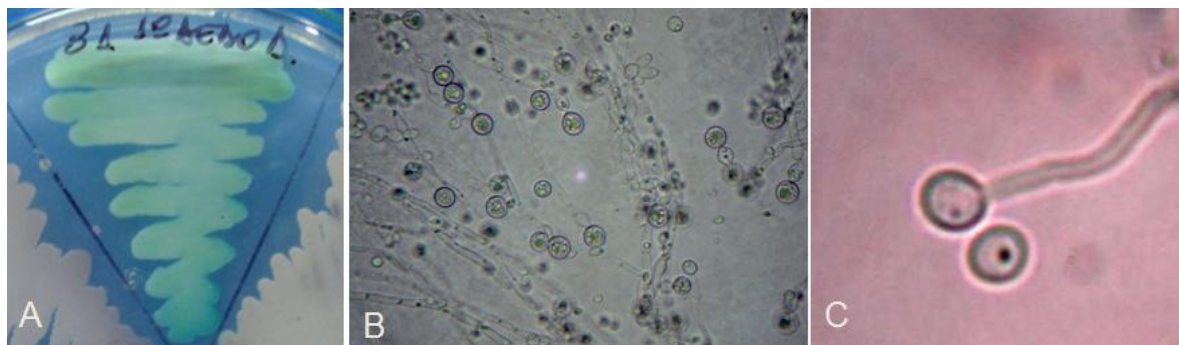


Figura 15. *Candida albicans*. A - Colônia verde em CHROMagar *Candida*™ B - Clamidoconídios terminais (400x). C - Tubo germinativo (1000x).

Das 59 leveduras isoladas foram identificadas 53 (89,8%) como pertencentes ao gênero *Candida*. *C. parapsilosis* e *C. albicans* foram as mais freqüentes, como mostra a Figura 16. Leveduras dos gêneros *Trichosporon* sp, *Geotrichum* sp e *Rhodotorula* sp foram isolados em 6 amostras.

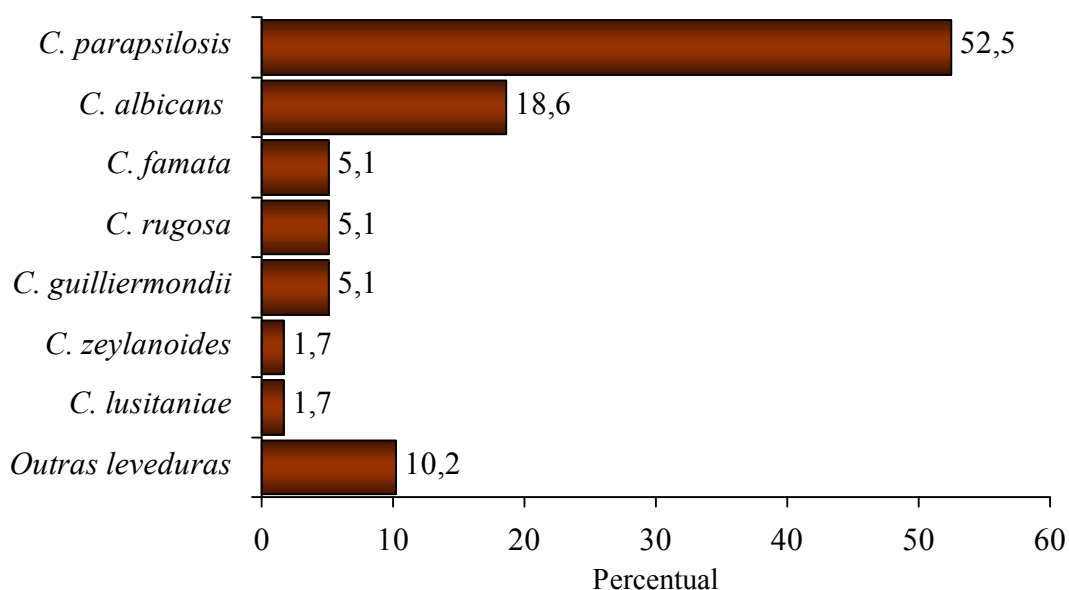


Figura 16. Distribuição percentual das leveduras isoladas de lesões de unhas de 95 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.

5.2.2 Dermatófitos

Os 31 dermatófitos obtidos de raspado subungueal mostraram ao exame direto com KOH a 20% como hifas hialinas septadas, regulares e/ou artroconídios (Figura 17).

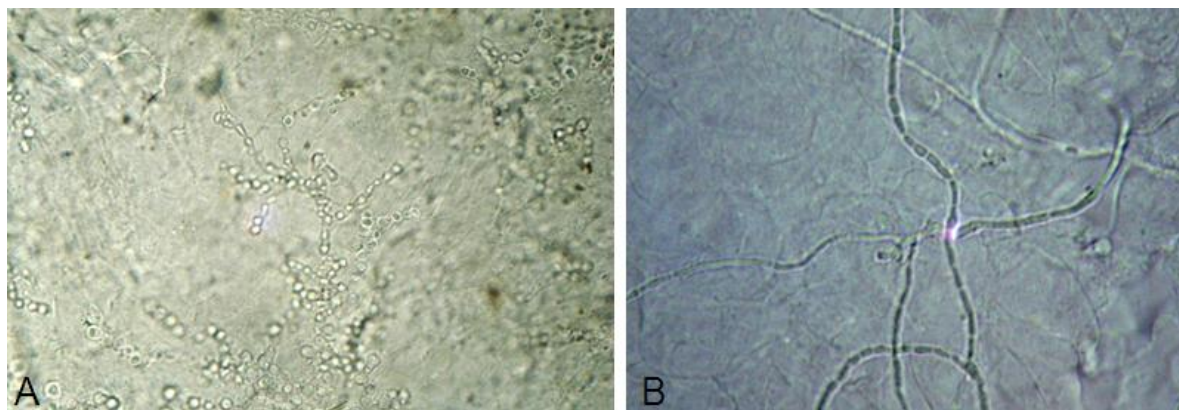


Figura 17. Exame micológico direto com KOH 20% de raspado subungueal mostrando artroconídios (A) e filamentos hialinos regulares (B) (400x).

O cultivo das amostras de unhas permitiu o isolamento de *T. rubrum*, espécie mais freqüente, sendo responsável por 23 (74,2%) casos de tinha ungueal, seguida de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* com cinco (16,1%), *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* com dois (6,5%) e *M. gypseum* com um (3,2%).

As colônias de *T. rubrum* mostraram-se com aspecto algodinoso, produção de pigmentação avermelhada, sendo visualizada na microscopia a presença de microconídios piriformes dispostos em acladium ao longo da hifa (Figura 18).

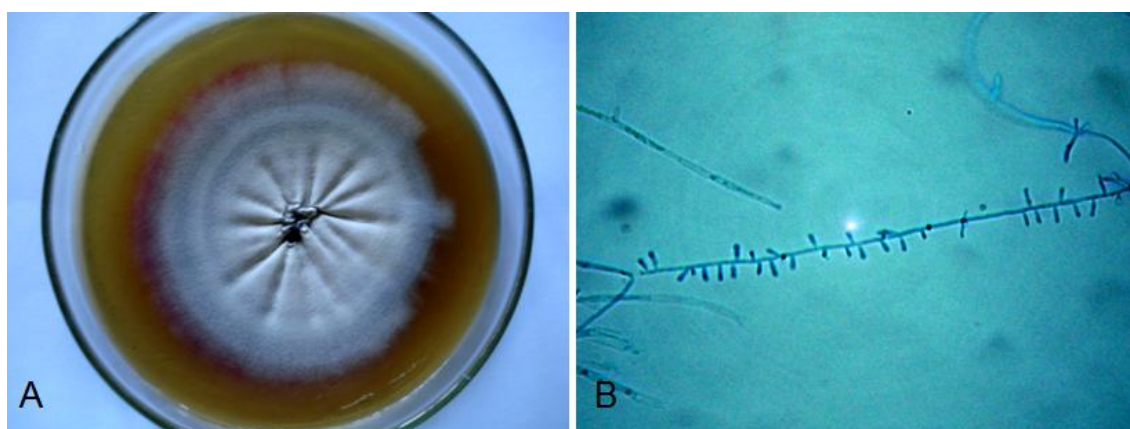


Figura 18. *Trichophyton rubrum*. A - Aspecto macroscópico: colônias algodinosas brancas de pigmento avermelhado B - Aspecto microscópico: hifas septadas hialinas e microconídios dispostos em acladio (400x).

Colônias pulverulentas ou algodonasas de cor branca amarelada mostrando, hifas em espiral e microconídios agrupados na microscopia caracterizaram *T. mentagrophytes* (Figura 19). Todos os isolados desta espécie foram capazes de hidrolizar a uréia e apresentaram teste de perfuração do pêlo *in vitro* positivo (Figura 20).

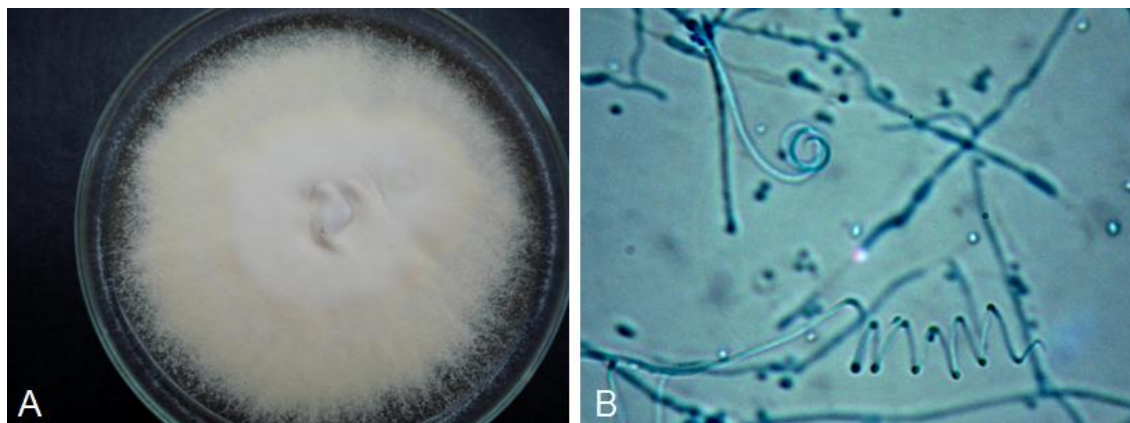


Figura 19. *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. A - Aspecto macroscópico: colônia pulverulenta branco-amarelada. B - Aspecto microscópico: hifas em espiral e microconídios agrupados (400x).

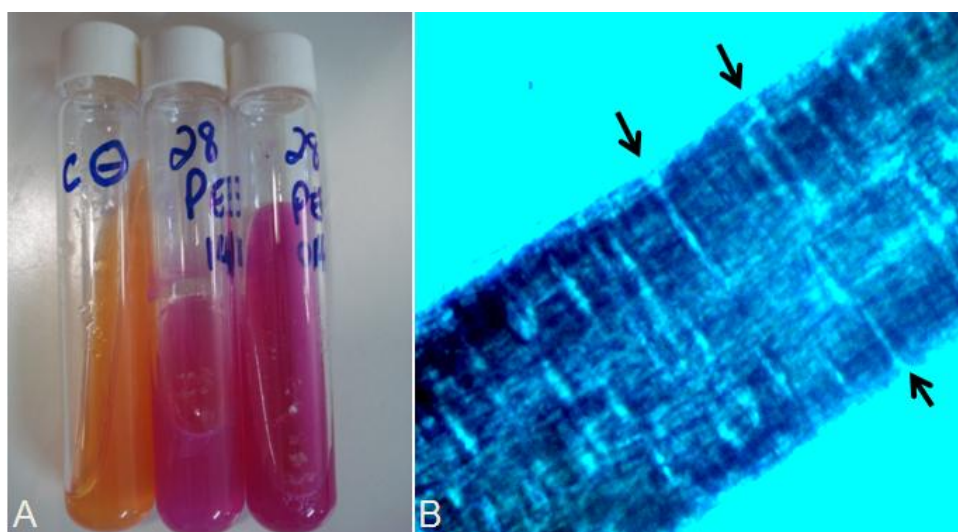


Figura 20. *Trichophyton mentagrophytes*. A - hidrólise da uréia: tubo amarelo → controle negativo; tubo rosa → hidrólise positiva. B – Microscopia do pêlo mostrando órgãos perfuradores ao longo do fio de cabelo (400x).

M. gypseum foi caracterizado por um aspecto pulverulento da colônia com bordas pregueadas e pela presença de macroconídios fusiformes septados, com extremidade arredondada e superfície rugosa (Figura 21).

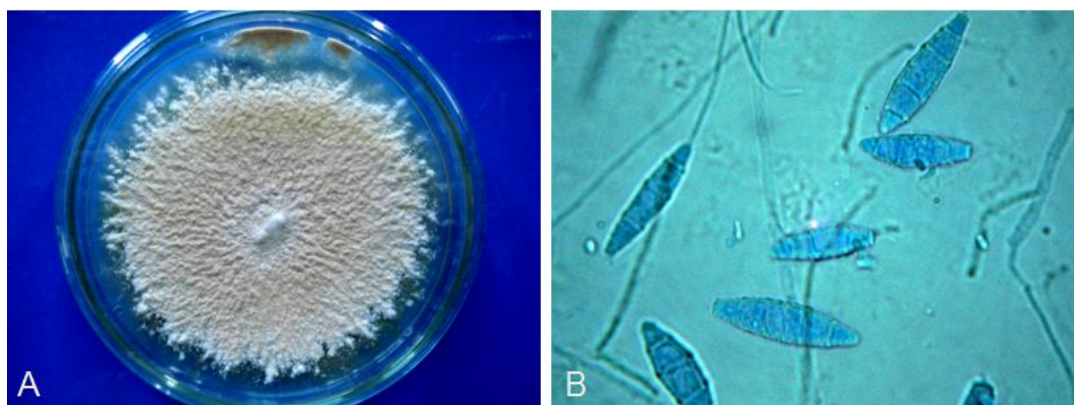


Figura 21. *Microsporion gypseum*. A - Aspecto macroscópico: colônia pulverulenta com bordas pregueadas. B - Aspecto microscópico: hifas septadas hialinas e macroconídios fusiformes septados, parede rugosa e extremidade arredondada (400x).

5.2.3 Fungos Filamentosos não Dermatofíticos

Ao exame direto do raspado subungueal, estes fungos mostraram-se como hifas hialinas septadas. Presença de conídios foi verificada em um caso positivo para *Aspergillus versicolor*, confirmado na cultura. Este grupo de FFND foi representado por 18 isolados, sendo que o gênero *Fusarium* foi identificado em oito amostras (44,4%).

A distribuição das espécies identificadas e obtidas de raspado ungueal encontra-se na Figura 22.

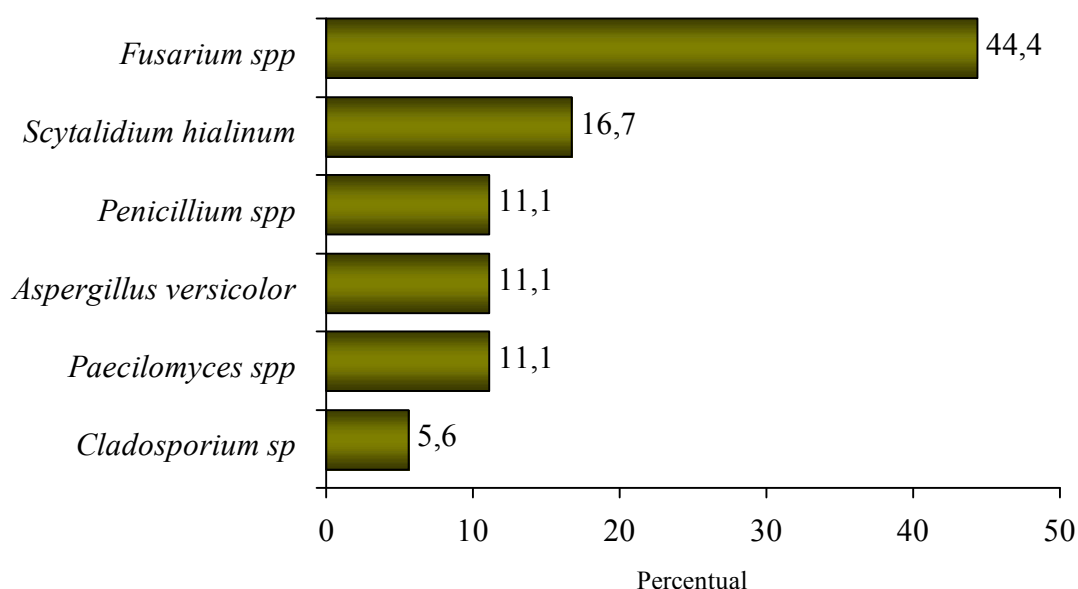


Figura 22. Distribuição percentual de 18 isolados de FFND obtidos de 95 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.

A análise dos dados com relação à localização das lesões, ao gênero e a etiologia, mostrou que os pés de indivíduos do gênero feminino foram mais comumente acometidos por todos os grupos de fungos identificados. Nos pés de mulheres foram isoladas 33 leveduras (30,6%), 20 dermatófitos (18,5%) e 15 FFND (13,9%). Esta relação encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos 108 isolados de amostras de unhas de 95 pacientes atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG de acordo com o gênero e o local de infecção.

Dermatite/AF/OTG de acordo com o gênero e o local de infecção:					
Grupos de fungos	Gênero				Total (n/%)
	Feminino		Masculino		
	Pés (n/%)	Mãos (n/%)	Pés (n/%)	Mãos (n/%)	
Leveduras	33 / 30,6	19 / 17,6	6 / 5,5	1 / 0,9	59 / 54,6
Dermatófitos	20 / 18,5	1 / 0,9	10 / 9,3	-	31 / 28,7
FFND	15 / 13,9	-	3 / 2,8	-	18 / 16,7
Total	68 / 62,9	20 / 18,5	19 / 17,5	1 / 0,9	108 / 100

5.3 Manifestações Clínicas

A onicomicose subungueal distal lateral (Figura 23) foi a manifestação clínica mais comum apresentada por 95 pacientes com esta infecção.



Figura 23. Onicomicose subungueal distal lateral observada em um paciente com lesões ungueais por dermatófitos.

Este tipo de lesão ocorreu em 24 (77,4%) casos de dermatofitoses e em 37 (62,7%) casos de onicomicoses por leveduras. As manifestações clínicas relacionada com a etiologia da onicomicose encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação clínica de 108 lesões procedentes de 95 pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG de acordo com os agentes etiológicos identificados.

Manifestações clínicas	Agentes etiológicos						Total	
	Leveduras		Dermatófitos		FFND			
	n	%	n	%	n	%	n	%
OSDL	37	34,2	24	22,2	17	15,7	78	72,1
OSP	12	11,1	-	-	-	-	12	11,1
OSB	2	1,9	1	1	-	-	3	2,9
OT	8	7,4	6	5,5	1	1	15	13,9
Total	59	54,6	31	28,7	18	16,7	108	100

OSDL: onicomicose subungueal distal lateral; OSP: onicomicose subungueal proximal; OSB: onicomicose superficial branca; OT: onicodistrófica total

5.4 Testes de Suscetibilidade *In Vitro*

Para os isolados de leveduras, embora com concentrações inibitórias mínimas baixas para a maioria dos isolados, em alguns casos foi possível detectar resistência. A CIM de fluconazol, para as leveduras mostrou valores que variaram de 0,25 a 32 µg/mL, sendo, portanto, todos os isolados considerados suscetíveis a este fármaco. Para itraconazol a CIM₅₀ foi de 0,125 µg/mL, mas quatro leveduras mostraram CIM > 1 µg/mL, sendo que uma era *C. albicans* e as outras eram *Trichosporon* sp (CIM= 16µg/mL), *Geotrichum* sp (CIM= 1µg/mL) e *Rhodotorula* sp (CIM= 2µg/mL). Para voriconazol, a CIM₅₀ para as leveduras foi de 0,5 µg/mL, sendo observados dois isolados de *C. albicans* resistentes a este fármaco. Para anfotericina B 90% dos isolados foram suscetíveis, no entanto um isolado de *C. albicans* (4µg/mL) e dois de *C. parapsilosis* (CIM de 2µg/mL e 16µg/mL) mostraram-se resistentes a este fármaco.

Os valores de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ de anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol para as leveduras isoladas de onicomicose encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Atividade *in vitro* de quatro agentes antifúngicos para 59 isolados de leveduras obtidos de pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.

Espécies (nº de isolados)	Antifúngicos	CIM (µg/mL)		
		Variação	CIM ₅₀ *	CIM ₉₀ *
<i>C. parapsilosis</i> (n=31)	Fluconazol	0,25 - 8	1	8
	Itraconazol	0,031 - 0,25	0,125	0,25
	Voriconazol	0,031 - 0,25	0,062	0,25
	Anfotericina B	0,25 - 16	0,25	1
<i>C. albicans</i> (n=11)	Fluconazol	0,5 - 2	1	4
	Itraconazol	0,062 - 4	0,125	0,25
	Voriconazol	0,062 - 16	0,125	16
	Anfotericina B	0,25 - 4	0,25	0,5
<i>Candida</i> spp** (n=11)	Fluconazol	0,5 - 32	2	16
	Itraconazol	0,062 - 0,25	0,125	0,25
	Voriconazol	0,062 - 0,5	0,062	0,5
	Anfotericina B	0,25 - 1	0,25	1
Outras leveduras*** (n=6)	Fluconazol	0,5 - 8	2	8
	Itraconazol	0,125 - 16	0,5	16
	Voriconazol	0,062 - 2	1	2
	Anfotericina B	0,062 - 1	1	1

*CIM₅₀ e CIM₉₀ = Concentração inibindo 50% e 90% dos isolados.

***C. famata* (n=3), *C. rugosa* (n=3), *C. guilliermondii* (n=3), *C. lusitaniae* (n=1) e *C. zeylanoides* (n=1).

****Trichosporon* spp (n=3), *Geotrichum* spp (n=2) e *Rhodotorula* sp (n=1).

O comportamento dos dermatófitos com relação à suscetibilidade *in vitro* foi muito semelhante para cada antifúngico analisado. A CIM para o itraconazol foi de 0,25 µg/mL para 50% dos isolados, no entanto um *T. rubrum* e um *T. mentagrophytes* apresentaram CIM de 16 µg/mL. Para cetoconazol, a concentração de 0,5 µg/mL foi capaz de inibir 50% dos isolados com duas amostras de *T. rubrum* mostrando concentrações de 8 µg/mL. A CIM₅₀ para griseofulvina foi de 1 µg/mL, com a CIM de 8 µg/mL para um isolado de *T. mentagrophytes*, enquanto a CIM dos dermatófitos para terbinafina foi extremamente baixa com CIM₉₀ de 0,015 µg/mL.

Para o único isolado de *M. gypseum*, foi observado valores de CIM de 0,25µg/mL para itraconazol, 2 µg/mL para cetoconazol, 0,5 µg/mL para griseofulvina e 0,015 µg/mL para terbinafina.

A Tabela 5 mostra os valores em µg/mL relativos a variação de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ dos isolados de dermatófitos para itraconazol, griseofulvina, terbinafina e cetoconazol.

Tabela 5. Atividade *in vitro* de quatro agentes antifúngicos para 31 isolados de dermatófitos obtidos de pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.

Espécies (nº de isolados)	Antifúngicos	CIM (µg/mL)		
		Varição	CIM ₅₀ *	CIM ₉₀ *
<i>T. rubrum</i> (n=23)	Itraconazol	0,62 - 16	0,25	0,5
	Cetoconazol	0,062 - 8	0,25	4
	Griseofulvina	0,5 - 2	2	2
	Terbinafina	0,0075- 0,015	0,015	0,015
<i>T. mentagrophytes</i> (n=7)	Itraconazol	0,125 - 16	0,25	16
	Cetoconazol	0,5 - 4	0,5	4
	Griseofulvina	1-8	1	8
	Terbinafina	0,015- 0,062	0,015	0,062

*CIM₅₀ e CIM₉₀ = Concentração inibindo 50% e 90% dos isolados.

A concentração inibitória mínima para o itraconazol foi de 16 µg/mL em 90% dos isolados de FFND, e para anfotericina B e voriconazol obteve-se uma concentração de 8 µg/mL.

As concentrações de antifúngicos foram elevadas para todos os fungos do gênero *Fusarium*, onde se observou CIM ≥ 4 µg/mL para itraconazol, ≥ 2 µg/mL para voriconazol e ≥ 1 µg/mL para anfotericina B nos oitos isolados estudados.

A resposta *in vitro* para os agentes antifúngicos foi diferente para cada espécie isolada, sendo que um isolado de *Penicillium* sp mostrou CIM de 16 µg/mL para voriconazol, enquanto um isolado de *Scytalidium hyalinum* mostrou CIM de 16 µg/mL para anfotericina B e para itraconazol e de 8 µg/mL para voriconazol.

Os valores de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ de anfotericina B, itraconazol e voriconazol para os isolados de FFND encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade *in vitro* de três agentes antifúngicos para 18 isolados de FFND obtidos de pacientes com onicomicose atendidos no Depto. Dermatol./HC/UFG.

Espécies (nº de isolados)	Antifúngicos	CIM (µg/mL)		
		Varição	CIM ₅₀ *	CIM ₉₀ *
<i>Fusarium</i> spp (n=8)	Itraconazol	4 - 16	8	16
	Voriconazol	2 - 8	4	4
	Anfotericina B	1 - 2	2	2
Outros FFND** (n=10)	Itraconazol	0,25 - 16	0,5	16
	Voriconazol	0,125 - 16	0,5	8
	Anfotericina B	0,062 - 16	2	16

*CIM₅₀ e CIM₉₀ = Concentração inibitória mínima de 50% e de 90% dos isolados.

***Scytalidium hyalinum* (n=3), *Penicillium* sp (n=2), *Aspergillus versicolor* (n=2), *Paecilomyces* sp (n=2), *Cladosporium* sp (n=1)

6 DISCUSSÃO

A onicomicose é a infecção mais freqüente entre as onicopatias, representando cerca de 30% das infecções fúngicas superficiais (Gupta et al. 2007; Kaur et al. 2008a; Koksai et al. 2009) e, embora não seja importante em relação à mortalidade, influencia negativamente na qualidade de vida do paciente (Arrese et al. 2005; Colella et al. 2006). Neste estudo em 114 pacientes com suspeita clínica de onicomicose, verificou-se uma freqüência de 83,3% (95) desta infecção. Este resultado demonstra que as onicomicoses contituem uma das principais causas de onicopatias na casuística estudada. Das et al. (2008), demonstraram um índice de positividade em amostras de raspado subungueal de 51,76% em 85 indivíduos com suspeita clínica de onicomicose. No Brasil, na cidade de São Paulo, Godoy-Martinez et al. (2009) confirmaram o diagnóstico de onicomicose em 42% de 588 pacientes estudados. Em Goiânia, Souza et al. (2009) examinaram 2273 amostras de unhas provenientes de pacientes com onicopatias, onde observaram um índice de 56,4% de onicomicose.

Maior ocorrência foi verificada entre as mulheres, sendo que dos 95 pacientes com onicomicose, 83,2% (79) pertenciam ao gênero feminino. Há resultados controversos com relação ao gênero dos pacientes com onicomicose. Alguns pesquisadores relatam maior positividade no gênero masculino (Surjushe et al. 2007; Sarma et al. 2008) enquanto outros mostram que as mulheres apresentam maior número de casos desta infecção (Jesudanam et al. 2002; Mügge et al. 2006; Souza et al. 2007). Esta discrepância com relação ao gênero pode esta associada com a atividade profissional relatada pelos pacientes que participaram do estudo. A maioria das mulheres relatou que desenvolve trabalhos domésticos (48,4%), permanecendo por longos períodos com as mãos e os pés úmidos, além de manter contato com substâncias químicas, como os detergentes, que propiciam o aparecimento de traumas ungueais, favorecendo a instalação da infecção. Além disto, as mulheres possuem uma maior preocupação em procurar o serviço médico para solucionar o desconforto estético proporcionado pela onicomicose (Hernandez-Salazar et al. 2007).

A faixa etária mais atingida entre os pacientes estudados foi de 40 a 59 anos (62%). No presente estudo, não havia crianças e adolescentes com onicomicose. A baixa freqüência de onicomicose em pessoas jovens pode ser atribuída ao crescimento mais rápido da unha, menor área superficial de contato e a probabilidade reduzida de trauma (Sayed et al 2006). O aumento de onicomicose em pessoas adultas com idade acima de 40 anos provavelmente ocorre devido à redução da taxa de crescimento da lâmina ungueal, a maior possibilidade de traumatismos ungueais, ao contato direto e prolongado com umidade e a presença de algumas

comorbidades que ocorrem com mais frequência nesta faixa etária, como por exemplo diabetes mellitus (Martelozzo et al. 2005; Oliveira et al. 2006; Hof 2009). Resultados similares, onde a presença de onicomicose era predominante em indivíduos idosos têm sido observados por Svejgaard & Nilsson (2004), Martelozzo et al. (2005), Das et al. (2008), Godoy-Martinez et al. (2009) e Souza et al. (2009).

Com relação a localização das lesões, verifica-se que a onicomicose encontra-se predominantemente nas unhas dos pés (Martelozzo et al. 2005; Mügge et al. 2006). No presente estudo entre as 108 amostras de raspado subungueal obtidas dos pacientes com onicomicose, 81,6% (87) foram das unhas dos pés. A alta frequência de infecções nas unhas dos pés pode ser explicada por uma maior ocorrência de traumas e uma alta umidade, produzido pelo uso de sapatos fechados e fabricados por material sintético, o que facilita a penetração de fungos nas unhas (Martelozzo et al. 2005). Segundo Mügge et al. (2006), as unhas das mãos crescem mais rápido do que as unhas dos pés, sendo que a eliminação dos fungos pelas primeiras ocorre com maior facilidade, dificultando o desenvolvimento destes micro-organismos nas unhas das mãos.

Neste trabalho, as leveduras especialmente do gênero *Candida* foram mais frequentemente diagnosticadas como agentes de onicomicoses em comparação com os fungos filamentosos. Estes resultados são similares aos relatados em algumas localizações do Brasil como Pernambuco (Lima et al. 2008a), Goiás (Souza et al. 2009) e São Paulo (Godoy-Martinez et al. 2009). Entretanto em várias casuísticas os dermatófitos foram mais frequentes como causa de onicomicose (Araújo et al. 2003b; Mügge et al. 2006; Sarma et al. 2008; Kaur et al. 2008b). Fato interessante foi observado por Lima et al. (2008a) e Meireles et al. (2008), que relataram que os FFND foram a segunda causa de onicomicose em trabalhos realizados na região Nordeste do Brasil, diferente dos dados obtidos neste estudo, que identificou este grupo como a terceira causa de onicomicose.

A distribuição das espécies de *Candida* causando onicomicose é variável em diferentes casuísticas. Embora *C. albicans* seja a principal espécie responsável por esta infecção (Garg et al. 2004; Sayed et al. 2006; Gupta et al. 2007; Kaur et al. 2008b; Godoy-Martinez et al. 2009; Koksai et al. 2009; Souza et al. 2009), *C. parapsilosis*, no presente estudo foi a espécie predominante como agente da doença em 58,5% dos casos diagnosticados, o que mostra a emergência desta espécie. Similaridade de comportamento, onde *C. parapsilosis* apresenta-se como a principal responsável por candidíase ungueal tem sido observada por diferentes pesquisadores (Segal et al. 2001; Mügge et al. 2006; Djeridane et al. 2007; Koklu et al. 2007; Figueiredo et al. 2007).

Alguns fatores como distrofia traumática e atividades relacionadas ao solo podem ser considerados como importantes para a maior frequência de onicomiose por *C. parapsilosis*, já que esta levedura é frequentemente isolada do solo (Gautret et al. 2000; Figueiredo et al. 2007).

No presente estudo foram identificadas outras espécies de leveduras como agentes de onicomioses. Os gêneros, *Trichosporon* sp, *Geotrichum* sp e *Rhodotorula* sp, apesar de serem micro-organismos pertencentes da microbiota de humanos, foram confirmados em três amostras diferentes de raspado subungueal e têm sido relatadas como causadoras de infecção nas unhas em várias casuísticas (Han et al. 2000; Vijaya et al. 2004; Álvarez & Caicedo 2007; Djeridane et al. 2007; Souza et al. 2007; Chagas-Neto et al. 2008; Sarma et al. 2008; Cunha et al. 2009; Souza et al. 2009).

Os dermatófitos, como a segunda etiologia mais comum de onicomiose observada neste estudo, após as leveduras do gênero *Candida*, tem sido encontrada por Sarma et al. (2008) e Godoy- Martinez et al. (2009). Dermatófitos antropofílicos, como *T. rubrum* foram observados em 74,2% dos casos como agentes de onicomiose. Esta espécie tem sido relatada como a mais comum por diferentes pesquisadores (Torrez-Rodrigues & López-Jodra 2000; Costa et al. 2002; Chinelli et al. 2003; Garg et al. 2004; Dolenc-Voljc et al. 2005; Marteloza et al. 2005; Djeridane et al. 2006; Mügge et al. 2006; Hernandez-Salazar et al. 2007; Maraki et al. 2007; Sarma et al. 2008; Rezende et al. 2008; Godoy-Martinez et al. 2009; Neji et al. 2009; Souza et al. 2009; Yenisehirli et al. 2009).

O encontro de fungos antropofílicos pode estar relacionado ao processo de urbanização. *T. rubrum* é um fungo bem adaptado ao tecido queratinizado do hospedeiro humano, que causa um processo inflamatório crônico, sendo que a transmissão ocorre facilmente de homem ao homem, principalmente nos grandes centros urbanos. Nestes locais a aglomeração de indivíduos facilita a disseminação do fungo, justificando a predominância desta espécie (Chinelli et al. 2003). Embora *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* seja relatado como o segundo agente de unha ungueal, após *T. rubrum* (Torrez-Rodrigues & López-Jodra 2000; Djeridane et al. 2006; Mügge et al. 2006; Maraki et al. 2007), no presente trabalho foi verificado que *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* foi mais comum. Este fato pode ter ocorrido devido ao relato de contato direto com animais de estimação pelos pacientes, já que este agente é zoofílico.

A distribuição dos agentes etiológicos de FFND relacionados com onicomicose é bastante variável, sendo que há uma grande diversidade destes fungos como causadores de infecção. Bassiri-Jahromí & Khaksarí (2009), no Iran, identificaram em 100 casos de onicomicose em unhas dos pés, 19 por *Aspergillus* spp, seguido de seis por *Acremonium* spp e quatro por *Fusarium* spp. Na Índia, *Aspergillus* spp foi o fungo mais comum, seguido de *Fusarium* spp, *Curvularia* sp, *Alternaria* sp e *Penicillium* sp (Sarma et al. 2008). No presente trabalho, o fungo mais isolado foi *Fusarium* spp, representando 44,4 % dos isolados, seguido de *Scytalidium* spp, *Penicillium* spp, *Aspergillus versicolor*, *Paecilomyces* spp e *Cladosporium* spp. Em muitas regiões a presença de *Fusarium* como agente predominante deste tipo de onicomicose tem sido verificada. Em Taiwan de 30 casos de onicomicose por FFND, 17 eram por *Fusarium* spp, 11 por *Aspergillus* spp e um por *Acremonium* sp e outro por *Scopulariopsis brevicaulis* (Chi et al. 2005). Nos Estados Unidos, *Fusarium* spp foi relatado em 34,1% (Ghannoum et al. 2000). No Brasil, no estado do Ceará, Brilhante et al. (2005), observaram somente o crescimento de fungos do gênero *Fusarium* como agente de onicomicose por FFND.

Embora fungos da espécie *Scytalidium hialinum* seja pouco comum no Brasil, no presente trabalho, foi verificado o isolamento de 16,7% entre os FFND. Esta espécie, de ocorrência maior na África, Tailândia, Inglaterra e Austrália pode ter surgido no território brasileiro em decorrência de intensos movimentos migratórios nas últimas décadas. Trabalhos realizados mais recentemente, no Brasil, têm conseguido o isolamento deste fungo como agente de onicomicose (Araujo et al. 2003a; Oliveira et al. 2006; Lima et al. 2008a; Lima et al. 2008b; Godoy-Martinez et al. 2009).

O encontro de elementos reprodutivos em vida parasitária ao exame microscópico direto pode ser uma característica importante no diagnóstico em casos de onicomicose por *Aspergillus* spp (Veraldi et al. 2009) Neste trabalho, foram observados conídios ao exame micológico direto com KOH 20% de um caso por *Aspergillus versicolor*. Nesta unha, verificou-se a formação de cavidades na sua porção distal, o que favorece o desenvolvimento de elementos de reprodução, similar ao que ocorre em aspergiloma pulmonar.

Lesões subungueal distal e lateral, que foram predominantes nos casos de onicomicose estudados, constituem a forma clínica mais comum deste tipo de infecção (Grover 2003; Garg et al. 2004; Sayed et al. 2006; Bonifaz et al. 2007; Gupta et al. 2007; Kasemi 2007; Sarma et al. 2008; Veer et al. 2008; Godoy-Martinez et al. 2009). A correlação da etiologia com o tipo de lesão mostrou que o grupo de dermatófitos, de leveduras e de FFND foi capaz de produzir o mesmo tipo de lesão, como observado para o caso de OSDL e OT.

A OSP, normalmente encontrada em casos de onicomicose por *Candida* e por FFND (Araújo et al. 2003b; Negroni 2008), foi verificada em 11,1% das lesões, causadas exclusivamente por leveduras. A ocorrência de OSB foi relativamente rara em todos os grupos de fungos encontrados, dado similar aos de vários pesquisadores que relatam a OSB como uma das manifestações clínicas de onicomicose menos comum (Gupta et al. 2007; Kaur et al. 2008b, Neupane et al. 2009).

A maioria dos isolados de *Candida* e de dermatófitos foi suscetível a todos os antifúngicos avaliados, mostrando que todos estes fármacos, os quais estão disponíveis no mercado, possuem uma boa atividade contra os principais agentes etiológicos das onicomicoses sendo eficazes no tratamento destas infecções.

Embora vários estudos relatam baixas proporções de resistência para as espécies de *Candida* (Calvo et al. 2003; López et al. 2005; Asadzadeh et al. 2008; Bueno et al. 2009), os resultados obtidos neste trabalho mostram uma tendência de resistência destas espécies a derivados azólicos. De acordo com os breakpoints estabelecidos pelo CLSI para leveduras, foram verificados três isolados de *C. albicans* resistentes a estes antifúngicos. Espécies de *Candida* resistentes ao voriconazol foi observado por Sabatelli et al. (2006), que investigaram a suscetibilidade de 3535 isolados de diferentes amostras clínicas.

Para anfotericina B, o encontro de resistência de três isolados de *Candida*, merece destaque. As leveduras do gênero *Candida* normalmente são suscetíveis a este antifúngico (Asadzadeh et al, 2008), sendo que são relatados poucos isolados resistentes. O encontro de resistência a anfotericina B tem sido observado em amostras de *Candida* causando lesões em outros locais do organismo, como relatado por Swinne et al. (2005) e Passos et al. (2007) em amostras de sangue, que observaram isolados de *C. parapsilosis* resistentes a este fármaco.

Para os dermatófitos não há um protocolo estabelecido para a determinação destes fungos como resistentes ou suscetíveis aos antifúngicos. A avaliação da atividade *in vitro* dos antifúngicos testados revelaram que para os dermatófitos, a terbinafina foi a mais eficaz na inibição de crescimento destes micro-organismos, assim como mostra Ghannoum et al. (2000), Gupta & Kohli (2003a), Gupta & Kohli (2003b), Cetinkaya et al. (2005), Santos & Hamdan (2007), Sarifakioglu et al. (2007), Nowrozi et al. (2008) e Bueno et al. (2009). Este antifúngico é recomendado para o tratamento das onicomicoses, tanto por uso tópico, quanto oral pelo método de pulsoterapia (Carrillo-Munoz et al. 2008; Takahata et al. 2008).

Os derivados azólicos, apresentaram baixos valores de CIM para os dermatófitos. Estes valores mostraram-se menores para itraconazol do que para cetoconazol. A similaridade dos resultados de suscetibilidade dos dermatófitos a estes fármacos tem sido verificada por Gupta & Kohli (2003b), Ozkutuk et al. (2007) e Araújo et al. (2009).

Similar aos resultados de Favre et al. (2003), Barros et al. (2007), Nowrozi et al. (2008) e Araújo et al. (2009), maiores valores de CIM foram encontrados nos testes de suscetibilidade *in vitro* utilizando a griseofulvina, que apresentou CIMs relativamente elevados em comparação com os derivados azólicos e a terbinafina.

Valores de CIMs com variações significativas foram evidenciadas com relação aos FFND. Segundo Ortoneda et al. (2004), Selleslag (2006), as espécies do gênero *Fusarium*, podem apresentar baixa suscetibilidade frente a vários antifúngicos. Altos valores de CIM encontrados para os isolados de *Fusarium* spp, têm sido relatados por diferentes pesquisadores (Sabatelli et al. 2006; Guilhermetti et al. 2007; López et al. 2008; Bueno et al. 2009). A fusariose é de difícil tratamento, sendo que as espécies envolvidas nesta infecção respondem de forma inadequada à maioria dos antifúngicos, havendo geralmente recidivas das lesões (Pastor & Guarro 2007), além disto, a onicomicose por *Fusarium* pode ser a causa de quadros sistêmicos de infecções por este micro-organismo, em pacientes imunocomprometidos (Arrese et al. 1996).

Neste trabalho valores de CIM₉₀ para a maioria dos antifúngicos utilizados na suscetibilidade *in vitro* aos FFND foram relativamente elevados, mostrando que provavelmente há fungos em que os antifúngicos não atuam, ou seja, podem apresentar resistência ao tratamento. Altos valores de CIM em testes de suscetibilidade *in vitro*, foram relatados por outros autores que avaliaram diferentes agentes antifúngicos para várias espécies de FFND (Torrez-Rodrigues et al. 1998; Lacroix & Chauvin 2008; Trovato et al. 2009). Em resumo, os resultados de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos fornecem evidências confiáveis para auxiliar no tratamento clínico das infecções fúngicas, como no caso das onicomicose (Cuenca-Estrella & Rodríguez-Tudela, 2002).

7 CONCLUSÕES

- 1- A onicomicose apresentou uma frequência de positividade de 83,3% entre os pacientes estudados.
- 2- Entre a população estudada verificou-se que a onicomicose foi predominante nas mulheres e na faixa etária entre 40-49 anos.
- 3- A onicomicose causada por leveduras representou a etiologia mais comum, sendo que *C. parapsilosis* foi isolado em 52,5% dos casos de candidíase ungueal.
- 4- Entre os dermatófitos, houve predominância da espécie antropofílica, *T. rubrum*, em 74,2% dos casos, sugerindo a transmissão direta de indivíduo a indivíduo.
- 5- Com relação aos FFND, o gênero *Fusarium*, fungo constantemente presente no meio ambiente, foi o mais freqüente.
- 6- Entre os tipos de lesões observadas nas unhas, a onicomicose subungueal distal lateral foi de ocorrência comum, independente do agente etiológico.
- 7- Embora as onicomicoses apresentem dificuldades na terapia convencional, a maioria dos antifúngicos mostrou baixos valores de CIM, demonstrando que a suscetibilidade *in vitro* encontrada para os fungos nem sempre expressa a resposta obtida *in vivo*.

8 REFERÊNCIAS

- Abad-González J, Bonifaz A, Ponce RM 2007. Onicomycosis por *Candida* asociada con diabetes mellitus. *Rev Mex Dermatol* 51: 135-141.
- Alberhasky RC 2004. Laboratory diagnosis of onychomycosis. *Clin Podiatr Med Surg* 21: 565-578.
- Albert SF, Weis ZH 2004. Management of onychomycosis with topical. *Clin Podiatr Med Surg* 21: 605-615.
- Almeida LMM, Bianchin DB, Souza EAF, Svidzinski TIE 2009. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. *An Bras Dermatol* 84: 249-255.
- Álvarez MI, Caicedo LD 2007. Medically important fungi found in hallux nails of university students from Cali, Colombia. *Mycopathol* 163: 321-325.
- Araújo AJG, Souza MAJ, Bastos OMP, Oliveira JC 2003a. Onicomycose por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. *An Bras Dermatol* 78: 445-455.
- Araújo AJG, Souza MAJ, Bastos OMP, Oliveira JC 2003b. Ocorrência de onicomycose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *An Bras Dermatol* 78: 299-308.
- Araújo CR, Miranda KC, Fernandes OFL, Soares AJ, Silva MRR 2009. *In vitro* susceptibility of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 51: 9-12.
- Arenas R, Ruiz-Esmenjaud J 2004. Onychomycosis in childhood: a current perspective with emphasis on the review of treatment. *An Bras Dermatol* 79: 225-232.
- Arrese JE, Valverde JC, Pierard GE 2005. Un nuevo enfoque sobre la epidemiologia de las onicomycosis. *Rev Iberoam Micol* 22: 163-166.
- Arrese JE, Piérard-Franchimont C, Piérard GE 1996. Fatal hyalohyphomycosis following onychomycosis in an immunocompromised patient. *Am J Dermatopathol* 18: 196-198.

- Azadzadeh M, Al-Sweih NA, Ahmad S, Khan ZU 2008. Antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* isolates in Kuwait. *Mycoses* 51: 318-323.
- Ballesté R, Mousqués N, Gezuele E 2003. Onicomycosis. Revisión del tema. *Rev Med Uruguay* 19: 93-106.
- Barber K, Claveau J, Thomas R 2006. Review of treatment for onychomycosis: consideration for special populations. *J Cutan Med Surg* 10: 48-53.
- Barros MES, Santos DA, Hamdan JS 2006. *In vitro* methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. *Micol Res* 110: 1355-1360.
- Barros MES, Santos DA, Hamdan JS 2007. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). *J Med Microbiol* 56: 514-518.
- Bassiri-Jahromi S, Khaksari AA 2009. Epidemiological survey of dermatophytosis in Tehran, Iran, from 2000 to 2005. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 75: 142-147.
- Bonifaz A, Cruz-Aguilar P, Ponce RM 2007. Onychomycosis by molds. Report of 78 cases. *Eur J Dermatol* 17: 70-72.
- Brilhante RSN, Cordeiro RA, Medrano DJA, Rocha MFG, Monteiro AJ, Cavalcante CSP, Meireles TEF Sidrim JJC 2005. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 131-135.
- Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC 2009. *In vitro* activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Exp Dermatol*. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2009.03698.x
- Calvo MCR, Gil J, Ocariz IR, Benito R, Rezusta A 2003. Actividad *in vitro* de fluconazol, voriconazol y posaconazol frente a *Candida* spp. *Rev Esp Quimioterap* 16: 227-232.
- Campos IS, Hernández-Chavarría F 2005. *Fusarium* como agente etiologico de onicomycosis: informe de tres casos y revision de la literature. *Rev Costarric Cienc Méd* 26: 53-59.
- Carrilo-Munoz AJ, Giusiano G, Cárdenes D, Hernández-Molina JM, Eraso E, Quindós G, Guardia C, Valle O, Tur-Tur C, Guarro J 2008. Terbinafine susceptibility patterns for

onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *International J of Antimicrobial Agents* 31: 540-543.

Cavallera E, Asbati M 2006. Onicomycosis por hongos filamentosos no dermatófitos. *Dermatol Venez* 44: 4-10.

Cetinkaya Z, Kiraz N, Karaca S, Kulac M, Ciftci IH, Aktepe OC, Altindis M, Kiyildi N, Piyade M 2005. Antifungal susceptibilities of dermatophytic agents isolated from clinical specimens. *Eur J Dermatol* 15: 258-61.

Chagas-Neto TC, Chaves GM, Colombo AL 2008. Update on the genus *Trichosporon*. *Mycophatol* 166: 121-132.

Chen SCA, Sorrel TC 2007. Antifungal agents. *Med J Aust* 187: 404-409.

Chi CC, Wang SH, Chou MC 2005. The causative pathogens of onychomycosis in southern Taiwan. *Mycoses* 48: 413-420.

Chinelli PAV, Sofiatti AA, Nunes RS, Martins JEC 2003. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 45: 259-263.

Choudhary SV, Koley S, Mallick S, Bose S, Basak S 2009. Proximal subungueal onychomycosis caused by *Aspergillus flavus* in a HIV-positivo patient. *Indian J Dermatol Leprol* 75: 410-412.

Colella MT, Castro M, Montiel M, Vásquez E, Mata-Essayag S, Magaldi S, Hartung de Capriles C, Pérez C, Olaizola C, Arántza R 2006. Susceptibilidad antifúngica em dermatofitos. *Kasmera* 34: 85-92.

Costa M, Sena XP, Sousa LKH, Miranda ATB, Lemos JA, Júnior JGO, Silva MRR 2002. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, Go, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 19-22.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. CLSI document M38-A. Wayne, Pa: *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2002.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. CLSI document M27-A2. Wayne, Pa: *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2002.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. CLSI document M27-S3. Wayne, Pa: *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2008.

Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL 2002. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev Iberoam Micol* 19: 133-38.

Cunha MML, Santos LPB, Dornelas-Ribeiro M, Vermelho AB, Rozental S 2009. Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: a primary causative agent of onychomycosis. *Immunol Med Microbiol* 55: 396-403.

Dangelo JG, Fattini CA 2007. Anatomia humana sistêmica e segmentar. 3º ed. São Paulo, Editora Atheneu, p. 218.

Das NK, Ghosh P, Das S, Bhattacharya S, Dutta RN, Sengupta SR 2008. A study on the etiological agent and clinico-mycological correlation of fingernail onychomycosis in eastern India. *Indian J Dermatol* 53: 75-79.

Debruyne D, Coquerel A 2001. Pharmacokinetics of antifungal agents in onychomycosis. *Clin Pharmacokinet* 40: 441-472.

Djeridane A, Djeridane Y, Ammar-Khodja A 2006. Epidemiological and aetiological study on tinea pedis and onychomycosis in Alergia. *Mycoses* 49: 190-196.

Di Dio LJA 1999. Tratado de anatomia aplicada. Vol.II 1º ed. São Paulo, Póluss Editorial, p.938-939.

Dogra S, Kumar B, Bhansali A, Chakrabarty A 2002. Epidemiology of onychomycosis in patients with diabetes mellitus in India. *Inter J Dermatol* 41: 647-651.

Dolapci I, Tekeli A, Gocmen JS, Aysev D, Guriz H 2002. Investigation of *Candida dubliniensis* in *Candida* spp-positive hemocultures. *Acta Path Microbial Scand* 110: 391-395.

Dolenc-Voljc M 2005. Dermatophyte infection in the Ljubljana region. Slovenia, 1995-2002. *Mycoses* 48: 181-186.

Dorko E, Jautová J, Tkáčiková L, Wantrubová A 2002. The frequency of *Candida* species in onychomycosis. *Folia Microbiol* 6: 727-731.

- Elewski BE 1998. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clin Microbiol Rev* 11: 415-429.
- Ellabib MS, Agaj M, Khalifa Z, Kavanagh K 2002. Yeasts of the *Candida* are the dominant cause of onychomycosis in Libyan women but not men: results of a 2-year surveillance study. *Br J Dermatol* 146: 1038-1041.
- Escobar ML, Carmona-Fonseca J 2003. Onicomycosis por hongos ambientales no dermatofíticos. *Rev Iberoam Micol* 20: 6-10.
- Escutia B, Febrer I, Pemán J, Oliver V, Sánchez-Carazo 2001. *Tinea capitis* por *Microsporum audouinii*. *Rev Iberoam Micol* 18: 88-90.
- Faggi E, Pini G, Campisi E, Martinelli C, Difonzo E 2005. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients and in a yeast culture collection. *Mycoses* 48: 211-215.
- Favre B, Hofbauer B, Hildering KS, Ryder NS 2003. Comparison of *in vitro* activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. *J Clin Microbiol* 41: 4817-4819.
- Fernández-Torres B, Carrilo-Munoz A, Inza I, Guarro J, 2006. Effect of culture medium on the disk diffusion method for determining antifungal susceptibilities of dermatophytes. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2222-2224.
- Figueiredo VT, Santos DA, Resende MA, Hamdan JS 2007. Identification and *in vitro* antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp responsible for fingernail infections. *Mycopathol* 164: 27-33.
- Finch JJ, Warshaw EM 2007. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. *Dermatol Ther* 20: 31-46.
- Fleckman P 2002. Onychomycosis: diagnosis and topical therapy. *Dermatol Ther* 15: 71-77.
- Garg A, Venkatesh V, Singh M, Pathak KP, Kaushal GP, Agrawal SK 2004. Onychomycosis in central India: a clinicoetiologic correlation. *Inter J Dermatol* 43: 498-502.

- Garmendia JL, Viedma PI, Arza JM 2008. Onicomycosis: diagnóstico y tratamiento. *Inf Ter Sist Nac Salud* 32: 83-92.
- Gautret P, Rodier MH, Kauffmann-Lacroix C, Jacquemin JL 2000. Case report and review. Onychomycosis due to *Candida parapsilosis*. *Mycoses* 43: 433-435.
- Gayosso PM, Hernández FH, Tovar LJM, Morales YP, Martínez EC, Moura EB, Martínez RL 2008. Onychomycosis incidence in type 2 diabetes mellitus patients. *Mycopathol* 166: 41-45.
- Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R 2000. A large scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 43: 641 - 648.
- Godoy P, Nunes F, Silva V, Tomimori-Yamashita J, Zaror L, Fischman O 2004. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brazil. *Mycopathol* 157: 287-290.
- Godoy-Martinez P, Nunes FG, Tomimori-Yamashita J, Urrutia M, Zaror L, Silva V, Fischman O 2009. Onychomycosis in São Paulo, Brazil. *Mycopathol* 168: 111-116.
- Grover S 2003. Clinico-mycological evaluation of onychomycosis at Bangalore and Jorhat. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 69: 284-286.
- Gugnani HC 2000. Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. *Rev Iberoam Micol* 14: 109-114.
- Guilhermetti E, Takahachi G, Shinobu CS, Svidzinski TIE 2007. *Fusarium* spp as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. *Int J Dermatol* 46: 822-826.
- Gunduz T, Metin DY, Sacar T, Hilmioglu S, Baydur H, Inci R, Tümbay E 2006. Onychomycosis in primary school children: association with socioeconomic conditions. *Mycoses* 49: 431-433.
- Gupta AK, Scher RK, Doncker PD 1997. Current management of onychomycosis. An overview. *Dermatol Clin* 15: 121-135.

Gupta AK, Humke S 2000. The prevalence and management of onychomycosis in diabetes patients. *Eur J Dermatol* 10: 379-384.

Gupta AK, Kohli Y 2003a. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. *Br J Dermatol* 149: 296-305.

Gupta AK, Kohli Y 2003b. Evaluation of *in vitro* resistance in patients with onychomycosis who fail antifungal therapy. *Dermatology* 207: 375-380.

Gupta AK, Ryder JE, Baran R 2003a. The use of topical therapies to treat onychomycosis. *Dermatol Clin* 21: 481-489.

Gupta AK, Ryder JE, Baran R, Summerbell RC 2003b. Non-dermatophytes onychomycosis. *Dermatol Clin* 21: 257-268.

Gupta AK, Ryder JE, Summerbell RC 2003c. The diagnosis of nondermatophyte mold onychomycosis. *Inter J Dermatol* 42 : 272-273.

Gupta AK, Ryder JE, Skinner AR 2004. Treatment of onychomycosis; pros and cons of antifungal agents. *J Cutan Med Surg* 8: 25-30.

Gupta AK, Tu LQ 2006. Therapies for onychomycosis: a review. *Dermatol Clin* 24: 375-379.

Gupta M, Sharma NL, Kanga AK, Mahajan VK, Tegta GR 2007. Onychomycosis: clinico-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73: 389-392.

Han MH, Choi JH, Sung KJ, Moon KC, Koh JK 2000. Onychomycosis and *Trichosporon beigelii* in Korea. *Inter J Dermatol* 39: 266-269.

Haneke E 2006. Surgical anatomy of the nail apparatus. *Dermatol Clin* 24: 291-296.

Hattori N, Shirai A, Sugiura Y, Li W, Yokoyama K, Misawa Y, Okuzumi K, Tamaki K 2005. Onychomycosis caused by *Fusarium proliferatum*. *Br J Dermatol* 153: 647-649.

Hay R 2005. Literature review. Onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19: 1-7.

Hay RJ 1992. Fungal skin infections. *Arch Dis Child* 67: 1065-1067.

- Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51: 2-15.
- Hernández-Salazar A, Carbajal-Pruneda P, Ramón Fernández Martínez RF, Arenas R 2007. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. *Rev Iberoam Micol* 24: 122-124.
- Hilmioglu-Polat S, Metin DY, Inci R, Dereli T, Kiliç I, Tümbay E 2005. Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey – a prospective study. *Mycopathol* 160: 125-128.
- Hof H 2009. Mycoses in the elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 5-13.
- Huang DB, Ostrosky-Zeichner L, Wu JJ, Pang KR, Tyring SK 2004. Therapy of common superficial fungal infections. *Dermatol Therapy* 17: 517-522.
- Jain S, Sehgal VN 2000. Onychomycosis: an epidemio-etilogic perspective. *Inter J Dermatol* 39: 100-103.
- Jain S, Sehgal VN 2001. Itraconazol: un antifungico oral eficaz frente a la onicomioses. *Inter J Dermatol* 40: 1-5.
- Jayatilake JAMS, Tilakaratne WM, Panagoda GJ 2009. Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathol* 168: 165-173.
- Jesudanam TM, Rao GRR, Lakshmi DJ, Kumari GR 2002. Onychomycosis: a significant medical problem. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 68: 326-329.
- Joish VN, Armstrong EP 2002. Newer drugs and overall costs of treating onychomycosis. *Rev Iberoam Micol* 19: 130-132.
- Junqueira LC, Carneiro J 2004. Histologia básica. 10º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 368.
- Kasemi A 2007. *Tinea unguium* in the North-West of Iran (1996-2004). *Rev Iberoam Micol* 24: 113-117.

- Kaur R, Kashyap B, Bhalla P 2008a. Onychomycosis – epidemiology, diagnosis and management. *Indian J Med Microbiol* 26: 108-116.
- Kaur R, Kashyap B, Makkar R 2008b. Evaluation of clinicomycological aspects of onychomycosis. *Indian J Dermatol* 53: 174-178.
- Kioshima ES, Oliveira ACP, Svindzinski TIE 2002. Onicomicoses: do diagnóstico ao tratamento. *Arq Cienc Saúde Unipar* 35: 159-163.
- Koklu E, Gunes T, Kurtoglu S, Gokoglu S, Koklu S 2007. Onychomycosis in a premature infant caused by *Candida parapsilosis*. *Pediatr Dermatol* 24: 155-156.
- Koksall F, Er E, Samasti M 2009. Causative agents of superficial mycoses in Istanbul, Turkey: retrospective study. *Mycopathol* 168: 117-123.
- Korting HC, Schollmann C 2009. The significance of itraconazole for treatment of fungal infections of skin, nails and mucous membranes. *J Dtsch Dermatol Ges* 7: 11-19.
- Kurtzman CP, Fell JW 1998. The Yeasts, a taxonomic study. Elsevier 4^o ed., p. 77-100.
- Lacroix C, Chauvin MF 2008. In vitro of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and terbinafine against *Scytalidium dimitiatum* and *Scytalidium hialinum* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 61: 835-837.
- Larone DH 1996. Culture and identification of dermatophytes. *Clin Microbiol Newsl* 18: 33-40.
- Larruskain J, Pineiro L, Idigoras P, Pérez-Trallero E 2005. Dermatofitosis com lesiones concurrentes a distancia. Importância pronóstica y terapêutica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23: 191-193.
- Leibovici V, Evron R, Dunchin M, Westerman M, Ingber Arie 2009. A population-based study of toenail onychomycosis in israeli children. *Pediatr Dermatol* 26: 95-97.
- Lima KM, Rego RSM, Montenegro F, Silveira NSS 2008a. Espécies fúngicas responsáveis por onicomiose em Recife, Pernambuco. *Rev Bras Anal Clin* 40: 107-110.

- Lima KM, Castro CMMB, Cambuim IIFN, Oliveira JC, Delgado M, Rego RSM 2008b. Hongos filamentosos no dermatofitos: onicomycosis en cuatro pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev Iberoam Micol* 25: 45-49.
- Lorizzo M, Piraccini BM, Tosti A 2007. New fungal nail infections. *Curr Opin Infect Dis* 20: 142-145.
- López NC, Casas C, Sopo L, Rojas A, Portillo PD, Garcia MCC, Restrepo S 2008. *Fusarium* species detected in onychomycosis in Colombia. *Mycoses* 52: 350-356.
- López YM, Torres-Rodriguez JM, Cabello TJ 2005. Estudio de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de mohos y levaduras a itraconazol y voriconazol. *Rev Iberoam Micol* 22: 105-109.
- Llambrich A, Lecha M 2002. Tratamiento actual de las onicomycosis. *Rev Iberoam Micol* 19: 127-129.
- Magalhães AR, Mondino SSB, Silva M, Nishikawa MM 2008. Morphological and biochemical characterization of the aetiological agents of white piedra. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 786-790.
- Mahoney JM, Bennet J, Olsen B 2003. The diagnosis of onychomycosis. *Dermatol Clin* 21: 463-467.
- Mahmoudabadi AZ 2005. A study of dermatophytosis in South West of Iran (Ahwaz). *Mycopathol* 160: 21-24.
- Mahmoudabadi AZ, Zarrin M 2005. Onychomycosis with *Aspergillus flavus*; a case report from Iran. *Pak J Med Sci* 21: 497-498.
- Maraki S, Nioti E, Mantadakis E, Tselentis Y 2007. A 7-year survey of dermatophytoses in Crete, Greece. *Mycoses* 50: 481-484.
- Marchisio VF, Fusconi A, Querio FL 2000. *Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or a keratinolytic fungus? *Mycoses* 43: 281-292.
- Marteloza IC, Guilhermetti E, Svidzinski TIE 2005. Ocorrência de onicomycose em Maringá, estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci I Health Sci* 27: 177-182.

- Meireles TEF, Rocha MFG, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Sidrim JJC 2008. Successive mycological nail tests for onychomycosis: a strategy to improve diagnosis efficiency. *Bras J Infec Dis* 12: 333-337.
- McClellan KJ, Wiseman LR, Markham A 1999. Terbinafine. An update of its use in superficial mycoses. *Drugs* 58: 179-202.
- Michelim L, Atti JL, Panarotto D, Lovatto L, Boniatti MM 2004. Dermatoses em pacientes infectados pelo HIV com a contagem de linfócitos CD4. *Rev Saúde Pública* 38: 758-763.
- McCarthy DJ 2004. Origins of onychomycosis. *Clin Podiatr Med Surg* 21: 533-553.
- Mügge C, Haustein UF, Nenoff P 2006. Causative agents of onychomycosis – a retrospective study. *J Dtsch Dermatol Ges* 4: 218-228.
- Negroni R 2008. Tratamiento de las onicomycosis. *Rev Patol Trop* 37: 89-109.
- Neji S, Makni F, Cheikhrouhou F, Sellami A, Sellami H, Marreckchi S, Turki H, Ayadi A 2009. Epidemiology of dermatophytoses in Sfax, Tunisia. *Mycoses* 52: 534-538.
- Neupane S, Pokhrel DB, Pokhrel BM 2009. Onychomycosis: a clinico-epidemiological study. *Nepal Med Coll J* 11: 92-95.
- Ninet B, Jan I, Bomtems O, Léchenne B, Jousson O, Lew D, Schrenzel J, Panizzon RG, Monod M 2005. Molecular identification of *Fusarium* species in onychomycosis. *Dermatology* 210: 21-25.
- Ngwogu AC, Otokonefur TV 2007. Epidemiology of dermatophytoses in a rural community in eastern Nigeria and review of literature from Africa. *Mycophatol* 164: 149-158.
- Nguyen MH, Clancy CJ, Yu YV, Morris AJ, Snyderman DR, Sutton DA, Rinaldi MG 1998. Do *in vitro* susceptibility data predict the microbiological response to Amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 177: 425-430.
- Nowrozi H, Nazeri G, Adimi P, Bashashati M, Emami M 2008. Comparison of the activities of four antifungal agents in an *in vitro* model of dermatophyte nail infections. *Indian J Dermatol* 53: 125-128.

- O'Donoghue NB, Moore MK, Creamer D 2003. Onychomycosis due to *Onychocola canadensis*. *Clin Exp Dermatol* 28: 283-284.
- Oliveira JAA, Barros JA, Cortez ACA, Oliveira JSRL 2006. Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. *An Bras Dermatol* 81: 238-243.
- Ortoneda M, Capilla J, Javier PF, Pujol L, Guarro J 2004. *In vitro* interactions of licensed and novel antifungal drugs against *Fusarium* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 48: 69-71.
- Oyeka CA, Gughani HC 1997. Keratin degradation by *Scytalidium* species and *Fusarium solani*. *Mycoses* 41: 73-76.
- Ozkutuk A, Ergon C, Yulug N 2007. Species distribution and antifungal susceptibilities of dermatophytes during a one year period at a university hospital in Turkey. *Mycoses* , 50: 125–129
- Palacio A, Guétara MS, Garau M, Perea S 2006. Onychomycosis: a prospective survey of prevalence and etiology in Madrid. *Inter J Dermatol* 45: 874-876.
- Passos XS, Costa CR, Araújo CR, Nascimento ES, Souza LKH, Fernandes OFL, Sales WS, Silva MRR 2007. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathol* 163:145-151.
- Pastor FJ, Guarro J 2007. El papel del voriconazol en el tratamiento de las micosis emergentes. *Rev Iberoam Micol* 24: 228-232.
- Pontarelli LN, Hasse J, Galindo CC, Coelho MPP, Nappi BP, Santos JI 2005. Onychomycosis by *Scytalidium dimidiatum*: report of two cases in Santa Catarina, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 47: 351-353.
- Raju PVK, Raghurama RG, Ramani TV, Vandana S 2005. Skin disease: clinical indicator immune status in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Inter J Dermatol* 44: 646-649.
- Rezende C, Borsari GP, Silva ACF, Cavalcanti FR 2008. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Anal Clin* 40: 13-16.

- Robert R, Pihet M 2008. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathol* 166: 295-306.
- Rodgers P, Bassler M 2001. Treating onychomycosis. *Am Fam Physician* 63: 663-672.
- Rosso JQD 2000. Current management of onychomycosis and dermatomycoses. *Curr Infect Dis Rep* 2: 438-445.
- Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, Loebenberg D, Black TA, McNicholas PM 2006. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeast. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2009-2015.
- Santos DA, Barros MES, Hamdan JS 2006. Establishing a method of inoculums preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *J Clin Microbiol* 44: 98-101.
- Santos DA, Hamdan JS 2007. *In vitro* activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. *Mycoses* 50: 286-289.
- Sarma S, Capoor MR, Deb M, Ramesh V, Aggarwal P 2008. Epidemiologic and clinicomycologic profile of onychomycosis from north India. *Inter J Dermatol* 47: 584-587.
- Sarifakioglu E, Seçkin D, Demirbilek M, Can F 2007. *In vitro* antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing *tinea unguium*. *Clin Exp Dermatol* 32: 675-679.
- Saunte DML, Holgersen JB, Edersdal MH, Strauss G, Bitscii M, Svendsen OL, Arendrup MC, Svejgaard EL 2006. Prevalence of toe nail onychomycosis in diabetic patients. *Acta Derm Venereol* 86: 425-428.
- Sayed FE, Ammourey A, Haybe RF, Dhaybi R 2006. Onychomycosis in Lebanon: a mycological survey of 772 patients. *Mycoses* 49: 216-219.
- Scher RK, Tavakkol A, Sigurgeirsson B, Hay RJ, Joseph WS, Tosti A, Fleckman P, Ghannoum M, Armstrong DG, Markinson BC, Elewski BE 2007. Onychomycosis: diagnosis and definition of cure. *J Am Acad Dermatol* 56: 939-944.

Seebacher C, Brasch J, Abeck D, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Haake N, Hamm G, Hippler UC, Hof H, Korting HC, Mayser P, Ruhnke M, Schlacke KH, Tietz HJ 2007. Onychomycosis. *Mycoses* 50: 321-327.

Segal R, Kimchi A, Kritzman A, Inbar R, Segal Z 2001. The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. *Mycoses* 43: 349-353.

Sehgal VN, Aggarwal AK, Srivastava G, Gupta M, Chaudhary A 2007. Onychomycosis: a 3-year clinicomycologic hospital-based study. *Skinmed* 6: 11-17.

Sehgal VN, Jain S 2000. Onychomycosis: clinical perspective. *Inter J Dermatol* 39: 241-249.

Selleslag D 2006. A case of fusariosis in an immunocompromised patient successfully treated with liposomal amphotericin B. *Acta Biomed* 77: 32-35.

Shemer A, Davidovici B, Grunwald MH, Trau H, Amichai B 2009a. New criteria for the laboratory diagnosis of nondermatophyte moulds in onychomycosis. *Br J Dermatol* 160: 37-39.

Shemer A, Davidovici B, Grunwald MH, Trau H, Amichai B 2009b. Comparative study of nail sampling techniques in onychomycosis. *J Dermatol* 36: 410-414.

Shirwaikar AA, Thomas T, Shirwaikar A, Lobo R, Prabhu KS 2008. Treatment of onychomycosis: na update. *Indian J Pharm Sci* 70: 710-714.

Siqueira ER, Ferreira JC, Pedroso RS, Lavrador MAS, Candido RC 2008. Dermatophyte susceptibility to antifungal azole tested *in vitro* by broth macro and microdilution methods. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 50: 1-5.

Souza EAF, Mota VA, Almeida LMM, Rossi RM, Guilhermetti E, Svidzinski TIE 2007. Frequência de onicomioses por leveduras em Maringá, Paraná, Brazil. *An Bras Dermatol* 82: 151-156.

Souza LK, Fernandes OF, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, Silva MR 2009. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiânia, Brazil. *Mycoses* 53: 68-71.

Straten MRV, Hossain MA, Ghannoum MA 2003. Cutaneous infections: dermatophytoses, onychomycosis and tinea versicolor. *Infect Dis Clin N Am* 17: 87-112.

- Surjushe A, Kamath R, Oberai C, Saple D, Thakre M, Dharmshale S, Gohil A 2007. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73: 397-401.
- Svejgaard EL, Nilsson J 2004. Onychomycosis in Denmark: prevalence of fungal nail infection in general practice. *Mycoses* 47: 131-135.
- Swinne D, Watelle M, Nolard N 2005. *In vitro* activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non *Candida albicans* yeast isolates. *Rev Iberoam Micol* 22: 24-28.
- Szepietowski JC, Reich A, Pacan P, Garlowska E, Baran E, Polish Onychomycosis Study Group 2007. Evaluation of quality of life in patients with toenail onychomycosis by Polish version of an international onychomycosis-specific questionnaire. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21: 491-496.
- Takaha Y, Hiruma M, Shiraki Y, Tokuhisa Y, Sugita T, Muto M 2008. Treatment of dermatophytes onychomycosis with three pulses of terbinafine (500 mg/day 1 for a week). *Mycoses* 52: 72-76.
- Thappa DM 2007. Current treatment of onychomycosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73: 373-376.
- Torres-Rodrigues JM, Madrenys-Brunet N, Siddat M, López-Jodra O, Jimenez T 1998. *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis: report of 12 cases and susceptibility testing to antifungal drugs. *J Eur Ac Dermatol Venereol* 11: 25-31.
- Torres-Rodríguez JM, López-Jodra O 2000. Epidemiology of nail infection due keratinophilic fungi. *Rev Iberoam Micol* 16: 122-135.
- Trovato L, Rapisarda MF, Grego AM, Galata F, Oliveri S 2009. *In vitro* susceptibility of nondermatophyte molds isolated from onychomycosis to antifungal drugs. *J Chemother* 21: 403-407.
- Veer P, Patwardhan NS, Damle AS 2007. Study of onychomycosis: prevailing fungi and pattern of infection. *Indian J Med Microbiol* 25: 53-56.

- Veraldi S, Chiaratti A, Harak H 2009. Onychomycosis caused by *Aspergillus versicolor*. *Mycoses*. DOI 10.1111/j.1439-0507.2009.01720.x
- Vijaya D, Anandkumar BH, Geetha SH 2004. Study of onychomycosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 70: 185-186.
- Vinod S 2006. Clinical mycological evaluation of onychomycosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 66: 238-240.
- Yenisehirli G, Bulut Y, Sezer E, Günday E 2009. Onychomycosis infections in the Middle Black Sea Region, Turkey. *Inter J Dermatol* 48: 956-959.
- Weitzman I, Summerbell RC 1995. The dermatophytes. *Rev Clin Microbiol*. 8: 240-59.
- White TC, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR 2008. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryot Cell* 7:1238-1245.
- Zanardi D, Tubone MQ, Nunes DH, Filho JJS, Pacheco AS 2008. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. *An Bras Dermatol* 83: 119-124.

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA:

Artigo: Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection

DOI: 10.1111/j.1468-3083.2011.01315.x

JEADV

ORIGINAL ARTICLE

Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection

F.S. Aalides,[†] M.H. Chaul,[‡] F.E. El Essal,[†] C.R. Costa,[†] L.K.H. Souza,[†] O.F.L. Fernandes,[†] M.R.R. Silva^{†,*}

[†]Institute of Tropical Diseases and Public Health, and [‡]Department of Dermatology, Federal University of Goiás, Goiânia-Goiás, Brazil

*Correspondence: M.R.R. Silva. E-mail: rosario@iotsp.ufg.br

Abstract

Background Onychomycosis is the nail infection caused by a wide spectrum of fungi species, including yeasts, dermatophytes and filamentous fungi non-dermatophytes (FFND). This fungal infection represents an important medical problem because it involves the patient's life quality.

Objective The aim was to isolate and identify the fungal agents of onychomycosis, and to determine the *in vitro* susceptibility to antifungal agents.

Methods During the period of March 2008 to March 2009, 114 patients clinically suspected of having onychomycosis were examined. Demographic data, mainly age and gender were obtained from each patient. The nail samples collected (136) were submitted to direct examination with potassium hydroxide 20% and grown on Sabouraud dextrose agar. The *in vitro* antifungal susceptibility testing was performed according to the method of broth microdilution, recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

Results Onychomycosis was observed in 95 (83.3%) patients, including 16 men (16.8%) and 79 women (83.2%), with mean age of 48.1 years. *Candida parapsilosis*, *Trichophyton rubrum* and *Fusarium* spp were the fungi most frequently isolated. The most of the isolated yeasts showed susceptibility to antifungal agents studied. Among filamentous fungi, high MIC values to itraconazole were found for *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*, while *Fusarium* spp showed decreased susceptibility to itraconazole and voriconazole.

Conclusion *C. parapsilosis* was the most common fungal species isolated from patients with onychomycosis. The different response obtained by *in vitro* susceptibility testing to drugs shows the importance of these methods to assist clinicians in choosing the best therapeutic option.

Received: 21 February 2011; Accepted: 4 October 2011

Conflict of interest

None declared.

Funding sources

This study was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Introduction

Onychomycosis is a fungal infection that affects fingernails and/or toenails, representing about 50% of all nail infections, and it is considered the most common superficial fungal infection in many countries.^{1,2}

Dermatophytes, yeasts and filamentous fungi non-dermatophyte (FFND) are the aetiological agents of onychomycosis.³ This mycosis represents an important medical problem because it involves the patient's life quality and it has high cost on treatment.⁴ The onychomycosis requires prolonged treatment and it has poor response to therapy.⁵

In vitro antifungal susceptibility testing could help to choose between the different antimycotics used in therapy of onychomycosis.^{6,7} The broth dilution methods according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), by documents M27-A3⁸ and M38-A⁹ with some modifications may be used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antifungal agents used in the treatment of onychomycosis caused by yeasts and filamentous fungi.

The aims of the present study were to determine the incidence of yeast, dermatophytes and FFND as agents of nail infections from patients of a tertiary hospital in Goiânia-GO, Brazil, and to

evaluate the *in vitro* antifungal activity of some antifungal agents against these clinical isolates.

Materials and methods

Patients

This study was conducted with 114 patients clinically suspected of onychomycosis, with a total of 136 samples (toenails and fingernails), attended at the Dermatology Department from *Hospital das Clínicas* in Goiânia – Goiás, Brazil, from March 2008 to March 2009. Demographic data, mainly age and gender were obtained from each patient. Different clinical patterns, such as distal and lateral subungual onychomycosis (DLSO), proximal subungual onychomycosis (PSO), white superficial onychomycosis (SWO) and total dystrophic onychomycosis (TDO), were related for each nail lesion. All patients gave written informed consent to participate in research and the study was approved by Bioethics Committee of *Hospital das Clínicas* in Goiânia-GO (protocol 065/2008).

Isolates

The samples of patient's nails were obtained by subungual scraping using a sterile scalpel. Diagnosis of onychomycosis was proven by direct microscopic examination with 20% potassium hydroxide solution. Only direct microscopy-positive specimens were used for culture examination. If a patient had more than one site of involvement, each one was examined and cultured separately.

The clinical positive samples of the nails were cultured on each one of two isolation media, Sabouraud dextrose agar (Difco™), with and without cycloheximide. This last medium inhibits the growth of some opportunistic moulds. The cultures were incubated at 25°C and examined daily for up to 1 month.

Criteria to adequately define the aetiological agent of onychomycosis were performed according to Grigoriu & Grigoriu¹⁰ and English.¹¹ When the dermatophytes appeared in the culture, they were considered as responsible pathogen, even when other species have grown. Confirmation of a mould as sole aetiological agent was accomplished by reproducibly growth from the nail at different times by repeated culture attempts. The yeasts were implicated as aetiological agents when demonstrated in direct examination and grown in cultures.

The dermatophytes were identified according to standard methods using macroscopic and microscopic characteristics of the colonies, biochemical and physiological tests as urea activity and *in vitro* hair perforation.¹²

The identification of *Candida* strains was performed using germ tube test, micromorphology of colonies on corn meal agar medium (Difco™), carbon and nitrogen assimilation and sugar fermentation.¹³ In addition, all the isolates were streaked in parallel onto CHROMagar™ *Candida* medium plates (Difco™) for presumptive identification of *Candida albicans*. For *Candida* species that could not be identified by the methods cited above, API 20C AUX commercial system was used (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

The filamentous fungi non-dermatophytes were identified by macroscopic morphology and microscopic structures evaluations of the colonies following slide culture on potato dextrose agar (Difco™).

In vitro susceptibility testing

Antifungal susceptibility tests were performed using a broth microdilution method following the protocols of CLSI, according to documents M27-A3⁶ for yeasts and M38-A⁹ with some modifications for filamentous fungi.

Antifungal agents and inoculum preparation for dermatophytes and filamentous fungi non-dermatophytes Ketoconazole (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), terbinafine (Novartis Research Institute, Vienna, Austria) and griseofulvin (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.) were used to evaluate the *in vitro* susceptibility of dermatophytes. Voriconazole (Pfizer International, New York, NY), itraconazole (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium) and amphotericin B (Squibb, Princeton, NJ, USA) were used for FFND.

For preparation of inoculum, the isolates were subcultured on potato dextrose agar at 28°C to produce conidia for 7 days for dermatophytes and 3 days for FFND. The fungal colonies were covered with 5 mL of sterile saline (0.85%), and the suspensions were made by scraping the surface with the tip of a Pasteur pipette. The resulting conidia and hyphal particles were transferred to a sterile tube, allowed to settle for 15–20 min at room temperature to heavy particles, and then the upper suspension was mixed using a vortex mixer for 15 s. The optical density of these suspensions was adjusted using a spectrophotometer at a wavelength of 520 nm to a transmittance level of 70–82%, as established by CLSI for fungi filamentous.⁹ The resulting suspension was diluted to 1:50 in RPMI medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) to obtain the final inoculum size of approximately 2×10^4 to 4×10^4 CFU/mL.

Antifungal agents and inoculum preparation for yeasts Itraconazole (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), voriconazole and fluconazole (Pfizer International, New York, NY) were used to evaluate the *in vitro* susceptibility of yeasts.

The yeast isolates were subcultured on Sabouraud's dextrose agar for 24–48 h at 35°C. Suspensions were prepared in sterile saline (0.85%) and the optical density was adjusted using spectrophotometer to 85% transmittance at a wavelength of 530 nm. This suspension was diluted to 1:50 and then 1:20 in RPMI 1640 medium to obtain the final inoculum size of approximately 1 to 5×10^3 CFU/mL.

Testing procedure for yeasts and filamentous fungi Serial dilutions of the antifungal drugs were performed in RPMI-1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 mol/L morpholinopropanesulfonic acid (MOPS; Sigma Aldrich). Final concentrations

ranged from 0.125 to 64 µg/mL for fluconazole and griseofulvin; and 0.03 to 16 µg/mL for ketoconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B.

Flat-bottom microdilution plates containing 100 µL of serial dilutions of the antifungal drugs were inoculated with 100 µL of the inoculum. The MICs were determined after 5 days of incubation at 28°C for dermatophytes, while for FFND the read was verified daily for the presence of growth at 35°C. For yeasts, the plates were incubated at 35°C and MICs were determined visually after 48 h. The quality control was performed by using standard strain *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) and each sample was tested in duplicate.

For azole agents and griseofulvin, the MIC was defined as the lowest concentration, showing 80% growth inhibition compared with growth in the control (drug-free) well. For terbinafine and amphotericin B, the MIC was defined as the lowest concentration showing 100% growth inhibition.

Interpretative breakpoints for *Candida* spp were applied for fluconazole, itraconazole and voriconazole, according to CLSI recommendation.¹⁴ Isolates with MICs ≥64 µg/mL for fluconazole, ≥1 µg/mL for itraconazole and ≥4 µg/mL for voriconazole were considered resistant. For dermatophytes and FFND there are no standardized thresholds to classify these fungi as susceptible or resistant to antifungal agents.

Results

Among, 114 clinically suspected patients of onychomycosis, 95 (83.3%) had confirmation of this infection, including 16 men (16.8%) and 79 women (83.2%). The age of patient varied from 19 to 84 years (mean age: 48.1 years) and the maximum number was between 40–49 years of age. Toenails involvement was seen in 74 patients, fingernail affection in 14 while seven patients had involvement of both fingernails and toenails. Direct microscopy and fungal cultures were positive in 102 samples. The organisms most frequently found in the nail samples were the yeasts (56.8%), followed by dermatophytes species (30.4%) and FFND (12.7%).

Among the yeasts, *C. parapsilosis* was found in 31 samples (53.4%). This species showed light pink colour in CHROMagarTM *Candida* medium and short pseudohyphae without chlamydoconidia production on corn meal agar medium. *Trichophyton rubrum* was the species most frequently isolated among the dermatophytes, found in 23 samples (74.2%) and *Fusarium* spp was found in eight samples (61.5%) among the FFND. The identification of fungi isolated from nails is showed in Table 1. Of 102 samples was verified that the toenails were more frequently involved, i.e. 84 (82.3%). The fingernails occurred in 17.7% of the patients. The samples of nails infected in relation to aetiological agents and sites involved are showed in Table 2.

Among the clinical pattern of onychomycosis, DLSO was the most common (72.1%), followed by then TDO (13.9%), PSO (11.1%) and SWO (2.9%) as shown in Fig. 1. Dermatophytes, yeasts and FFND could give rise to more than one clinical type.

Table 1 Distribution of microorganism found among 102 nail samples

Yeasts	n	%	Fungi filamentous	n	%
<i>Candida parapsilosis</i>	31	30.5	<i>Trichophyton rubrum</i>	23	22.5
<i>C. albicans</i>	11	10.8	<i>T. mentagrophytes</i>	7	6.9
<i>C. famata</i>	3	2.9	<i>Microsporon gypseum</i>	1	1
<i>C. rugosa</i>	3	2.9	<i>Fusarium</i> spp	8	7.8
<i>C. guilliermondii</i>	3	2.9	<i>Scytalidium hialinum</i>	3	2.9
<i>C. zeylanoides</i>	1	1	<i>Aspergillus versicolor</i>	2	2
<i>C. lusitanae</i>	1	1			
<i>Trichosporon</i> spp	3	2.9			
<i>Geotrichum</i> spp	2	2			
Total	58	56.9		44	43.1

Table 2 Distribution of nail samples infected in relation to its aetiological agents and sites of involvement

Fungal agents	Sites of involvement			
	Toenails		Fingernails	
	n	%	n	%
Yeasts	41	40.2	17	16.7
Dermatophytes	30	29.4	1	1
FFND*	13	12.7	—	—
Total	84	82.3	18	17.7

*Filamentous fungi non-dermatophyte

In vitro susceptibility data for yeast isolates showed low MICs for the most isolates. *C. parapsilosis* isolates were susceptible to antifungal agents tested, but elevated MICs of fluconazole of 8.0 µg/mL were observed for this species. In one *C. albicans* isolate, it was possible to detect resistance to itraconazole with MIC > 1 µg/mL. The geometric means, range, MIC₅₀ and MIC₉₀ of yeasts isolates to fluconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B are showed in Table 3.

In vitro susceptibility for dermatophytes was very similar for each antifungal agent analysed. Terbinafine showed the lowest MIC values to dermatophytes, as the MIC₅₀ was of 0.015 µg/mL for *T. rubrum* and of 0.062 µg/mL for *T. mentagrophytes* with geometric mean of 0.01 for both species. A high MIC value of 16 µg/mL to itraconazole was found for one isolate of *T. rubrum* and one isolate of *T. mentagrophytes*. For the single isolate of *M. gypseum*, *in vitro* susceptibility test showed values of MIC of 0.25 µg/mL for itraconazole, 2 µg/mL for ketoconazole, 0.5 µg/mL for griseofulvin and 0.015 µg/mL for terbinafine.

Filamentous fungi of the genus *Fusarium* showed high MICs for itraconazole and voriconazole with means geometric of 8.72 and 4.76, respectively. In relation to other FFND, it was verified that one *Scytalidium* spp isolate presented high MICs for all antifungal agents tested. The geometric means, range, MIC₅₀ and MIC₉₀ of

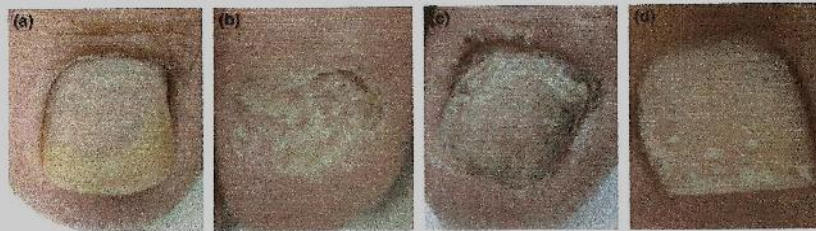


Figure 1 Clinical pattern of onychomycosis. (a) Distal and lateral subungual; (b) total dystrophic; (c) proximal subungual and (d) superficial white.

Table 3 *In vitro* susceptibility data of fluconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B for yeast isolates

Isolates (n)	Antifungal agents	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		Range	MIC ₅₀ [*]	MIC ₉₀ [*]	GM†
<i>C. parapsilosis</i> (31)	Fluconazole	0.25–8	1	8	1.48
	Itraconazole	0.031–0.25	0.125	0.25	0.11
	Voriconazole	0.031–0.5	0.062	0.25	0.08
<i>C. albicans</i> (11)	Fluconazole	0.5–2	1	2	1.07
	Itraconazole	0.062–4	0.125	0.25	0.12
	Voriconazole	0.062–2	0.125	2	0.37
<i>Candida</i> spp‡ (11)	Fluconazole	0.5–32	2	16	3.52
	Itraconazole	0.062–0.5	0.125	0.5	0.14
	Voriconazole	0.031–0.5	0.062	0.5	0.13
Others Yeast§ (5)	Fluconazole	0.5–8	2	8	2
	Itraconazole	0.125–0.5	0.5	0.5	0.31
	Voriconazole	0.062–2	1	2	0.49

*MIC₅₀ and MIC₉₀: MIC at which 50% and 90% of the isolates were inhibited.

†Geometric means.

‡*C. lusitana* (n = 3), *C. rugosa* (n = 3), *C. guilliermondii* (n = 3), *C. lusitanae* (n = 1) e *C. zeylanoides* (n = 1).

§*Trichosporon* spp (n = 3), *Geotrichum* spp (n = 2).

T. rubrum, *T. mentagrophytes* and FFND isolates to antifungal agents studied are showed in Table 4.

Discussion

Onychomycosis represents about 30% of fungal superficial infections, affects the patient's life quality in a significant proportion and, therefore it is considered a problem for public health.^{1,15} This infection occurs at any age, but is more common in adults between 40 and 60 years.¹⁶ In our study, the majority of subjects (62%) were between 40 and 60 years of age. The increased prevalence of onychomycosis in this age group is justified by reduced rate of nail growth and increased trauma of nails compared with the younger age group.¹⁷ Similar to other studies,^{16,18} we verified that the female gender was frequently infected encompassing a total of 83.2% of patients positive for onychomycosis. The prevalence in women can be the result of traumas, as the use of high-heeled shoes or because of manual activities which facilitate such injury. Moreover, women with nail infections seek for medical treatment more often than men.

A high incidence of onychomycosis of the toenails have been reported by various authors.^{19,20} In the present study, the toenails were found to be involved more often (82.3%) than fingernails (17.7%) with a ratio of 4.6 : 1. According to Mügge *et al.*,²¹ this higher proportion could be because of slow growth of toenails when compared with fingernail and/or may be a result of the increased chance of trauma in toenails.

In our study, different clinical manifestations were seen in nail infections. Although DLSO has been predominant (72.4%) in our patients, with common manifestation among dermatophyte infection, we verified that this lesion type could also be caused by yeasts and FFND. Total dystrophic onychomycosis was also seen in a reasonable number of patients (13.9%) without correlation to aetiology. So, by our results it was not possible for the clinico-aetologic correlation. According to Garg *et al.*,²² it is very hard to identify the causative agent by simply looking at the diseased nail.

The main pathogens involved in onychomycosis include yeasts, dermatophytes and non-dermatophyte moulds. Yeasts have been

Table 4 *In vitro* susceptibility data of antifungal drugs for dermatophytes and FFND isolates

Isolates (n)	Antifungal agents	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		Range	MIC ₅₀ *	MIC ₉₀ *	GM†
<i>T. rubrum</i> (23)	Itraconazole	0.062–16	0.25	0.5	0.24
	Ketoconazole	0.062–8	0.25	4	1.34
	Griseofulvin	0.5–2	2	2	0.48
	Terbinafine	0.0075–0.015	0.015	0.015	0.01
<i>T. mentagrophytes</i> (7)	Itraconazole	0.125–16	0.25	16	0.41
	Ketoconazole	0.5–4	0.5	4	1.48
	Griseofulvin	1–8	1	8	0.61
	Terbinafine	0.015–0.062	0.015	0.062	0.01
<i>Fusarium</i> spp (8)	Itraconazole	4–16	8	16	8.72
	Voriconazole	2–8	4	4	4.76
	Amphotericin B	1–2	2	2	1.54
Others FFND‡ (5)	Itraconazole	0.25–16	0.5	16	1.15
	Voriconazole	0.125–16	0.5	8	1
	Amphotericin B	0.062–16	2	16	2.64

*MIC₅₀ and MIC₉₀: MIC at which 50% and 90% of the isolates were inhibited.

†Geometric means.

‡*Scytalidium holium* (n = 3), *Aspergillus versicolor* (n = 2).

quoted in the literature as being responsible for the most cases of onychomycosis.^{2,23} The yeasts were the most common fungi involved as agents of onychomycosis in this study, accounted for 56.9% of cases evaluated. Although *C. albicans* is the main species of this infection,^{2,15} nowadays other species are emerging as aetiological agents.²¹ Among the yeasts isolated in our study, *C. parapsilosis* was found in 53.4% (31 of 58). This yeast has been predominant in several researches.²¹ According to Tavanti *et al.*²⁴ *C. parapsilosis* is separated into three species, *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* which are phenotypically identical. Among the isolates presumed to be *C. parapsilosis*, has been verified in Latin America 12.7% of *C. orthopsilosis*.²⁵ This species have been identified from different body locations including the nails.²⁶ By the way it has been verified that *C. parapsilosis* is able to cleave keratin, representing another step in understanding the pathogenesis of onychomycosis caused by this species.²⁷

Dermatophytes were the second cause of onychomycosis observed in this study. Anthropophilic dermatophytes, such as *T. rubrum*, were observed in 22.5% of subungual samples, representing 74.2% (23 of 31) among the dermatophytes. *T. rubrum* has been observed as the most common dermatophytes that act as aetiological agent of onychomycosis.^{2,26,29} This high prevalence of *T. rubrum* can be explained because this fungus is well adapted to the keratinized tissue of the human host, causing a chronic inflammatory process, and transmission occurs easily from man to man, especially in large urban centres.³⁰

In addition to the causative dermatophytes and yeast, the present study shows that FFND can be the cause of onychomycosis. The incidence of FFND in the pathogenesis of onychomycosis is variable in the epidemiological studies. In this study, FFND were

found in 12.7% of nail samples. Gianni *et al.*,³¹ verified in Italy a percentage of 8%, while Chadeganipour *et al.*,¹⁸ in Iran observed a high percentage (28.4%) of these fungi as causative of onychomycosis. These fungi have lower keratinolytic activity than the dermatophytes, being that they are less capable to cause injury to the nails.³²

The mould most frequently isolated from infected nails was *Fusarium* spp, fungus that has been demonstrated as agent of onychomycosis in many studies. In Taiwan,³³ at 30 cases of onychomycosis by FFND, *Fusarium* spp was found in 17. In the United States,³⁴ *Fusarium* spp was reported in 34.1% of fungal nail infections. In the state of Ceara, Brazil, Brilhante *et al.*,³⁵ observed only the growth of fungi of genus *Fusarium* as agents of onychomycosis by FFND. The role of *Fusarium* spp as a causative agent of onychomycosis is still a big matter of debate. These species are widely distributed in soil and can penetrate and invade the keratinous part of the nails plate, causing infection.³⁶

The methodologies used for *in vitro* antifungal susceptibility may be useful to predict the ability of a given antimicrobial to eradicate determined fungi and the detection of resistance trends by microorganisms. There are few data in our country about the trends in antifungal susceptibility among *Candida* isolates responsible for nail infection. In the present study, we found one *C. albicans* isolate resistant to itraconazole. This drug is an antifungal agent widely available for systemic treatment of onychomycosis,⁷ thus we recommended cautious for use of itraconazole against different *Candida* strains. Although in the present study, there were no *C. parapsilosis* resistant to antifungal agents, 19.4% of isolates had MICs of fluconazole of 8 $\mu\text{g/mL}$. These results suggest the presence of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* among the *C. parapsilosis sensu lato* isolates. According to Lockhart *et al.*,²⁵ the

MICs distributions of *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* were higher than those of *C. parapsilosis*. Miranda-Zapico et al.³⁷ verified one *C. metapsilosis* isolated from a patient with otite externa resistant to fluconazole.

For dermatophytes, there is no protocol to establish whether these fungi are resistant or sensitive to antifungal agents. In the present study, the evaluation of *in vitro* activity of antifungal agents tested revealed that terbinafine was the most effective agent in inhibiting growth of dermatophytes (with low MIC values). These results are similar to several researchers that verified that *in vitro* activity was satisfactory with this drug.^{34,38,39} Terbinafine can be very useful for the treatment of onychomycosis associated to dermatophytes.³⁹

Although among the azole derivatives, itraconazole has showed lower MIC values for the dermatophytes as observed by geometric means results, of 0.24 for *T. rubrum* and 0.41 for *T. mentagrophytes*, we found two isolates that presented MIC of 16 µg/mL for this drug. Similar data of *in vitro* susceptibility of dermatophytes to itraconazole have been verified by Gupta & Kohli.⁴⁰

In the present study, itraconazole and voriconazole showed very high MICs for most *Fusarium* isolates. These drugs have been reported to be used to treat fungal infections in immunocompromised patients, including those caused by *Fusarium* spp.^{36,41,42} There are no consensuses about the *in vitro* activity of drugs for these fungi. Although Ortoneda et al.⁴³ and Selleslag⁴⁴ have showed that the antifungal agents have limited activity against these fungi, Bueno et al.³⁸ showed low MICs of voriconazole for *Fusarium* species. Despite its nephrotoxicity and its low efficacy, amphotericin B is still the drug used for the clinical treatment of fusariosis.⁴⁴ Although this drug is not used for onychomycosis treatment, it was taken as the antifungal reference and, in our study, low MIC values of this drug were found for *Fusarium* species.

Onychomycosis, caused by *Fusarium*, can be the starting point to a systemic infection in immunocompromised patients, being of great importance the appropriate choice of antifungal for treating infections caused by this filamentous fungus.⁴⁵ According to Cuenca-Estrella & Rodríguez-Tudela,⁴⁶ the results of *in vitro* susceptibility to antifungal agents provides reliable evidence to assist in clinical treatment.

Antifungal activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B presented in our study high MICs for *Scytalidium hyalinum*. These results can be explained by clinical response of onychomycosis caused by FFND, which are generally more resistant to treatment.³⁸ High MIC values *in vitro* susceptibility tests have been reported by other researchers who evaluated different antifungal agents for several species of FFND.^{47,48} According to Bueno et al.³⁸ the FFND have *in vivo* and *in vitro* resistance to most available antifungal drugs.

In conclusion, *C. parapsilosis* emergent yeast was the most common fungal species isolated from clinical samples of the fingernails and toenails of patients with onychomycosis. The different

responses to drugs obtained by *in vitro* susceptibility testing of fungi causative of onychomycosis show the importance of these methods to assist clinicians in choosing the best therapeutic option.

References

- 1 Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis – epidemiology, diagnosis and management. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26: 108–116.
- 2 Souza LK, Fernandes OF, Passos XS et al. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiânia, Brazil. *Mycoses* 2009; 53: 68–71.
- 3 Seebacher C, Brasch J, Abeck D et al. Onychomycosis. *Mycoses* 2007; 50: 321–327.
- 4 Szepletowski JC, Reich A, Pacan P et al. Evaluation of quality of life in patients with toenail onychomycosis by Polish version of an international onychomycosis-specific questionnaire. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2007; 21: 491–496.
- 5 Garrillo-Munoz AJ, Tur Tur C, Hernandez Molina JM et al. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 49–56.
- 6 Gupta AK, Tu LQ. Therapies for onychomycosis: a review. *Dermatol Clin* 2006; 24: 375–379.
- 7 Lorizzo M, Piraccini BM, Tosti A. Today's treatment options for onychomycosis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2010; 8: 875–879.
- 8 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*. CLSI Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
- 9 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. CLSI Document M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2002.
- 10 Gregoriu D, Gregoriu A. Les onychomycoses. *Med Suisse Romande* 1975; 95: 839–849.
- 11 English MP. Nails and fungi. *Br J Dermatol* 1976; 94: 697–701.
- 12 Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 240–259.
- 13 Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, 1998: 77–100.
- 14 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*. CLSI Document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
- 15 Koksal F, Er B, Samast M. Causative agents of superficial mycoses in Istanbul, Turkey: retrospective study. *Mycopathol* 2009; 168: 117–123.
- 16 Aghamirian MR, Ghiasian SA. Onychomycosis in Iran: epidemiology, causative agents and clinical features. *Iran J Med Mycol* 2010; 51: 23–29.
- 17 Hof H. Mycoses in the elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 5–13.
- 18 Chadeganipour M, Nilipour S, Ahmadi G. Study of onychomycosis in Isfahan, Iran. *Mycoses* 2009; 53: 153–157.
- 19 Gupta M, Sharma NL, Kanga AK, Mahajan VK, Tegta GR. Onychomycosis: clinico-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. *Indian J Dermatol Venerol Leprol* 2007; 73: 389–392.
- 20 Adhikari I, Das Gupta A, Pal R, Singh TS. Clinico-etiological correlates of onychomycosis in Sikkim, India. *J Pakist Microbiol* 2009; 52: 194–197.
- 21 Mägge C, Hausteiner U, Nenoff P. Causative agents of onychomycosis – a retrospective study. *J Dtsch Dermatol Ges* 2006; 4: 218–228.
- 22 Garg A, Venkatesh V, Singh M et al. Onychomycosis in central India: a clinicoetiological correlation. *Int J Dermatol* 2004; 43: 498–502.
- 23 Lima KM, Rego RSM, Montenegro F et al. Espécies fúngicas responsáveis por onicomicose em Recife, Pernambuco. *Rev Bras Anal Clin* 2008; 40: 107–110.
- 24 Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *J Clin Microbiol* 2003; 43: 284–292.

- 25 Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA *et al.* Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2659–2664.
- 26 Mohammadi R, Mirhendi H, Yadegari MH *et al.* Evaluation of prevalence of the new *Candida* species (*C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*) among *C. parapsilosis* group isolated from patients by PCR-RFLP of SADH gene in Iran. *J Isfahan Med School* 2011; **29**: 134.
- 27 Vermelho AB, Mazotto AM, Melo CAN *et al.* Identification of a *Candida parapsilosis* strain producing extracellular serine peptidase with keratinolytic activity. *Mycopathologia* 2010; **169**: 57–65.
- 28 Sarma S, Kapoor MR, Deb M *et al.* Epidemiologic and clinicomycologic profile of onychomycosis from north India. *Int J Dermatol* 2008; **47**: 584–587.
- 29 Neji S, Makni F, Cheikhrouhou F *et al.* Epidemiology of dermatophytoses in Sfax, Tunisia. *Mycoses* 2009; **52**: 534–538.
- 30 Chinelli PAV, Sofiati AA, Nunes RS *et al.* Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; **45**: 259–263.
- 31 Gianni C, Cerri A, Crosti C. Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. *Mycoses* 2000; **43**: 29–33.
- 32 Gugnani HC. Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. *Rev Iberoam Micol* 2000; **14**: 109–114.
- 33 Chi CC, Wang SH, Chou MC. The causative pathogens of onychomycosis in southern Taiwan. *Mycoses* 2005; **48**: 413–420.
- 34 Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R. A large scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 2000; **43**: 641–648.
- 35 Brilhante RSN, Cordeiro RA, Medrano DJA *et al.* Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; **100**: 131–135.
- 36 Gupta AK, Ryder JE, Baran R *et al.* Non-dermatophytes onychomycosis. *Dermatol Clin* 2003; **21**: 257–268.
- 37 Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández Almaraz JL *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2315–2322.
- 38 Bueno JG, Martínez C, Zapata B *et al.* *In vitro* activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Exp Dermatol* 2010; **35**: 658–663.
- 39 Takahata Y, Hiruma M, Shimki Y *et al.* Treatment of dermatophytes onychomycosis with three pulses of terbinafine (500 mg/day 1 for a week). *Mycoses* 2008; **52**: 72–76.
- 40 Gupta AK, Kohli Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. *Br J Dermatol* 2003; **149**: 296–305.
- 41 Tattori N, Shirai A, Sugiura Y *et al.* Onychomycosis caused by *Fusarium proliferatum*. *Br J Dermatol* 2005; **153**: 647–649.
- 42 Wu CY, Chen GS, Lan CCE. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* in a woman with diabetes. *Clin Exp Dermatol* 2009; **34**: 772–774.
- 43 Ortoneda M, Capilla J, Javier PH *et al.* *In vitro* interactions of licensed and novel antifungal drugs against *Fusarium* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **48**: 69–71.
- 44 Selleslag D. A case of fusariosis in an immunocompromised patient successfully treated with liposomal amphotericin B. *Acta Bioméd* 2006; **77**: 32–35.
- 45 Arrese JE, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Patal hyalohyphomycosis following onychomycosis in an immunocompromised patient. *Am J Dermatopathol* 1996; **18**: 196–198.
- 46 Cuenca-Festrelle M, Rodríguez-Tudela JL. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev Iberoam Micol* 2002; **19**: 133–138.
- 47 Lacroix C, Chauvin MF. *In vitro* of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and terbinafine against *Scybalidium dimidiatum* and *Scybalidium hirsutum* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 835–837.
- 48 Trovato L, Rapisarda MF, Grego AM *et al.* *In vitro* susceptibility of nondermatophyte molds isolated from onychomycosis to antifungal drugs. *J Chemother* 2009; **21**: 403–407.

10 ANEXOS

Anexo 1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESENVOLVIMENTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG N.º 065/2008

Goiânia, 26/06/2008

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Profª. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva

TÍTULO: "Isolamento e identificação de dermatófitos isolados de pacientes com onicomicose. Suscetibilidade In Vitro e Genotipagem."

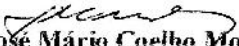
Área Temática: Grupo II - Testes Diagnósticos

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas - Microbiologia

Local de Realização: IPTSP - UFG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, após análise e atendimento à adequação solicitada, **aprovou**, o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

- Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.
- O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).
- O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*)


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, na pesquisa intitulada **“ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS ISOLADOS DE PACIENTES COM ONICOMICOSSES. SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E GENOTIPAGEM”**.

Após ler com atenção este documento você será esclarecido (a) sobre o trabalho a ser realizado, e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Se aceitar participar e decidir retirar seu consentimento, não será prejudicado em seu tratamento. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador, Fábio Silvestre Ataídes nos telefones (62) 3209 61 27 ou 9631 85 45. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: (62) 3269 83 38 – 3269 84 26.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título: **“ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS ISOLADOS DE PACIENTES COM ONICOMICOSSES. SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E GENOTIPAGEM”**.

PESQUISADORES PARTICIPANTES : Prof^ª Dr^ª Maria do Rosário Rodrigues Silva - Investigadora responsável Fone: 62 3209 61 27.

Fábio Silvestre Ataídes – Biomédico / Pesquisador. Fones; 62 3209 61 27 / 9631 85 45

OBJETIVO DO ESTUDO

Será avaliado um grupo de pacientes, atendidos no setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas (HC) durante o período de maio a dezembro de 2008, com suspeita de micose de unha causado por um grupo de microrganismo chamado de dermatófitos.

Este trabalho consiste em identificar o fungo que está causando a micose e realizar um teste, chamado de suscetibilidade, para saber qual medicamento irá combater este fungo. Será realizado ainda um estudo do DNA do fungo, com a finalidade de tentar esclarecer o motivo da dificuldade de cura deste tipo de micose.

CONDUÇÃO DO ESTUDO

Você que procurou o setor de Dermatologia do HC será encaminhado ao Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), onde será coletado

o material de raspado da sua unha para a realização dos exames solicitados pelo seu médico. Se for diagnosticado micose por dermatófitos, no exame direto e na cultura, o tratamento com itraconazol será doado a você, que se comprometerá em retornar para nova coleta de material clínico assim que o tratamento for concluído. Os resultados dos exames antes e após o tratamento serão acompanhados pelo seu médico responsável. Os exames e o tratamento prescritos pelo seu médico serão doados a você que estiver participando da pesquisa.

TRATAMENTO

O medicamento que você irá tomar é o itraconazol na dosagem de 100mg. Este medicamento (itraconazol) é o mais adequado para o tratamento de micoses de unhas, onde o seu médico irá prescrever a receita e também irá lhe explicar a forma de tomar.

A dosagem que você irá tomar será de 4 comprimidos por dia, sendo 2 após o café da manhã e 2 após o jantar durante 7 dias. Você irá ficar sem tomar o medicamento por 21 dias e repetir o procedimento por 2 vezes.

PARTICIPAÇÃO AUTORIZADA

Participar deste estudo será uma decisão autorizada por você, que também poderá se recusar a participar. O período da sua participação na pesquisa será desde o momento da primeira coleta de material da unha até o momento do seu retorno ao setor de Dermatologia onde será apresentado ao médico os resultados dos exames micológicos realizados antes e após o tratamento com itraconazol.

PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO

Com sua autorização, você será incluído neste estudo devido a suspeita clínica de micose de unha por dermatófitos pelo médico que lhe atendeu no setor de Dermatologia do HC da Universidade Federal de Goiás (UFG). Não poderá participar deste estudo pacientes que já estiverem tomando ou passando medicamento para micose, e também mulheres grávidas e crianças.

RISCOS

O médico responsável irá lhe esclarecer todos os possíveis efeitos colaterais decorrentes do tratamento com itraconazol proposto no estudo.

Se você não tomar este medicamento corretamente (sempre após refeições) como o médico explicar, você poderá ter problemas gastrintestinais como: náuseas, vômitos e dores abdominais.

Para colheita do material, você não será maltratado, este procedimento não lhe implicará em nenhum mal estar.

BENEFÍCIOS

O estudo realizado por nós possivelmente contribuirá enormemente para um melhor entendimento em relação ao tratamento conduzido para micose de unha causada pelos fungos. O medicamento escolhido para tratamento, itraconazol é considerado de elevada eficácia.

CONFIDENCIALIDADE

Se você concordar em participar, as informações clínicas e laboratoriais relacionadas e o manuseio de suas amostras clínicas serão confidencialmente mantidas em sigilo o tempo todo, nem o seu nome ou mesmo iniciais irão constar em qualquer registro nesta pesquisa.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____ CPF:

_____ RG: _____ n° _____ prontuário _____

abaixo assinado, concordo em participar do estudo “ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS ISOLADOS DE PACIENTES COM ONICOMICOSSES. SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E GENOTIPAGEM.”, sob a responsabilidade da, Profa. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Fábio Silvestre Ataídes sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data

Assinatura

Pesquisador responsável: Prof^ª Dr^a Maria do Rosário Rodrigues Silva

Pesquisador: Fábio Silvestre Ataídes

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

1° _____

2° _____