

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Danielle Novais Antunes

ONICOMICOSES POR FUNGOS EMERGENTES

Belo Horizonte

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Danielle Novais Antunes

ONICOMICOSSES POR FUNGOS EMERGENTES

Trabalho de Monografia apresentada à
Universidade Federal de Minas Gerais, como
parte das exigências do curso de Pós-
Graduação Lato Sensu em Microbiologia
aplicada às Ciências da Saúde, para a
obtenção de título de Especialista em
Microbiologia.

Orientador: Dra. Susana Johann

Belo Horizonte

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder força e sabedoria diante de todas as dificuldades enfrentadas nessa jornada semanal de Coronel Fabriciano à Belo Horizonte.

Agradeço aos meus pais, amigos e familiares pelo amor, compreensão, consolo, pelo amparo nos momentos mais difíceis, sempre me motivando e me lembrando que com fé e esforço tudo é possível.

Agradeço a toda equipe de professores e funcionários do curso de Especialização em Microbiologia, por toda dedicação e paciência, estando sempre empenhados a contribuir para a construção de um conhecimento cada vez mais amplo.

Às Dras. Beatriz Borelli e Rosana de Carvalho, pela paciência e carinho, contribuindo com grandiosas ideias na construção deste trabalho.

Agradeço em especial à orientadora professora Dra. Susana Johann por sua valiosa dedicação, paciência e generosidade na orientação desse trabalho, sempre pronta a ajudar nas dúvidas que surgiam ao longo do trabalho, além do aprendizado proporcionado.

Agradeço a todos os colegas de classe, em especial à Ângela, Marcela, Luciene e Silvana, amigas que tive o prazer de conhecer na Especialização e as quais tenho um enorme carinho.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho.

"Eu escolhi a que menos gente percorreu, e foi isso o que fez toda a diferença."
Paulo Coelho – O vencedor está só.

RESUMO

As onicomicoses por fungos emergentes são causadas por fungos não dermatófitos e leveduras, que podem residir na pele do hospedeiro e até mesmo serem encontrados no solo, em plantas e dispersos no ar. As principais espécies de fungos filamentosos não dermatófitos causadoras de onicomicoses são: *Fusarium* sp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp, *Onychocola canadensis* e *Scytalidium* sp. Vários outros fungos não dermatófitos como algumas leveduras, principalmente as do gênero *Candida*, também podem parasitar diretamente a lâmina ungueal e causar a infecção. A forma clínica mais frequente de onicomicose por fungos filamentosos não dermatófitos é a proximal, que é associada à inflamação da dobra proximal, podendo ser limitada a região da lúnula ou até afetar a totalidade da unha. Porém, como algumas espécies de fungos não dermatófitos associados como agente causal de onicomicose não apresentam características clínicas peculiares, como por exemplo, o *Acremonium* sp., o diagnóstico correto do agente pode ser comprometido. O diagnóstico clínico de onicomicose baseia-se na procedência do paciente, nos possíveis antecedentes de outras infecções correlacionadas com a onicomicose e também em possíveis tratamentos prévios específicos. Deve ser realizado o exame micológico direto juntamente com o cultivo e a realização de provas bioquímicas. Pode-se ainda se fazer a biópsia da unha para a determinação do agente.

Palavras-chave: Onicomicose, *Candida* sp., *Acremonium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., Microcultivo.

ABSTRACT

Emerging onychomycosis by fungal nail infections are caused by non-dermatophyte fungi and yeasts that can reside on the host's skin and even being found in soil, plant and dispersed in air. The main species of non dermatophyte fungi that cause onychomycosis non include: *Fusarium* sp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp, *Onychocola canadensis* and *Scytalidium* sp. Several other non-dermatophyte fungi and some yeast, especially those of the genus *Candida*, also parasitize directly to the nail plate and cause infection. The most frequent clinical forms of onychomycosis caused by non dermatophyte filamentous fungi is non proximal, which is associated with inflammation of the proximal fold and can be limited region of the lunula or even affect the entire fingernail. However, as some species of non-dermatophyte fungi associated with onychomycosis as causal agent do not exhibit peculiar clinical character, for example, the *Acremonium* sp. The correct diagnostic agent may be compromised. The clinical diagnosis of onychomycosis is based on the patient's origin, the possible history of others correlated infections with onychomycosis and in particular possible previous treatments. It must be done direct mycological examination along with the culture and realization of biochemical tests. We can still make a nail biopsy for determining the agent.

Keywords: Onychomycosis, *Candida* sp., *Acremonium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., Microculture.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL)..... | 17 |
| FIGURA 2 – Onicomicose branca superficial (OBS)..... | 17 |
| FIGURA 3 – Onicomicose subungueal proximal (OSP)..... | 18 |
| FIGURA 4 – Onicodistrofia total (OT)..... | 18 |
| FIGURA 5 – Unhas das mãos com quadro de onicodistrofia parcial e paroníquia..... | 22 |
| FIGURA 6 – Unha do hálux esquerdo apresentando hiperqueratose subungueal distal e lateral e manchas superficiais brancas e opacas..... | 24 |
| FIGURA 7 – Unha apresentando opacificação, sem paroníquia, quebradiça, amarelada e com pontos negros..... | 26 |
| FIGURA 8 – Aspecto da unha apresentando dermatofitoma após a coleta do material subungueal pela técnica de janela..... | 28 |
| FIGURA 9 – Esculpidor discóide-cleóide..... | 28 |
| FIGURA 10 – Esfregaço de tecido com coloração de Gram, revelando pseudohifas e brotamento de blastoconídios característicos de espécie de <i>Candida</i> | 30 |
| FIGURA 11 – Células leveduriformes com brotamentos e formação de pseudomicélio por leveduras do gênero <i>Candida</i> | 31 |
| FIGURA 12 – Hifas hialinas septadas e ramificadas, e artroconídeos visualizados ao microscópio óptico com solução de KOH a 20% (40X)..... | 32 |
| FIGURA 13 – Produção de microconídeos com conidióforo septado do <i>F.solani</i> , (100X)..... | 32 |
| FIGURA 14 – Produção de microconídeos com conidióforo septado do <i>A. kiliense</i> (100X)..... | 33 |
| FIGURA 15 – Aspecto microscópico do <i>A. versicolor</i> com coloração azul de lactofenol..... | 33 |
| FIGURA 16 – Meio Agar sabouraud dextrose com colônias de aspecto cremoso de leveduras do gênero <i>Candida</i> | 35 |
| FIGURA 17 – Meio CHROmagar <i>Candida</i> apresentando colônias de <i>C.albicans</i> , <i>C. Krusei</i> , e <i>C. tropicalis</i> , com coloração verde, rosa e azul respectivamente..... | 35 |
| FIGURA 18 – Prova do tubo germinativo para identificação presuntiva de espécies de <i>C.</i> <i>albicans</i> e <i>Candida</i> spp..... | 36 |
| FIGURA 19 – Aspecto marromorfológico do cultivo de <i>F. solani</i> em Agar sabouraud..... | 38 |
| FIGURA 20 – Morfologia colonial macroscópica do <i>A. versicolor</i> | 39 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 21 – Aspecto macromorfológico da colônia de <i>A. kiliense</i> em Agar batata..... | 39 |
| FIGURA 22 – Fórmulas estruturais de alguns azóis antifúngicos..... | 41 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| QUADRO 01 – Identificação pelas provas do tubo germinativo, auxonograma e zimograma das principais leveduras de importância clínica..... | 37 |
|--|----|

LISTA DE SIGLAS

ASD - Agar Sabouraud Dextrose

CAC - CHROmagar *Candida*

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

KOH – Hidróxido de Potássio

OBS - Onicomicose Branca Superficial

OMS - Organização Mundial da Saúde

OSDL - Onicomicose Subungueal Distal e Lateral

OSP - Onicomicose Subungueal Proximal

OT - Onicodistrofia Total

SIDA - Síndrome Da Imunodeficiência Adquirida

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 14 |
| 2.1.2 Objetivos específicos..... | 14 |
| 3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA..... | 15 |
| 4 METODOLOGIA..... | 15 |
| 5 DEFINIÇÃO DE ONICOMICOSE..... | 16 |
| 6 PRINCIPAIS FUNGOS EMERGENTES CAUSADORES DE ONICOMICOSSES..... | 19 |
| 6.1 <i>Candida</i> spp..... | 19 |
| 6.2 <i>Fusarium</i> spp..... | 23 |
| 6.3 <i>Acremonium</i> spp..... | 24 |
| 6.4 <i>Aspergillus</i> spp..... | 25 |
| 7 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DAS ONICOMICOSSES..... | 27 |
| 7.1 Coleta do material..... | 27 |
| 7.2 Exame microscópico direto..... | 29 |
| 7.3 Micromorfologia..... | 31 |
| 7.4 Cultivo..... | 34 |
| 7.4.1 Cultivo das leveduras..... | 34 |
| 7.4.2 Cultivo de fungos filamentosos..... | 37 |
| 8 PRINCIPAIS AGENTES ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DAS ONICOMICOSSES..... | 40 |
| 8.1 Antifúngicos sistêmicos utilizados no tratamento de onicomicoses..... | 40 |
| 8.2 Antifúngicos tópicos utilizados no tratamento de onicomicoses..... | 43 |
| 9 CONCLUSÃO..... | 44 |
| REFERÊNCIAS..... | 45 |

1 INTRODUÇÃO

A onicomicose é uma infecção fúngica frequente que acomete as unhas, sendo responsável por 15 a 40% das doenças ungueais. As onicomicoses são causadas por diversas espécies de fungos, como: dermatófitos, fungos filamentosos não dermatófitos e leveduras, sendo considerada a micose de mais difícil diagnóstico e tratamento. Ao contrário das infecções superficiais, as infecções cutâneas podem causar alterações patológicas ao hospedeiro devido a respostas imunológicas celulares em que, a intensidade da resposta pode estar diretamente associada com o estado imunológico do paciente acometido, a profissão, perturbações circulatórias periféricas, clima e com a espécie do fungo causador (MURRAY, 2004; MARTINS et. al, 2007; SILVA et. al, 2011; ZANARDI et. al, 2008). Os agentes causadores das onicomicoses dermatofíticas são fungos dos gêneros *Epidermophyton*, *Trichophyton* e *Microsporum*. Os fungos filamentosos não dermatófitos isolados de unhas compõem uma longa lista, porém algumas espécies são as principais causadoras de onicomicoses, incluindo *Fusarium* sp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp, *Onychocola canadensis* e *Scytalidium* sp.. Vários outros fungos não dermatófitos como algumas leveduras, principalmente as do gênero *Candida*, considerados sapróbios, podem também parasitar diretamente a lâmina ungueal, entre os fungos filamentosos não dermatófitos inclui-se algumas espécies dos gêneros *Alternaria*, *Curvularia*, *Hendersonu*, *Penicillium*, *Trichosporon* e *Scytalidium*. Diversos são os fatores que contribuem para a instalação da onicomicose tais como: sexo, perturbações circulatórias periféricas, imunossupressão, traumatismos e fatores de manutenção, como ocupação, clima e disfunção hormonal (ARAÚJO et. al, 2003; FARWA et. al, 2011; MARTINS et. al, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os fungos dermatófitos acometem cerca de 25% da população mundial. Estima-se que aproximadamente 30 a 70% dos adultos sejam portadores assintomáticos desses patógenos e que, a incidência da doença aumente com a idade. Os fungos dermatófitos apresentam caráter cosmopolita, podendo ser encontrados em diferentes regiões do mundo com variações regionais em relação à frequência de determinadas espécies. Porém, a onicomicose causada por fungos filamentosos não dermatófitos e leveduras tem se tornado cada vez mais presente na prática médica. A ocorrência de patologias ungueais por esse grupo de fungos pode dificultar a decisão do

clínico em relação a qual tipo de conduta terapêutica deverá ser estabelecido (LIMA et. al, 2008; PERES et. al, 2010)

Portanto, serão descritos no presente trabalho as principais espécies de fungos não dermatófitos causadores de onicomicoses, assim como as metodologias para a identificação desses patógenos e os tratamentos disponíveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

Desenvolver uma revisão bibliográfica descrevendo os principais fungos emergentes causadores da onicomicose no homem, relatar os principais métodos de identificação e a terapêutica antifúngica disponível.

2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o que é uma onicomicose;
- Caracterizar os principais fungos emergentes causadores de onicomicose;
- Descrever as técnicas de identificação destes fungos emergentes;
- Descrever a forma de tratamento das onicomicoses causadas por fungos emergentes.

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A onicomicose é uma infecção fúngica ungueal considerada uma micose superficial de difícil diagnóstico e tratamento. Nos últimos anos houve um aumento nos casos de onicomicoses por fungos não dermatófitos, que eram até então considerados raros. Pelo fato de nem todos os tipos de infecção por fungos emergentes causadores de onicomicoses estar associados a características clínicas peculiares, a infecção é indistinguível da onicomicose dermatófitica, o que acaba impedindo o diagnóstico correto da doença, levando ao erro no tratamento dos pacientes acometidos. O presente trabalho pretende demonstrar os critérios padrões para o diagnóstico de onicomicose e descrever sua forma de tratamento, auxiliando assim os profissionais de saúde sobre o diagnóstico e a terapêutica mais adequada para esse tipo de infecção.

4 METODOLOGIA

O estudo foi baseado em pesquisa exploratória, com obtenção de dados a partir de uma revisão bibliográfica. Os sites de busca que serão utilizados neste projeto serão: Scielo, Science Direct, Periódicos CAPES e Bireme.

Foram utilizadas as seguintes palavras-chave: Onicomicose, *Candida* sp., *Acremonium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., Microcultivo.

5 DEFINIÇÃO DE ONICOMICOSE

A onicomicose é uma infecção fúngica frequente que acomete as unhas das mãos e dos pés, provocando alterações ungueais caracterizadas pelo deslocamento ungueal na proximidade da cutícula, hiperqueratose subungueal, reação inflamatória e o aparecimento de leuconíquia (MARTINS et al. 2007; ZANARDI et al., 2008). Entre as onicodistrofias, podendo ocorrer na matriz, no leito ungueal e na placa ungueal. A prevalência mundial estimada é de 2%, variando de 30 a 60% em pessoas maiores de 70 anos. Além representar um problema estético para o paciente, a onicomicose pode funcionar como uma porta de entrada para infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos. A onicomicose pode provocar dor, desconforto, limitações físicas e ocupacionais ao paciente. Os efeitos psicológicos e emocionais que resultam das características clínicas da infecção dependem da porta de entrada e do agente infectante (LIMA et al, 2007; PÉREZ et. al, 2011; CAMPOS & MARTÍNEZ,2012).

A classificação das onicomicoses é baseada nos quatro tipos clínicos específicos de alterações ungueais. A (Figura 1) representa a onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL), que é uma variedade clínica de maior frequência (90%), em que a invasão inicia-se no hiponíquio e na borda distal e lateral da lâmina ungueal, alastrando-se de forma lenta e progressiva até o setor proximal da unha. A onicomicose branca superficial (OBS) representada na (Figura 2) corresponde de 2 a 5% das onicomicoses dermatofíticas e acomete com maior incidência crianças. É caracterizada pela penetração *in situ* de estruturas fúngicas rumo ao interior da lâmina ungueal, mais comumente observada nas unhas dos pés, podendo ser facilitada pela presença de traumas anteriores (SCHALKA et. al, 2012; ZANARDI et. al, 2008).



Fig. 1: Onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL). Fonte: MENDONZA et. al, 2012.



Fig. 2: Onicomicose branca superficial (OBS). Fonte: MENDONZA et. al, 2012.

Já a (Figura 3) mostra a onicomicose subungueal proximal (OSP) que é a variante clínica menos comum, podendo ser observada com maior frequência em indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Tem início através da invasão do fungo no estrato córneo da dobra ungueal proximal e subsequente na lâmina ungueal. A onicodistrofia total (OT) representada na (Figura 4) é a forma mais grave da onicomicose, caracterizando-se pelo estágio final da onicomicose por dermatófitos, não dermatófitos ou *Candida sp.* Apresenta o acometimento da matéria ungueal e a totalidade da unha encontra-se alterada (ZANARDI et. al, 2008).



Fig. 3: Onicomicose subungueal proximal (OSP). Fonte: MENDONZA et. al, 2012.



Fig. 4: Onicodistrofia total (OT). Fonte: MENDONZA et. al, 2012.

De acordo com as recomendações da nomenclatura proposta pela “Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal” das infecções fúngicas, o termo onicomicose deve ser substituído pelo termo *tinea unguium* quando o agente for um dermatófito; micoses ungueais quando o agente causador for um fungo filamentosso oportunista ou não dermatófito e oníquia quando por levedura ou candidose ungueal se forem leveduras do gênero *Candida* as responsáveis pelas causas de lesões (ARAÚJO et. al, 2003).

6 PRINCIPAIS FUNGOS EMERGENTES CAUSADORES DE ONICOMICOSE

Grande parte dos autores diagnostica como patógenos mais frequentes das onicomicoses os dermatófitos (80 a 90%), seguido pelas leveduras (5 a 17%) e finalmente fungos filamentosos não dermatófitos (2 a 12%). A distribuição destes patógenos não se dá de maneira uniforme, pois dependem de diversos fatores tais como clima, migração e área geográfica. Na Inglaterra, Austrália e nos Estados Unidos, a prevalência de onicomicose é estimada em torno de 3% da população geral, subindo para 5% em pessoas com idade acima de 55 anos. Nos últimos anos os relatos de onicomicoses não dermatofítica aumentaram rapidamente, especialmente na Europa, em que são responsáveis por 1,6 a 6% dos casos

(ARAÚJO et. al, 2003; MARTINS et. al, 2007; ZANARDI et. al, 2008). Abaixo segue os principais fungos emergentes causadores de onicomicose.

6.1 *Candida* spp.

Os ascomicetos formam um grupo grande e altamente diverso de fungos, variando de espécies principalmente unicelulares, como a levedura do gênero *Candida*, e espécies capazes de se desenvolver na forma filamentosa, como a *Neurospora crassa*, o bolor do pão. Devido a sua capacidade adaptativa, as leveduras conseguem se desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em condição de anaerobiose. Reproduzem-se de maneira assexuada na maioria das vezes, através de fissão binária ou brotamento. Entretanto, algumas leveduras realizam a reprodução sexuada por um processo denominado cruzamento, no qual duas células de leveduras se fundem. No interior dessa célula fundida denominada zigoto, eventualmente forma-se os ascósporos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MADINGAN; et. al, 2010).

As leveduras do gênero *Candida* apresentam grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. São encontradas no trato gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável e cerca de 20 a 30% das mulheres apresentam-se colonizadas por *Candida* na região vaginal (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

As leveduras do gênero *Candida* são detectadas momentos após o nascimento na cavidade oral do recém-nascido e no período de duas a três semanas em todo trato gastrointestinal da criança. A convivência da levedura com o hospedeiro ocorre durante toda a vida, sendo encontradas nas sucessivas microbiotas humanas até o estabelecimento da microbiota definitiva (RIBEIRO et. al, 2004). Porém, em condições em que há o comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro, como por exemplo, o imunocomprometimento, defeito no número e função dos neutrófilos, assim como em células mediadoras da resposta imune e disfunção metabólica, as leveduras do gênero *Candida*

podem tornar-se patogênicas (NIEWERTH; KORTING, 2002; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

São frequentes as infecções sistêmicas causadas por leveduras do gênero *Candida* no hospedeiro imunocomprometido, destacando-se as espécies reconhecidamente patogênicas como: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, sendo consideradas de difícil diagnóstico e apresentando altas taxas de mortalidade e morbidade, apesar das terapias antifúngicas. Pode-se evidenciar atualmente uma marcante mudança no perfil epidemiológico das leveduras nos relatos de casos de infecções por espécies emergentes (MACÊDO et. al, 2009).

A formação do tubo germinativo ou pseudohifa pela *Candida* com consequente desenvolvimento da forma filamentosa, assim como a variabilidade fenotípica (“switching”), a aderência à superfície celular, a produção de enzimas extracelulares e também a produção de toxinas constituem os principais fatores para o desencadeamento da infecção por esse patógeno (SILVA et. al, 2007). *Candida* é capaz de secretar enzimas extracelulares que destroem as membranas celulares do hospedeiro, sendo as proteinases e fosfolipases as principais enzimas produzidas por *C. albicans* e não *albicans*, consideradas um importante fator de virulência. As fosfolipases são enzimas cuja secreção em *C. albicans* é regulada pelo gene PLB1, em que a expressão do gene é afetada por fatores nutricionais, condições ambientais como temperatura e pH e pela fase de crescimento da levedura, tendo como substrato os fosfolipídeos da membrana celular humana. As proteinases são enzimas reguladas por uma família de genes SAP. Possuem atividade proteolítica e degradam queratina, colágeno, peptídeos localizados na superfície de mucosas e, ainda podem atuar sobre componentes do sistema imune, como as globulinas, sistema do complemento e citocinas, facilitando assim a invasão das leveduras aos tecidos dos hospedeiros (RÖRIG et. al, 2009; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

O aumento da frequência de onicomicose tendo como agente causador as leveduras tem sido atribuído a diversos fatores predisponentes sistêmicos e locais. Dentre os fatores sistêmicos, destacam-se o uso de fármacos antibacterianos de amplo espectro, a crescente utilização de imunossupressores em indivíduos submetidos a transplante e o aumento do número de indivíduos imunocomprometidos. Entre os fatores locais, destacam-se algum tipo de trauma nas unhas, o uso de calçados apertados e pouco arejados, resultando em onicólise, o uso de piscinas públicas ou duchas comunitárias e exposição excessiva à umidade (SOUZA et. al, 2007).

Nas onicomicoses causadas por leveduras do gênero *Candida*, o microrganismo invade toda a lâmina ungueal, podendo a infecção ser dividida em três categorias clínicas: A primeira categoria se inicia a partir de paroníquia e posteriormente a infecção penetra a matriz da lâmina ungueal produzindo sulcos transversais, tornando a superfície da unha convexa e áspera. A segunda categoria é de onicomicoses em pacientes com candidíase mucocutânea crônica, característico em pacientes imunossuprimidos, em que há o acometimento por completo das unhas das mãos e dos pés. Por último, a onicomicose distal por *Candida* sp., geralmente a infecção ocorre sem provocar alteração da lâmina ungueal. Quando ocorre o excesso de queratina na unha, ou hiperqueratose distal subungueal, ocorre a separação da lâmina ungueal do canal ungueal, assemelhando-se a uma onicomicose subungueal distal por dermatófitos. A onicomicose distrófica total representa o estágio final da infecção, podendo ser o resultado de qualquer das três classes clínicas descritas (SMYTHE et. al, 2004).

A onicomicose por levedura geralmente apresenta-se mais frequentemente na forma de onicomicose subungueal distal e lateral, apresentando características como hiperqueratose subungueal e onicolise distal, caracterizada pelo deslocamento da lâmina ungueal. Pode ainda haver associação com infecções cutâneas, candidíase mucocutânea crônica, paroníquia primitivo, considerada muitas vezes como infecção secundária, como apresentado na (Figura 5) (SILVA et. al, 2005; SOUZA et. al, 2007).



Fig. 5: Unhas das mãos com quadro de onicodistrofia parcial e paroníquia. Fonte: LIMA et. al, 2008.

No estudo feito por Souza e colaboradores (2007) na cidade de Maringá, Paraná, em que foi avaliada a frequência de onicomicose por leveduras, dentre as leveduras encontradas destacou-se as do gênero *Candida* (91,24%), sendo a espécie mais frequente foi a *C. parapsilosis* seguida por *C. tropicalis* e *C. albicans*. Ainda com base nesse estudo, a onicomicose causada por levedura foi mais prevalente no gênero feminino (82,95%), em que as leveduras mais frequentes foram *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans* (44,53%, 22,60% e 16,79%), em relação ao gênero masculino (15,05%), onde as espécies mais prevalentes foram *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (45,00% e 16,79%). Entretanto, foi observado no estudo que *Geotrichum candidum* foi frequente nas unhas dos pés no gênero masculino, fato que pode ser explicado pelo maior contato do homem com a terra, hábitat natural desse micro-organismo. Martins e colaboradores (2007), em estudo realizado no município de São José do Rio Preto demonstram que em 84% dos casos de onicomicose, a unha dos pododáctilos correspondeu à área mais afetada e a espécie *C. parapsilosis* foi mais prevalente em onicodistrofia total e/ou área distal lateral enquanto *C. albicans*, segundo agente mais comum, acometeu principalmente o leito ungueal e a matrix proximal. Já em quirodáctilos, *C. parapsilosis* e *C. albicans* originaram-se de acometimento distal lateral e onicodistrofia total. Em um estudo com 183 isolados de amostras clínicas de onicomicose na Argentina e no Paraguai, a *C. parapsilosis* foi a espécie mais frequente (37,7%), seguida da espécie *C. albicans* (22,0%) (TROFA et. al, 2008).

6.2 *Fusarium* ssp.

O gênero *Fusarium* é composto por uma variedade de espécies fitopatogênicas e sapróbias do solo, sendo também encontrados em ambientes aquáticos. Sua taxonomia é atualmente definida como pertencente ao reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae, Gênero *Fusarium*. As espécies comumente isoladas como agentes de micoses no homem são: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. chladosporum*, *F. roseum*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. anthophilum*, e *F. graminearum*, sendo o *F. solani*, *F. oxysporum* os agentes mais comuns em onicomicoses (LEAL et. al, 2009; MADINGAN; et. al, 2010). Cerca de 69 espécies conhecidas estão associadas como causadoras de infecção em seres humanos e outros animais, refletindo a grande variedade ecológica e filogenética do gênero. Aproximadamente

80% das infecções humanas causadas por espécies complexas são causadas por *F. solani* e *F. oxysporum*. (SUMMERBELL; SCHOERS, 2002; SHORT, et. al, 2011;).

O gênero *Fusarium* é responsável por causar micoses oportunistas como, micoses subcutâneas localizadas, focalmente invasivas ou disseminadas, tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunocomprometidos. A infecção causada pelo fungo é classificada como disseminada quando dois ou mais órgãos ou tecidos não contíguos são envolvidos. Ao contrário de muitos fungos que entram pelo trato respiratório, o *Fusarium* tem como porta de entrada feridas, traumas locais, solução de continuidade e formação de biofilmes em infecções córneas. Em pacientes imunocomprometidos, o *Fusarium* é o segundo fungo filamentoso mais frequente depois do *Aspergillus*, representando complicação da alta taxa de morbidade e mortalidade. A infecção pelo *Fusarium* ou fusariose está associada principalmente a infecções sistêmicas, sendo condição cada vez mais frequente nos portadores de neoplasias hematológicas. Em pacientes imunocompetentes o principal fator de risco para infecção por *Fusarium* é através de algum tipo de trauma tecidual, favorecendo a entrada do agente no sítio de infecção (ARAGÃO, et. al, 1999; SELLESLAG, 2006; LEAL et. al, 2009; SHORT, et. al, 2011).

Em 1959 foram descritos os dois primeiros casos de onicomicose por *Fusarium*. Uma das pacientes acometida relatou a jardinagem como “hobby”. O agente etiológico que infectou as unhas das mãos das duas pacientes foi identificado como *F. oxysporum* e o tratamento foi realizado com solução tiomersal. As espécies mais frequentes causadoras de micose ungueal por fungo não dermatófitos são as espécies *F. solani* e *F. oxysporum*. As principais características de onicomicoses causadas por essas duas espécies são o comprometimento proximal da unha associado a dor e inflamação periungueal, mostrado na (Figura 6). A unha afetada geralmente apresenta cor branca amarelada e, frequentemente apresenta a superfície opaca. A unha distal pode tomar coloração amarelada quando há progressão da infecção. O período médio de evolução da onicomicose por *Fusarium* varia de um mês a 15 anos, com média de 3 anos (ARAÚJO et. al, 2003; LEAL et. al, 2009).



Fig. 6: Unha do hálux esquerdo apresentando hiperqueratose subungueal distal e lateral e manchas superficiais brancas e opacas. Fonte: LIMA et. al, 2008.

6.3 *Acremonium* spp.

O gênero *Acremonium* é um gênero polifilético, ou seja, não inclui o ancestral comum de todos os indivíduos, que compreende aproximadamente 150 espécies. São em grande maioria sapróbios no solo, mas também são encontrados como patógenos de plantas, insetos e em mamíferos. Nos últimos anos, o número e a diversidade de infecções ocasionadas por espécies de *Acremonium* têm aumentado, sendo também crescente o número de espécies citadas como agentes de infecções localizadas e disseminadas (BRAZ et. al, 2009; PERDOMO et. al, 2011).

As infecções causadas por fungos desse gênero em seres humanos desenvolvem-se após a inoculação traumática do fungo em que, as manifestações principais aparecem como ceratite e micetomas, porém, recentemente apresentam um papel significativo em casos de micoses sistêmicas invasivas em imunossuprimidos e de onicomicoses, tanto em pacientes imunocomprometidos como em pacientes imunocompetentes. As características morfológicas típicas do gênero *Acremonium* incluem um crescimento lento de suas colônias, hifas finas, septadas e alongadas, além de fiálides cônicas isoladas. Nos casos de onicomicoses causadas por *Acremonium* sp. observa-se uma linha branca longitudinal estendendo-se da margem distal para a margem proximal da placa ungueal. A infecção é assintomática, apresentando duração de meses a 4 anos (NOVICKI et. al, 2003; PERDOMO et. al, 2011; RELLOSO et. al, 2011).

6.4 *Aspergillus* spp.

O gênero *Aspergillus* compreende um grupo de fungos anemófilos, pois são dispersos através do ar atmosférico na forma de esporos. São fungos não dermatófitos, encontrados no solo, água e no ar. Porém, apesar de serem considerados fungos com baixo potencial patogênico em pessoas imunocompetentes, podem causar infecção ungueal primária, além de promover a entrada de infecções disseminadas, aumentando a mortalidade em pessoas imunodeficientes (LIMA et. al, 2008).

O gênero *Aspergillus* é isolado com certa frequência em onicomicoses podais. A unha apresenta aspecto branco leitoso, com comprometimento de toda a placa ungueal. Na onicomicose por *A. niger*, a lúnula apresenta uma coloração escura, (Figura 7). A capacidade do *A. niger* causar infecção ungueal foi inicialmente descrita em 1965, entretanto, o *A. niger* pode também ser agente etiológico de otites externas, processos pulmonares e em endofítalmite em pacientes imunocomprometidos (ARAÚJO et. al, 2003; LIMA et. al, 2008).

Estudo realizado por Cambuim e colaboradores (2011), relatam o *A. niger* como agente causal de maior incidência em casos de onicomicoses em pacientes com Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Outras espécies também descritas, causadoras de onicomicoses são: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. níger*, *A. . sydowii*, *A. terreus* ou *A. unguis*.



Fig. 7: Unha apresentando opacificação, sem paroníquia, quebradiça, amarelada e com pontos negros. Fonte: LIMA et. al, 2008.

7 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DAS ONICOMICOSSES

O diagnóstico clínico de onicomicose na anamnese do paciente deve-se basear em pontos fundamentais como: aspecto clínico que será sugestivo de tal lesão, na procedência do paciente, nos possíveis antecedentes de outras infecções correlacionadas com a onicomicose e também em possíveis tratamentos prévios específicos. O diagnóstico micológico da onicomicose, pode ser realizada a raspagem das regiões periféricas da lesão, que é onde o fungo encontra-se mais ativo, com bisturi esterilizado após antissepsia local. Deve ser realizado o exame micológico direto para que se possam observar as estruturas fúngicas presentes na lesão. É fundamental o cultivo para a realização do diagnóstico, devendo a amostra ser inoculada em diferentes meios de cultura, como Sabouraud suplementado ou não com ciclohexamida, CHROMagar para a identificação presuntiva de espécies do gênero *Candida*, juntamente com a realização de provas bioquímicas. Pode ainda se fazer a biópsia da unha, sendo este considerado como método de referência devido sua especificidade e

sensibilidade, porém, o cultivo segue sendo o único método que permite determinar o agente causal da infecção (ARAÚJO et. al, 2003; PÉREZ et. al, 2011; SIQUEIRA et. al, 2006).

7.1 Coleta do material

O tipo e a qualidade da amostra, submetida ao laboratório de micologia são condições importantes no sucesso do isolamento e identificação do agente etiológico de infecções fúngicas. A amostra obtida deve ser adequada em quantidade e transporte, evitando inviabilização do crescimento do patógeno e garantindo o sucesso na visualização e isolamento do agente. Antes de realizar a coleta, o paciente deve ser interrogado quanto a utilização de antifúngicos que podem interferir no resultado do exame, podendo dificultar a visualização do fungo em parasitismo ou no isolamento, resultando em resultados falsos negativos. Deve-se fazer limpeza prévia das unhas, escovando com água e sabão, cortando com auxílio de uma tesoura e desprezando a parte descolada da unha (ANVISA, 2004; LIMA et. al, 2007).

Para a realização da coleta do material em casos de OSP, pode-se também utilizar a técnica da coleta por via transungueal ou a técnica da janela, como demonstrado na (Figura 8). Este procedimento é realizado através da raspagem ao nível da lâmina ungueal externa e progressivamente abrir um orifício em profundidade com auxílio de um esculpido discóide-cleóide representado na (Figura 9) para a realização da coleta da amostra. Essa técnica tem demonstrado ser uma metodologia mais rápida e minimamente invasiva, além de apresentar a vantagem adicional de contribuir para diminuição de agentes contaminantes (LIMA et. al, 2007).



Fig. 8: Aspecto da unha apresentando dermatofitoma após a coleta do material subungueal pela técnica de janela. Fonte: LIMA et. al, 2007.

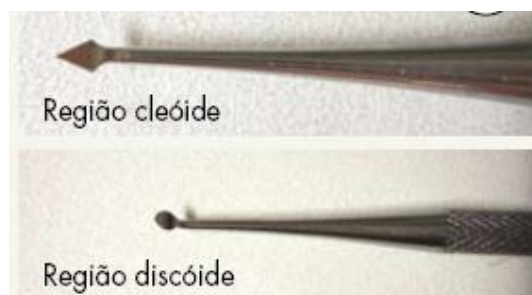


Fig. 9: Esculpidor discóide-cleóide. Fonte: LIMA et. al, 2007.

Para a coleta de OSP, o material é obtido mediante a raspagem da superfície externa da lâmina ungueal afetada com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Nos casos de OSDL, a raspagem deve ser realizada com lâmina de bisturi de ponta fina por baixo da lâmina ungueal, retirando todo material existente entre a zona afetada e a da unha. Já na OT, as amostras devem ser coletadas da região superficial e subungueal da unha e, se houver exsudato também deve ser coletado. Em lesões com infecção da dobra ungueal ou paroníquia, o exsudato é coletado com auxílio de um swab estéril e realizado, se possível, a raspagem por debaixo da região periungueal. Após a coleta, as amostras devem ser alíquotadas em frascos ou placas estéreis para exame microscópico e cultura. Para a cultura, as amostras não podem ser submetidas a nenhum tratamento prévio, devendo ser inoculadas diretamente na superfície do meio de cultura (ANVISA, 2004; LIMA et al, 2007).

7.2 Exame microscópico direto

O exame microscópico direto é recomendado para a análise da maior parte das amostras enviadas para o cultivo de fungos. A observação de um fungo em uma amostra biológica tem grande valor diagnóstico, pois demonstra a invasão do fungo no tecido além de permitir uma informação imediata ao médico, a qual pode ser crucial para estabelecer a terapia apropriada ao paciente. Porém, se a quantidade do material coletado for insuficiente para o exame microscópico e a cultura da amostra, em que, a cultura das amostras tem prioridade sobre o exame microscópico, pois a cultura é o método mais específico e em muitos casos, mais sensível. O microscópio de contraste de fase é útil para realizar o exame direto das amostras, pois além de as preparações poderem ser realizadas e examinadas com rapidez, não há necessidade de coloração direta e todas as estruturas fúngicas podem ser

visualizadas com clareza. O exame microscópico da amostra pode ser realizado por várias técnicas, dependendo do tipo de amostra e da suspeita clínica (ANVISA, 2004; KONEMAN; et. al, 2001).

- EXAME MICROSCÓPICO DIRETO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH) A 20%

O exame microscópico direto é utilizado para exames de pele, pelos, unhas, tecido obtido por biópsia, exsudatos espessos e outros materiais densos. Coloca-se uma gota de KOH (aquoso a 20%) em uma lâmina de microscopia e, sobre esta, uma porção da amostra a ser analisada. Em seguida, cobre-se a preparação com lamínula e, para intensificar a clarificação, pode-se aquecer ligeiramente a lâmina sobre a chama de um bico de Bunsen, sem deixar que a mistura ferva. Pode ser feita a análise da preparação após 20 minutos em microscópio óptico comum, inicialmente com objetiva de 10x, seguida de 40x (ANVISA, 2004).

- EXAME MICROSCÓPICO COM COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM

Todos os fungos corados pelo método de Gram apresentam-se coma coloração roxa escura, assim como bactérias Gram positivos, sendo assim, a utilização da coloração não visa a diferenciação dos fungos, mas possibilita discriminar elementos fúngicos de artefatos existentes em urina, secreções e fezes. Faz-se o espalhamento da amostra em lâmina de microscopia de modo homogêneo, realizando movimentos circulares, fixa-se com calor e se submete à coloração Ao exame direto, a identificação das leveduras é realizada pela observação da presença de pseudomicélio, micélio verdadeiro e produção de clamidosporos, representado na (Figura 10) (ANVISA, 2004; CAMBUIM, et. al, 2011).



Fig. 10: Esfregaço de tecido com coloração de Gram, revelando pseudohifas e brotamento de blastoconídios característicos de espécie de *Candida*. Fonte: adaptado de <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/candidiase/candidiase-13.php>.

7.3 Micromorfologia

Microscopicamente, as células leveduriformes apresentam-se globosas, ovaladas ou ovalada-alongada, medindo cerca de 3 por 7 μm a 3 por 14 μm . A (Figura 11) mostra as células leveduriformes e pseudohifas de leveduras do gênero *Candida* vista ao exame direto (CONCEIÇÃO et. al, 2005; RIBEIRO et. al, 2004).

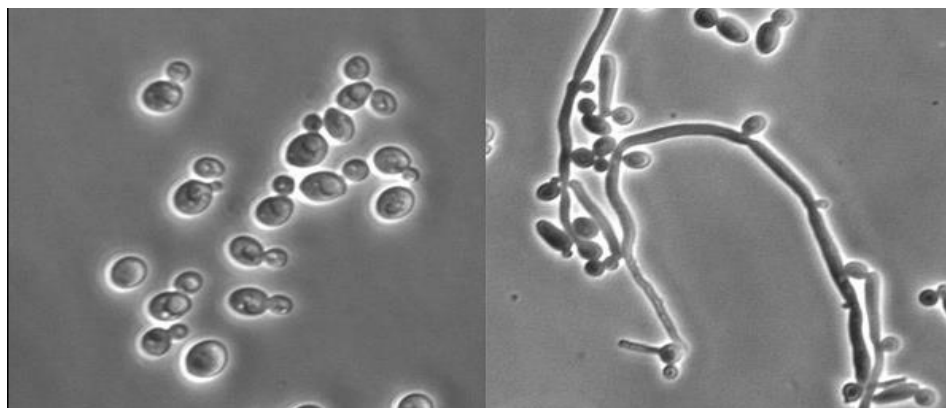


Fig. 11: Células leveduriformes com brotamentos e formação de pseudomicélio por leveduras do gênero *Candida*. Fonte: adaptado de <http://www.scientia.blog.br/wordpress/?p=3387>

No exame direto os dermatófitos apresentam-se como fungos filamentosos, hialinos e septados, como demonstrado na (Figura

12), cujas hifas penetram o extrato córneo da pele e das unhas produzindo enzimas como proteases queratinofílicas, que os permite invadir essas células (LIMA et. al, 2007).

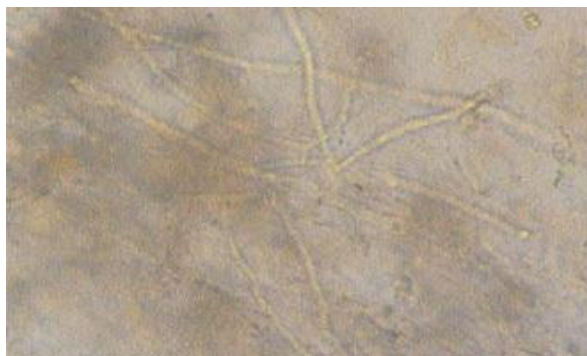


Fig. 12: Hifas hialinas septadas e ramificadas, e arthroconídeos visualizados ao microscópio óptico com solução de KOH a 20% (40X). Fonte: adaptado de <http://www.anaisdedermatologia.org.br/public/figuras.aspx?id=10383>

A principal característica micromorfológica encontrada em comum entre os membros do gênero *Fusarium* é a produção de hifas hialinas alongadas com ramificação irregular, (Figura 13). As espécies de *Acremonium* são morfológicamente semelhantes umas das outras, sendo sua identificação realizada na observação de diferenças sutis. Suas principais características morfológicas são presença de conídeos ovais, pouco alongados e até mesmo arqueados, com clamidoconídeos intercalares e hifas septadas. Conidióforos com fiáides simples e septos basais provenientes de hifas vegetativas, como demonstrado na (Figura 14) (NOVICKI et. al, 2003; SUMMERBELL; SCHOERS, 2002) .

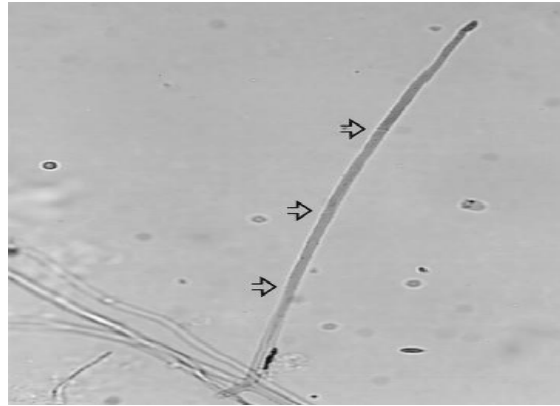


Fig. 13: Produção de microconídeos com conidióforo septado do *F.solani*, (100X). Fonte: SUMMERBELL; SCHOERS, 2002.



Fig. 14: Produção de microconídeos com conidióforo septado do *A. kiliense* (100X). Fonte: NOVICKI et. al, 2003. 1538

O gênero *Aspergillus* apresenta-se bem característico ao microscópio. Ao exame microscópico corado com azul de lactofenol, como mostra a (Figura 15), as espécies do gênero *Aspergillus* apresentam conidióforos largos e sem ramificações, fíalides biseriadas que cobrem completamente a vesícula na qual estão inseridas (LIMA et. al, 2008; ZHANG et. al, 2012).

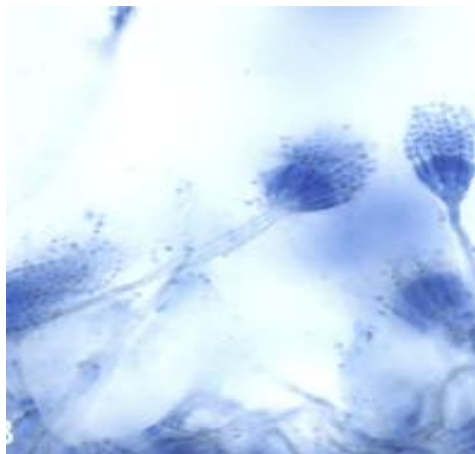


Fig. 15: Aspecto microscópico do *A. versicolor* com coloração azul de lactofenol
 Fonte: ZHANG et. al, 2012.

7.4 Cultivo

Os meios de cultura utilizados para o isolamento primário de fungos a partir de amostras biológicas podem ser adquiridos comercialmente. São essenciais dois tipos de meios de cultura para garantir a recuperação primária de todos os fungos significativos, provenientes de amostras biológicas. Um dos meios deve ser não seletivo, ou seja, deve permitir o desenvolvimento da maioria das espécies de fungos. Deve ser empregado outro meio mais seletivo para a recuperação de fungos. A combinação de antibióticos nos meios, incluindo a penicilina, estreptomomicina, gentamicina e o cloranfenicol podem ser utilizados para inibir o crescimento de bactérias (ANVISA, 2004; KONEMAN; et. al, 2001).

7.4.1 Cultivo de leveduras

Para o cultivo de leveduras, pode-se utilizar o ágar sabouraud dextrose, (Figura 16), para isolamento primário e obtenção de colônias puras, realizando o plaqueamento de cada colônia morfolologicamente distinta em CHROMagar *Candida* (CAC), que é um meio que contém um substrato cromogênico comercializado para detecção e identificação presuntiva e de algumas espécies de leveduras do gênero *Candida* através das características metabólicas e da pigmentação das colônias. Foi originalmente desenvolvido para identificar simultaneamente colônias de *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. krusei* apresentando coloração no meio verde ou azul esverdeada, azul e rosa ou branco rosado, respectivamente para cada

espécie, conforme a (Figura 17). O tempo de incubação das amostras varia de 24 a 72 horas (GIUSIANO; MANGIATERRA, 1998; PFALLER et. al, 1996).



Fig. 16: Meio Agar sabouraud dextrose com colônias de aspecto cremoso de leveduras do gênero *Candida*. Fonte: adaptado de <http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br/index.php/info/conteudo/doencas/micoses/candidiase/>.

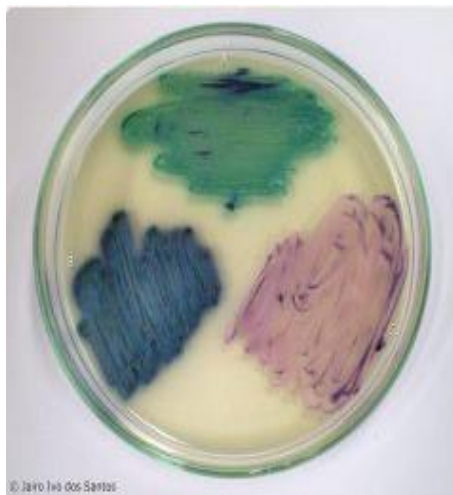


Fig. 17: Meio CHROmagar *Candida* apresentando colônias de *C. albicans*, *C. Krusei*, e *C. tropicalis*, com coloração verde, rosa e azul respectivamente . Fonte: adaptado de <http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br/index.php/info/conteudo/doencas/micoses/candidiase/>

Pode-se distinguir ainda, de maneira presuntiva as espécies de *C. albicans* e *Candida* spp. através da prova do tubo germinativo. Porém outras espécies de *Candida* também podem produzir o tubo germinativo, como por exemplo, a *C. dubliniensis*, que apresenta uma estreita relação filogenética com a *C. albicans*, em que, ambas possuem capacidade de aderência na superfície epitelial, possuem capacidade de secretar proteinases e também de produzir tubo germinativo e clamidoconídeos. Em estudos de Martin (1978), o autor faz a descrição da produção de tubo germinativo por cepas orais de *C. tropicalis*. A técnica da formação do tubo germinativo consiste na suspensão de uma alçada da colônia isolada em 0,5 mL de soro humano, incubando a 37°C por um período máximo de 3 horas (Figura 18). A presença do tubo germinativo mostrado na figura 10, na forma de pequeno filamento brotando do blastoconídeo, sem a formação de constrictões com a célula mãe permite a identificação presuntiva de *C. albicans* (ANVISA, 2004).

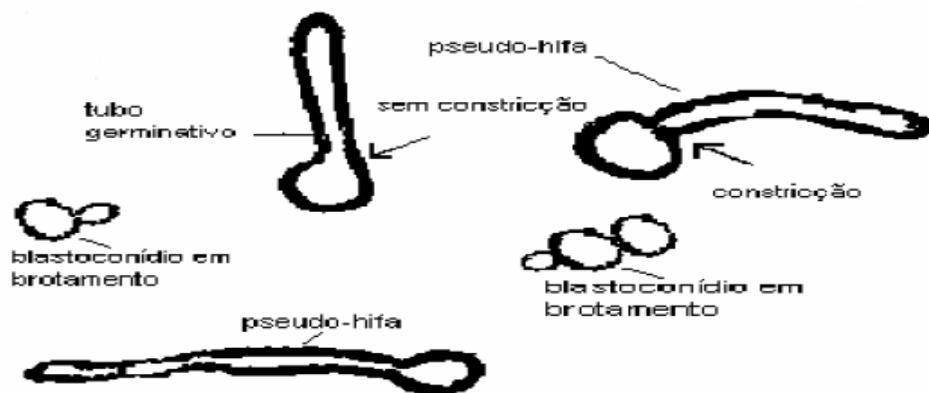


Fig. 18: Prova do tubo germinativo para identificação presuntiva de espécies de *C. albicans* e *Candida* spp. Fonte: ANVISA, 2004.

Caso a identificação presuntiva não conduza à identificação do gênero, provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, auxonograma, e fermentação de carboidratos, zimograma, devem ser realizadas. O auxonograma é realizado com a semeadura da amostra pela técnica “*pour plate*” e, a leitura é feita pelo halo de turvação resultante do crescimento, indicando prova de assimilação positiva para a respectiva fonte. Para o zimograma, várias fontes de carboidratos são colocadas e tubos respectivos contendo meio básico líquido e, a fermentação é revelada pela formação de bolhas de gás, observadas no interior dos tubos de Durham. O (Quadro 01) apresenta os resultados das provas do zimograma e auxonograma para a identificação das espécies de leveduras (ANVISA, 2004).

| Levedura | Tg | Cultivo em lâmina | | Ur | Assimilação | | | | | | | | | Fermentação | | | | | |
|--------------------------|----|-------------------|----|----|-------------|----|----|----|----|----|---|---|-----------------|-------------|----|----|----|----|----|
| | | Hifa | Ar | | Sa | Ma | La | Ce | Tr | Ra | X | I | NO ₃ | Gl | Sa | Ma | La | Ra | Tr |
| <i>C. albicans</i> | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | V |
| <i>C. tropicalis</i> | - | + | - | - | + | + | - | V | + | + | + | - | - | + | V | + | - | - | + |
| <i>C. parapsilosis</i> | - | + | - | - | + | + | - | V | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | V |
| <i>C. krusei</i> | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| <i>C. guilliermondii</i> | - | + | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - | + | V |
| <i>C. glabrata</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + |
| <i>C. neoformans</i> | - | - | - | + | + | + | - | V | + | V | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Geotrichum</i> | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | V | - | - | - | - | - |
| <i>Trichosporon</i> | - | + | + | V | + | + | + | + | V | V | + | V | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhodotorula sp</i> | - | - | - | + | + | V | - | V | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Saccharomyces</i> | - | - | - | - | + | + | - | - | V | + | - | - | - | + | + | + | - | + | V |

Tg = tubo germinativo, Ar = artrósporo, Ur= urease, Sa = sacarose, Ma=maltose,La = lactose, Ce = celubiose, Tr = trealose, Ra = rafinose, X = xilose, I = inositol,NO₃ = nitrato, Gl = glicose, + = pos, - = neg, V= variável

Quadro 01: Identificação pelas provas do tubo germinativo, auxonograma e zimograma das principais leveduras de importância clínica. Fonte: ANVISA, 2004.

7.4.2 Cultivo de fungos filamentosos

A identificação de fungos filamentosos fundamenta-se na observação da morfologia da colônia e nos aspectos microscópicos. Durante a análise da colônia, observa-se a textura, cor, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, podendo ser feita no tubo de ensaio contendo a cultura primária do fungo. A morfologia microscópica é melhor visualizada com a técnica de microcultivo, que preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas, além de manter íntegras certas estruturas formadoras de esporos. Para o isolamento de fungos a partir de qualquer tipo de amostra clínica, devem ser utilizados meios não seletivos que permitam o crescimento de fungos patogênicos e bolores de crescimento rápido. O Agar Sabouraud Dextrose (ASD) é o principal meio não seletivo utilizado no laboratório de micologia. Em geral, utiliza-se um antibiótico para impedir o crescimento de bactérias que poderiam prejudicar o isolamento dos fungos. O cloranfenicol é o antibiótico mais indicado, pois resiste à autoclavagem, podendo ser colocado tanto no ASD como em outros meios de culturas para fungos. Os meios ditos seletivos para fungos patogênicos, além do cloranfenicol contém cicloheximida, que inibe parcialmente, ou totalmente, fungos anemófilos. Os principais meios comerciais de ASD com cloranfenicol e cicloheximida são o Agar Mycosel e o Micobiotic Agar (ANVISA, 2004).

A (Figura 19) mostra o aspecto macromorfológico de uma colônia de *F. solani* em Agar Sabouraud, apresentando micélio filamentososo, denso e cotonoso, apresentando colônias com tonalidade cinza esverdeada. O reverso da colônia apresenta pigmentação bastante variável, sendo mais clara que o verso (LIMA et. al, 2008).



Fig. 19: Aspecto macromorfológico do cultivo de *F. solani* em Agar sabouraud. Fonte: LIMA et. al, 2008.

A (Figura 20) apresenta a macromorfologia da colônia de *A. versicolor*. A superfície da colônia do fungo é algodonosa, branca a ligeiramente acastanhada e o reverso da colônia apresenta coloração que vai do amarelo ao castanho (ZHANG et. al, 2012).



Fig. 20: Morfologia colonial macroscópica do *A. versicolor*. Fonte: ZHANG et. al, 2012.

As colônias do fungo do gênero *Acremonium* (Figura 21) apresenta-se com aspecto rugoso, e com coloração levemente marron. Fonte: ALBRECHT et. al, 2007.



Fig. 21: Aspecto macromorfológico da colônia de *A. kiliense* em Agar batata. Fonte: ALBRECHT et. al, 2007.

8 PRINCIPAIS AGENTES ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DAS ONICOMICOSSES

Os fármacos antifúngicos atualmente disponíveis são classificados em várias categorias: antifúngicos sistêmicos (orais ou parenterais) utilizados principalmente em casos de infecções sistêmicas, antifúngicos orais para tratamento de infecções mucocutâneas e antifúngicos tópicos para infecções mucocutânea (KATZUNG, 2003)

Existem várias modalidades de tratamento para a onicomicose, como por exemplo, o tratamento tópico, em que pode ser utilizado só um tipo de antifúngico ou fazer um tratamento combinado, o tratamento oral, utilizando a terbinafrina e o itraconazol, o tratamento mecânico, através do desbridamento da unha com o objetivo de reduzir a espessura da lâmina ungueal, aumentando a penetração dos medicamentos utilizados no tratamento tópico e sistêmico (MENDONZA et. al, 2012). Existem descritos na literatura outras formas promissoras que podem auxiliar no tratamento da onicomicose, como a utilização de ondas de alta frequência, pois além de não possuir efeitos colaterais, podem trazer ao paciente uma maior comodidade e um custo mais acessível em relação aos outros tipos de tratamento (SILVA et. al, 2011).

8.1. Antifúngicos sistêmicos utilizados no tratamento de onicomicoses

Os Azóis, como por exemplo, o cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol, são compostos sintéticos que podem ser classificados em imidazóis ou triazóis, com base no número de átomos de nitrogênio no anel azol de cinco membros. Os imidazóis incluem o cetoconazol, o miconazol e o clotrimazol. Já os triazóis incluem o itraconazol e o fluconazol, ambos de uso comum para tratamento sistêmico da doença fúngica. A (Figura 22) apresenta as fórmulas estruturais de alguns agentes azólicos. A atividade antifúngica dos azóis resulta na diminuição da síntese de ergosterol, constituinte exclusivo da membrana celular fúngica, através da inibição das enzimas fúngicas do citocromo P450. A especificidade desses fármacos decorre de sua maior afinidade pelas enzimas do citocromo P450 dos fungos que pelas enzimas dos seres humanos. Os imidazóis refletem menor grau de especificidade que os triazóis, explicando sua maior incidência de interações farmacológicas e efeitos colaterais. O espectro de ação desses fármacos é amplo, incluindo muitas espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, as micoses endêmicas como blastomicose, coccidioidomicose e histoplasmose, os dermatófitos e, no caso do itraconazol, até mesmo em infecções causadas por *Aspergillus* sp. Os azóis também são úteis no tratamento de infecções causadas por microorganismos resistentes à anfotericina B, como *Pseudallescheria boydii*. Seus efeitos adversos mais comuns incluem distúrbios gastrintestinal relativamente insignificante (FILIPPIN;SOUZA, 2006; KATZUNG, 2003).

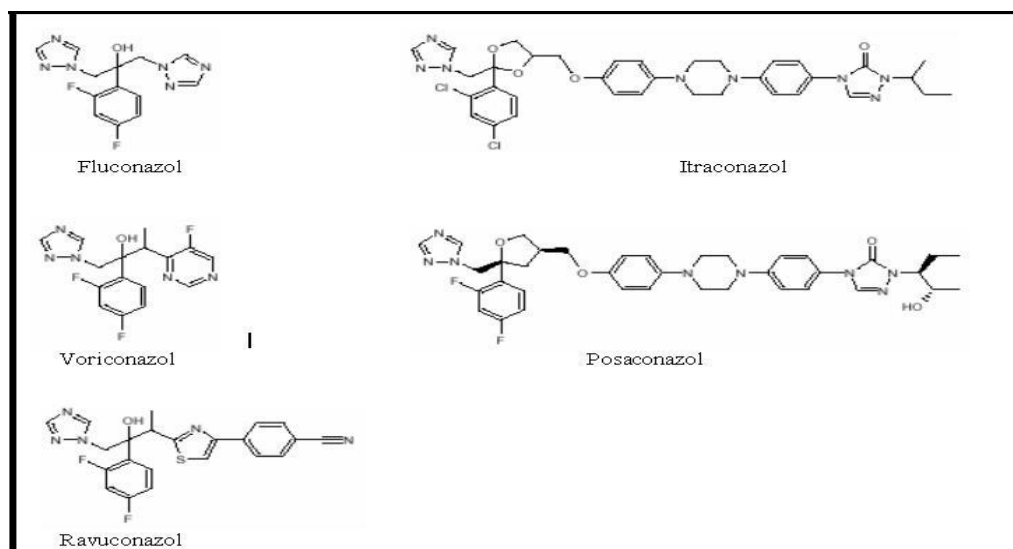


Fig. 22: Fórmulas estruturais de alguns azóis antifúngicos. Fonte: adaptado de http://www.visaoacademica.ufpr.br/v5n2/ana_m.htm.

A griseofulvina é um agente fungistático muito insolúvel isolado de uma espécie de *Penicillium*, tendo como única aplicação no tratamento sistêmico de dermatofitose. Seu mecanismo de ação ainda não é bem definido, porém o fármaco deposita-se na pele recém-formada, onde se liga à queratina, protegendo a pele de uma nova infecção. Seus efeitos adversos consistem numa síndrome alérgica semelhante à doença do soro, em hepatite e em interações farmacológicas com o fenobarbital e a varfarina. Já a terbinafina é uma alilamina sintética utilizada no tratamento das dermatofitoses, especialmente a onicomicose. A exemplo da griseofulvina trata-se de um fármaco ceratofílico, porém, ao contrário da griseofulvina, é fungicida. Assim como os azóis, a terbinafina interfere na biossíntese do ergosterol, entretanto, em vez de interagir com o sistema P450, o fármaco inibe a enzima fúngica esqualeno epoxidase, resultando em acúmulo do ergosterol esqualeno, que é tóxico para o micro-organismo. Possui raros efeitos adversos que consistem primariamente em distúrbio gastrointestinal e cefaléia (KATZUNG, 2003).

O cetoconazol e a griseofulvina são a primeira geração de agentes antifúngicos orais aprovados no tratamento de onicomicoses e outras dermatomicoses humanas e, juntamente com itraconazol, fluconazol e terbinafina são recomendados para o tratamento sistêmico e parecem ser bem tolerados. A griseofulvina é um agente fungistático muito insolúvel, sendo administrada na forma microcristalina, na dose de 1g/d. Sua absorção é melhor quando administrada com alimentos gordurosos. Para o tratamento de onicomicose, a griseofulvina pode exigir tratamento durante meses para assim permitir o crescimento da nova unha protegida. A terbinafina para o tratamento de onicomicose é disponível na formulação oral e administrada na dose de 250 mg/d, podendo ser utilizada em tratamento pediátrico e adulto, requerendo 6 semanas de terapia contínua para as unhas das mãos e 3 meses para as unhas dos pés. Várias são as dosagens de fluconazol, de 3 a 6 mg/Kg/d são utilizadas nas populações pediátricas. Esse tipo de tratamento tem sido experimentado também de modo semanal, em doses únicas, por um período de 12 a 16 semanas para as unhas dos dedos das mãos e cerca de 18 a 26 semanas para as unhas dos pés. A terapia de pulso com itraconazol foi também utilizada, com as seguintes dosagens: 5mg/kg: 10-15kg de peso e 100mg a cada dois dias, 6-20kg de peso: 100mg/dia, 21- 40 kg de peso: 100mg, duas vezes/dia, e superior a 40kg:

200mg, duas vezes/dia, variando de 3 a 5 meses a duração do tratamento (ARENAS; ESMENJAUD, 2004; KATZUNG, 2003).

A terbinafina possui maior atividade antifúngica *in vitro* no tratamento de onicomicoses por fungos não dermatófilos quando comparada ao fluconazol, itraconazol e a griseofulvina. Pode ser utilizada tanto no tratamento pediátrico como para o tratamento de adultos, requerendo 6 semanas de terapia contínua para as unhas dos dedos das mãos e 3 meses para as unhas dos dedos dos pés. A administração diária de um comprimido durante o período de 12 semanas produz uma taxa de cura de até 90% na onicomicose, sendo mais eficaz do que a griseofulvina ou itraconazol (ARENAS; ESMENJAUD, 2004; FARWA et. al, 2011; KATZUNG, 2003). As principais causas de falhas na terapêutica antifúngica sistêmica são: doses inadequadas, absorção, distribuição e metabolismo deficiente, interações medicamentosas, neutropenia grave e principalmente emergência do fenômeno de resistência aos antifúngicos (BOFF et. al, 2008).

Para tratamento das onicomicoses por *Fusarium* tem se utilizado a terbinafina e o itraconazol, obtendo-se resultados satisfatórios, assim como o ciclopirox, com a eliminação parcial de toda a unha afetada mediante aplicação de uréia a 40%, uma vez que o ciclopirox apresenta um amplo espectro antifúngico, sendo eficaz contra os principais fungos patogênicos responsáveis pelas onicomicoses. Entretanto, as micoses ungueais causadas por *Fusarium* não respondem ao fluconazol (CAMPOS; MARTÍNEZ, 2012; SCHALKA et. al, 2012).

8.2. Antifúngicos tópicos utilizados no tratamento de onicomicoses

A nistatina é um macrolídeo poliênico bem semelhante à anfotericina B, possuindo o mesmo mecanismo de ação, que é através da formação de poros na membrana celular. Por ser demasiado tóxica por via parenteral, a droga é utilizada apenas topicamente. Dentre as alaninas tópicos inclui-se a terbinafina e a naftifina, disponíveis na forma de creme tópico (KATZUNG, 2003).

O ciclopirox e seu sal, a ciclopiroxipiridona atua na quelatação de cátions polivalentes, com inibição de enzimas responsáveis pela degradação de peróxidos tóxicos na

célula fúngica. Apresenta amplo espectro antifúngico também para fungos filamentosos não dermatófitos e leveduras. O ciproflo é utilizado como tratamento tópico de onicomicoses na forma de esmalte e, além de ser uma forma prática e simples de tratamento (SCHALKA et.al, 2012).

9 CONCLUSÃO

O trabalho demonstrou que é crescente o número de fungos não dermatófitos causadores de onicomicoses e que, pelo fato de os fungos não dermatófitos apresentarem muitas vezes características morfológicas semelhantes aos fungos dermatófitos e de nem todos os fungos não dermatófitos estarem associados a características clínicas definidas, o diagnóstico do agente pode ser duvidoso.

Como os fungos dermatófitos apresentam caráter cosmopolita e, nos últimos anos tem aumentado os casos de onicomicoses por fungos não dermatófitos e leveduras, o diagnóstico preciso desses agentes deve ser realizado de maneira correta pois é quem define a melhor conduta terapêutica que deverá ser estabelecida.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT, M. C. et al. Onicomicosis por *Acremonium kiliense*. *Revista Argentina de Dermatologia*, v. 88, p. 40-44, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Manual da Anvisa. Módulo VII, 2004.

ARAGÃO, P. A. et al. Fungemia por *Fusarium* spp. – Relato de caso. *Pediatria (São Paulo)*, v. 21, n. 04, p. 353-356, 1999.

ARAÚJO, A. J. G. et al. Ocorrência de onicomicoses em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Anais Brasileiros de dermatologia*, v. 78, n. 3, p. 299-308, mai./jun. 2003.

ARAÚJO, A. J. G. et al. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. *Anais Brasileiros de dermatologia*, v. 78, n. 4, p. 445-455, 2004.

ARENAS, R.; ESMENJAUD, J. R. Onicomicose na infância: uma perspectiva atual com ênfase na revisão do tratamento. *Anais Brasileiros de dermatologia*, v. 79, n. 2, p. 232-308, mar./abr. 2004.

BEIGHTON, D. et al. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. *Journal of clinical Microbiology*, v. 33, n. 11, p. 3025-3027, nov. 1995.

BOFF, E. et al. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 01, p. 36-40, jan./fev. 2008.

BRAZ, S. C. M. et al. Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na coleção de culturas University Recife Mycology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n.1, p. 63-66, jan./fev. 2009.

CAMBUIM, I. I. N. et al. Avaliação clínica e micológica de onicomicose em pacientes com HIV/AIDS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n.1, p. 40-42, jan./fev. 2011.

CAMPOS, I. S.; MARTÍNEZ, N. T. G. Agentes etiológicos de onicomicosis diagnosticadas em El laboratório de micologia médica de La Universidad de Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, v. 54, n.2, p. 114-118, abr/jun. 2012.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n.5, p. 599-607, set./out. 2003.

CONCEIÇÃO, G. C. et al. Avaliação do tubo germinativo em secreção vaginal a fresco para triagem de *Candida albicans*: Um teste rápido. *NewsLab*. 73^a ed. São Paulo, 2005.

FARWA, U. et al. Non-Dermatophyte moulds as pathogens of onychomycosis. *Journal of the college of Physicians and Surgeons Pakistan*, v. 21, n. 10, p. 597-600, aug. 2011.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 167-194, abr./jun. 2006.

GHANNOUM, M.A; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, n. 12, p. 501-517, 1999.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab*, v. 46, n. 3, p. 225-234, jun. 2010.

GIUSIANO, G. E. et al. Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras com El medio CHROMagar *Candida*. *Revista Argentina de Microbiologia*, v. 30, p. 100-103, 1998.

GUPTA, A. K. et al. Utility of inoculums counting (walshe and English criteria) in clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. *Journal of clinical Microbiology*, v. 39, n. 6, p. 2115-2121, jun. 2001.

HWANG, S. M. et al. Onychomycosis due to nondermatophytic molds. *Annals of dermatology*, v. 24, n.2, p. 175-180, 2012.

JOISH, V.; N.; ARMSTRONG, E. P. Newer drugs and overall costs of treating onychomycosis. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 19, p. 130-132, 2002.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica & Clínica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara koogan S.A. 2003. 1054 p.

KHAN, Z. et al. *Acremonium kiliense*: Reappraisal of Its clinical significance. *Journal of clinical Microbiology*, v. 49, n. 6, p. 2342-2347, jun. 2011.

KONEMAN, E. W. et al. *Diagnóstico microbiológico*. 5ª ed. São Paulo: Editora Médica e Científica Ltda. 2001. 1465.

LIMA, K. M. et al. *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de onicomicose em paciente HIV- Positivo: Co-resistência in vitro aos azólicos. *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, n. 01, p. 57-64, jan./abr. 2008.

LIMA, K. M. et al. *Diagnósticos clínicos e laboratoriais das onicomicoses*. NewsLab. 83ª ed. São Paulo, 2007.

LIMA, K. M. et al. *Espécies fúngicas responsáveis por onicomicoses em Recife, Pernambuco*. *RBCA, Recife, PE*, v. 40, n. 2, p. 107-110, 2008.

LIMA, K. M. et al. *Hongos filamentosos no dermatofitos: onicomicosis em cuatro pacientes infectados con El vírus de La inmunodeficiencia humana*. *Revista Iberoamericana de micologia*, v. 25, p. 69-73, 2008.

MACÊDO, D. P. C. et al. *Infecções oportunistas e perfil enzimático dos agentes etiológicos*. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*, v. 42, n. 2, p. 188-191, mar./abr. 2009.

MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2010. 1128 p.

MARTIN; M. V. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Medical Mycology*, v. 12, p. 187-193, oct. 1979.

MARTINS, E. A. et al. Onicomucose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 5, p. 596-598, set./out. 2007.

MENDOZA, N. et al. Onicomycosis: afección común de difícil tratamiento. *Revista da Associação Colombiana de Dermatologia*, v. 20, n. 02, p. 149-158, abr./jun. 2012.

MURRAY, P. R. et al. *Microbiologia Médica*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2004. 762 p.

MESA, L. M. et al. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Revista Iberoamericana de micología*, v. 21, p. 135-138, 2004.

NOVICKI, T. J. et al. Genetic diversity among clinical isolates of *Acremonium strictum* determined during an investigation of a fatal mycosis. *Journal of clinical Microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2623-2628, jun. 2003.

PERDOMO, H. et al. Spectrum of clinically relevant *Acremonium* species in the United States. *Journal of clinical Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 243-256, jan. 2011.

PERES, N. T. A. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. *Anais Brasileiros de dermatologia*, v. 85 n. 5, p. 657-667, 2010.

PÉREZ, J. E. et al. Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de La onicomycosis em um laboratório de referencia, Manizales (Caldas), 2009. *Asociación Colombiana de Infectología*, v. 15, n.3, p. 168-176, 2011.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 1, p. 133-163, jan. 2007.

PFALLER, M. A. et al. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimen for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of clinical Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 58-61, jan. 1996.

RELLOSO, S. et al. Onicomycosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 19, p. 03-07, 2012.

RIBEIRO, E. L. et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. NewsLab. 64^a ed. São Paulo, 2004.

RÖRIG, K. C. O. et al. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 2, p. 225-227, mar./abr. 2009.

ROSA, N. C. et al. Onicomicoses: Novos agentes etiológicos. NewsLab. 115^a ed. São Paulo, 2013.

SCHALKA, S. et al. Avaliação clínica comparativa da eficácia e da segurança de formulação contendo ciclopirox a 8% na forma de esmalte terapêutico em duas diferentes posologias no tratamento de onicomicoses dos pododáctilos. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 87, n. 1, p. 19-25, jan./fev. 2012.

SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R. Fatal, disseminated *Acremonium strictum* infection in a neutropenic host. Journal of clinical Microbiology, v. 34, n. 5, p. 1333-1336, may, 1996.

SELLESLAG, D. A case of fusariosis in an immunocompromised patient successfully treated with liposomal amphotericin B. Acta Biomed, v. 77, n. 2, p. 32-35, 2006.

SHEMER, A. et al. Onychomycosis: Rationalization of topical treatment. Dermatology, v. 10, p. 415-416, jun. 2008.

SHORT, D. P. G. et al. Widespread occurrence of diverse human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. Journal of clinical Microbiology, v. 49, n. 12, p. 4264-4272, dec. 2011.

SILVA, J. O. et al. Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de *Candida* sp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 40, n.3, p. 354-355, mai./jun. 2007.

SILVA, J. O. et al. Enteroparasitoses e onicomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 08, n. 04, p. 385-392, 2005.

SILVA, J. L. M. et al. Uso de ondas de alta frequência no tratamento de onicomicose – comunicação preliminar de três casos. Anais Brasileiros de dermatologia, v. 86, n. 3, p. 598-600, 2011.

SIQUEIRA, E. R. et al. Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*, v. 39, n. 3, p. 269-271, mai./jun. 2006.

SMYTHE, A. B. et al. Candida como agente causal de onicomicosis em pies. *Dermatología Venezolana*, v. 42, n.1, p. 25-29, 2004.

SOUZA, E. A. F. et al. Frequência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 82, n. 2, p. 151-156, 2007.

SOUZA, P. R. M. et al. Concordância entre o exame micológico direto e a cultura para fungos no diagnóstico das onicomicoses dos pés. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 87, n. 1, p. 157-159, 2012.

SUMMERBELL, R. C.; SCHROERS, H. J. Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falciforme* to the *Fusarium solani* species complex and a review os similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi. *Journal of clinical Microbiology*, v. 40, n. 8, p. 2866-2875, aug. 2002.

SUMMERBELL, R. C. et al. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Medical Mycology*, v. 43, p. 39-59, feb. 2005.

TROFA, D. et al. Candida parapsilosis, na emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology Reviews*, v. 21, n.4, p. 606-625, oct. 2008.

ZANARDI, D. et al. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicoses. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 83, n. 2, p. 119-124, 2008.

ZHANG, S. et al. *Aspergillus versicolor*, a new causative agent of canine disseminated Aspergillosis. *Journal of clinical Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 187-191, jan. 2012.