

LARISSA LOPES MILANE BENTINE

Dermatófitos como agentes de onicomicoses em  
população adulta de serviço ambulatorial do Hospital de  
Aeronáutica de São Paulo, na cidade de São Paulo,  
Brasil

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Coordenadoria de  
Controle de Doenças da Secretaria de  
Estado da Saúde de São Paulo para  
obtenção de Título de Mestre em  
Ciências.

**Área de concentração:** Pesquisas Laboratoriais  
em Saúde Pública

**Orientador:** Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho  
Melhem

**SÃO PAULO**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Bentine, Larissa Lopes Milane.

Dermatófitos como agentes de onicomicoses em população adulta de serviço ambulatorial do Hospital de Aeronáutica de São Paulo, na cidade de São Paulo, Brasil / Larissa Lopes Milane Bentine. – 2017.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem.

1. Dermatomicoses 2. Onicomicose 3. Fungos 4. Antifúngicos.

SES/CCD/CD-341/2017

Ao único que é digno de receber toda Honra e toda Glória,  
Meu Senhor e Salvador Jesus Cristo!

Ao meu pai Darlan Gilio Milane meu herói, exemplo de vida, força e coragem  
por sempre ensinar a lutar.

A minha mãe Maria Inês Lopes Precce Milane meu alicerce  
exemplo de mulher forte e virtuosa.

Meu marido Renato José Lacerda Bentine meu maior incentivador,  
exemplo de caráter, por tantas vezes que  
deu forças para eu continuar lutando e  
por todo seu amor.

A minha irmã Lívia e as minhas sobrinhas Maria Eduarda e Maria Antônia,  
que sempre me apoiaram e oraram por mim.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me fortaleceu e sustentou meu sonho, e mostra todos os dias Seu amor por mim e por todos nós.

A Dra Márcia S. C. Melhem, por todos os ensinamentos, pelo exemplo de profissional e ser humano, por todas as orientações, a quem devo tanto.

A Dra Maria Walderez Szeszs, Chefe do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pelas orientações e ensinamentos, durante a realização deste trabalho.

A Dra Juliana Possato Takahashi por toda a orientação e colaboração.

A MSc. Marilena Martins por todos os ensinamentos e colaboração.

Ao Hospital de Força Aérea de São Paulo, por toda compreensão e incentivo.

Ao meu chefe Coronel Oliveira, por todo o apoio.

Aos MSc Dulcilena de Matos Castro e Silva, MSc Lidiane Oliveira, por toda colaboração.

Aos amigos Lindete, Andres, Miriam, Dayane, Lucas, Cirlene, Milena que me acompanharam desde o primeiro dia, com todo carinho.

## RESUMO

A onicomicose é uma infecção micótica das unhas, com interesse em Saúde Pública pela alta morbidade e ocorrência de surtos, em especial, em atletas e militares. Algumas condições mórbidas estão associadas a essa forma de micose o que pode acentuar seu caráter recidivante e crônico. A identificação correta dos agentes etiológicos das onicomicoses, sejam leveduras ou fungos filamentosos, pode ser subsídio para tratamento adequado da infecção, além de fornecer indicação sobre possíveis fontes de infecção. Este estudo teve como objetivo caracterizar e determinar a suscetibilidade a antifúngicos de fungos filamentosos agentes de onicomicoses em população militar da aeronáutica. Amostras ungueais de lesões de 50 pacientes, com suspeita de onicomicose em pés ou mãos, foram coletadas para exame micológico direto, cultura, isolamento, identificação fenotípica e molecular dos agentes etiológicos. O perfil de suscetibilidade dos agentes etiológicos, frente a 3 fármacos antifúngicos usados no tratamento das onicomicoses, foi determinado pelo método de referência americano (CLSI ). Fungos filamentosos foram implicados em 50 (62,5%) casos, prevalecendo dermatófitos (43; 86%), como *T. rubrum* (22; 44%), *T. mentagrophytes var. interdigitale* (19; 38%) e *M. gypseum* (3; 6%) e não dermatófitos (6; 12%), incluindo feo-hifomicetos como *Chaetomium globosum* (4; 8%) e hialo-hifomicetos como *Fusarium solani* e *Scytalidium spp.* (1; 2% cada um). Em relação à suscetibilidade a antifúngicos, foi verificado que menores concentrações de terbinafina foram suficientes para inibir o crescimento fúngico do total de isolados, se comparadas às de itraconazol e fluconazol (MIC 50%/MIC 90%, respectivamente, de 0,015/0,06 mg/L, 0,06/0,12 mg/L e 32/32 mg/L). Conclui-se que os agentes etiológicos de onicomicoses em militares da aeronáutica pertencem aos mesmos gêneros e espécies descritas para a população em geral. No entanto, a frequência de fungos filamentosos não dermatófitos foi alta, em especial,

para o agente melanizado *Chaetomium globosum*. Desde que, fungos não dermatófitos não são inibidos in vitro frente ao fluconazol, a administração empírica desse fármaco não deve ser recomendada e, portanto, a identificação do agente etiológico de onicomicoses em militares é mandatória para terapia com fluconazol. De outro modo, a alta suscetibilidade de todos os 50 agentes fúngicos à terbinafina e, em menor grau, ao itraconazol, sugere a indicação clínica desses fármacos no tratamento empírico da onicomicoses nessa população.

## ABSTRACT

Onychomycosis is a fungal infection of the nails, with interest in Public Health due to the high morbidity and occurrence of outbreaks, especially in athletes and soldiers. Some morbid conditions are associated with this form of mycosis, which may accentuate its recurrent and chronic character. The correct identification of the etiological agents of onychomycosis, whether yeasts or filamentous fungi, can be a subsidy for adequate treatment of the infection, as well as providing indication about possible sources of infection. This study aimed to characterize and determine the antifungal drug susceptibility of filamentous fungi agents of onychomycosis in the aeronautical military population. Ungual samples of lesions of 80 patients with suspicion of onychomycosis in feet or hands were collected for direct mycological examination, culture, isolation, phenotypic and molecular identification of the etiological agents. The susceptibility profile of the etiological agents to 3 antifungal drugs used in the treatment of onychomycosis, was determined using the American reference method (CLSI). Filamentous fungi were implicated in 50 (62.5%) cases, with dermatophytes prevailing (43; 86%), such as *T. rubrum* (22; 44%), *T. mentagrophytes var. interdigitale* (19; 38%), and *M. gypseum* (3; 6%) or non-dermatophytes (6; 12%), including feo-hyphomycetes such as *Chaetomium globosum* (4; 8%), and hialo-hyphomycetes like *Fusarium solani* and *Scytalidium spp.* (1; 2% each). Regarding susceptibility to antifungals, it was found that lower concentrations of terbinafine were sufficient to inhibit fungal growth in the total of isolates, compared to itraconazole and fluconazole (MIC 50%/90%, respectively: 0.015/0.06 mg/L, 0.06/0.12 mg/L and 32/32 mg/L). We concluded that the etiological agents of onychomycoses in aeronautical military belong to the same genera and species described for the general population. However, the frequency of non-dermatophyte filamentous fungi was high, especially for the melanin producing agent *Chaetomium globosum*. Since non-dermatophyte fungi are

not *in vitro* inhibited by fluconazole, the empirical administration of this drug should not be recommended, and therefore the identification of the etiologic agent of onychomycoses in the military is mandatory for fluconazole therapy. Otherwise, the high susceptibility of all 50 fungal agents to terbinafine and, to a lesser degree, to itraconazole suggests the clinical indication of these drugs in the empiric treatment of onychomycosis in this population.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAPPesq Pesquisa	Comissão de Ética para Análises de Projeto de
CLSI	<i>Clinical e Laboratory Standards Institute</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>et al. et alumni</i>	e colaboradores
FCZ	Fluconazol
FFND	Fungos filamentosos não dermatófitos
HASP	Hospital de Aeronáutica de São Paulo
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ITZ	Itraconazol
KOH	Hidróxido de Potássio
L	Litro
CIM	Concentração Inibitória Mínima
mg	Miligramas
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
n	Número
Na	Não avaliado
Ng	Nanogramas
NR	Não relatado
NuHFASP	Núcleo de Hospital de Força Aérea de São Paulo
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
SI	Sem Informação
TBF	Terbinafina
TSA	Teste de susceptibilidade antifúngica
UFC	Unidade formadora de colônia
%	Por cento

=

μL

Igual a  
Microlitro

## Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Estrutura química do Itraconazol .....	21
Figura 2. Estrutura química do Fluconazol.....	21
Figura 3. Estrutura química da Terbinafina .....	22
Figura 4. Cascata de biossíntese do ergosterol e etapas de inibição pelos antifúngicos.....	22
Figura 5.Sonda exploratória (esquerda) e posição de coleta de amostra de raspado de unhas de lesão ungueal sobre placa de Petri (direita) .....	32
Figura 6. Esquema de placa de microtitulação utilizada para determinação da concentração inibitória mínima por método de referencia norte-americano M38-A2 .....	41
Figura 7 Verso de colônias gigantes em ágar batata, mostrando aspectos de superfície penugenta, algodonosa e granulosa .....	33
Figura 8. Superfície de colônias gigante em ágar batata, mostrando aspectos de superfície penugenta, algodonosa e granulosa.....	33
Figura 9. Placas usadas para técnica de microcultivo em lâmina para identificação de fungos filamentosos .....	33
Figura 10 .Doenças relacionadas a onicomicoses em pacientes com suspeita clínica de onicomicoses. ....	47
Figura 11 Distribuição dos pacientes com suspeita clínica de onicomicoses atendidos no ambulatório do Hospital de Aeronáutica de São Paulo, quanto ao uso de medicamentos .....	47
Figura 12 Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 3 fármacos frente a 50 agentes de onicomicoses, de população militar atendida no Hospital de Aeronáutica de São Paulo, obtidos por método CLSI.....	47

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de dermatófitos de maior importância médica .....	26
Tabela 2. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais de 50 casos de onicomicose, em Hospital da Aeronáutica, São Paulo, 2015-2016.....	44
Tabela 3. Agentes e localização das onicomicoses em 50 pacientes militares da aeronáutica .....	46
Tabela 4. Resultado de exame micológico direto de amostras ungueais de pacientes com suspeita clínica de onicomicoses atendidos no ambulatório do Hospital de Aeronáutica de São Paulo.....	46
Tabela 5. Suscetibilidade a 3 fármacos, dos agentes de onicomicoses de população militar atendida no Hospital de Aeronáutica de São Paulo, segundo intervalos de valores obtidos por método CLSI .....	48
Tabela 6. Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 3 fármacos frente a 50 agentes de onicomicoses, de população militar atendida no Hospital de Aeronáutica de São Paulo, obtidos por método CLSI .....	49
Quadro 1 Interpretação do resultado da pontuação no método de MALDI-TOF no equipamento da Bruker Daltonics .....	35

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Onicomicoses .....	16
1.2 Fármacos antifúngicos.....	18
1.3 Fungos Filamentosos como Agentes de Onicomicoses .....	24
1.4 Identificação de Fungos Filamentosos .....	26
1.4.1 Identificação Morfológica .....	26
1.4.2 Identificação molecular .....	27
1.4.2.1 Identificação por análise de proteínas por Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight - MALDI-TOF .....	27
1.4.2.2 Identificação por análise da região ITS.....	28
2. OBJETIVOS .....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos .....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Amostras Biológicas .....	30
3.1.1 Processamento das Amostras Biológicas.....	30
3.2 identificação fenotípica dos agentes das onicomicoses .....	32
3.3 Identificação por MALDI- TOF .....	34
3.4 Identificação molecular por sequenciamento da região ITS1-ITS4 ....	35
3.4.1 Extração e purificação de DNA.....	35
3.4.2 Reação em cadeia da polimerase .....	36
3.4.3 Sequenciamento.....	37
3.5 Determinação da suscetibilidade dos agentes onicomicoses.....	38
3.5.1 Preparo dos inóculos .....	39
3.5.2 Preparo das soluções de antifúngicos .....	39
3.5.3 Determinação da suscetibilidade.....	40
3.6 Análise de Resultados .....	42
4. RESULTADOS.....	43
5. DISCUSSÃO .....	50
6. CONCLUSÕES .....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

Apêndice 1. Características dos pacientes com lesões ungueais e resultado de exame micológico direto.....	76
Apêndice 2. Resultados de Identificação Fenotípica e Identificação (id) por Sequenciamento da Região ITS1-ITS4 de 50 Agentes de Onicomicoses em População Militar da Aeronáutica.....	81
Anexo 1 . Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	84
Anexo 2. Autorização para Coleta de Dados .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

As onicomicoses são infecções micóticas que atingem as unhas e que, apesar de terem sido descrita há séculos, ainda, nos dias atuais são doenças de alta frequência em distintas regiões geográficas. A infecção pode resultar em prejuízo significativo para a saúde geral, aparência física e desempenho social (Lubeck *et al.*, 1993). Desde que, as unhas são partes integrantes da estrutura sensorial da mão, a perda da margem livre das unhas pode reduzir, drasticamente, a capacidade sensorial dos dedos, com conseqüente limitação da destreza manual (Weitzman e Summerbell, 1995). O estágio final das onicomicoses por dermatófitos, FFND ou por *Candida* spp. é a onicodistrofia total (OT), na qual há acometimento da matriz ungueal e a totalidade da unha fica alterada (Zanardi *et al.*, 2008).

Resistências a medicamentos e falhas da terapêutica, em geral, obrigam o paciente a repetir o tratamento ou prolongar o tempo de administração ou, mesmo, a mudar a terapia e, ainda assim, a resposta pode ser insatisfatória, com aumento considerável no custo do tratamento (Mendez-Tovar *et al.*, 2007). A dificuldade de obtenção de cura permanente, a alta morbidade dessa infecção e sua associação à ocorrência de surtos, dado seu caráter contagioso em particular em alguns grupos populacionais, como atletas e militares, fazem das onicomicoses um problema importante para a saúde pública (Faergman e Baran, 2003; Gianni *et al.*, 2000).

Os agentes das onicomicoses pertencem a 3 grandes grupos de fungos com características distintas. O primeiro deles produz hifas finas e hialinas e englobam os dermatófitos, o segundo é um grupo heterogêneo de agentes denominados fungos filamentosos não-dermatófitos (FFND) que abrange espécies de hialo-hifomicetos e feo-hifomicetos (produtores de melanina). O terceiro grupo de agentes das onicomicoses inclui leveduras, fungos com estrutura básica unicelular e divisão por gemulação (Oliveira *et al.*, 2006)

Dermatófitos são os agentes mais frequente de onicomicoses, bem como de outras micoses cutâneas e, por isso, os aspectos epidemiológicos

das dermatofitoses são mais bem descritos na literatura. Este grupo de fungos apresenta caráter cosmopolita, sendo encontrado em diferentes regiões do mundo, ocorrendo variações regionais em relação à frequência de determinadas espécies, uma vez que condições geoclimáticas e sociais interferem na distribuição das espécies dermatofíticas (Seebacher *et al.*, 2008). Estima-se que 30 a 70% dos adultos sejam portadores assintomáticos de dermatófitos em unhas, pele ou pelos, e que a incidência dessa doença aumente com a idade. Os principais fatores de risco para as dermatofitoses, associados à predisposição individual, são: pH da pele, composição e sudorese, alterações endócrinas como *diabetes mellitus* e uso prolongado de roupas impermeáveis ou calçados apertados (Organização Mundial de Saúde, 2005). Os dermatófitos têm forte afinidade por queratina, enquanto os FFND são fungos anemófilos (Baran *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006).

Os fatores que contribuem para a instalação de onicomicoses por FFND podem ser divididos em: gênero, perturbações circulatórias periféricas, resistência diminuída, traumatismo e fatores de manutenção: como profissão, clima e disfunção hormonal (Avner *et al.*, 2006). Segundo Siqueira *et al.* (2006) as fontes de infecção incluem o solo, animais, incluindo homem e fômites, como: alicates, tesouras e lixas de unha.

As onicomicoses por leveduras costumam ser associada a infecções cutâneas primárias ou candidíase mucocutânea crônica, sendo, muitas vezes, consideradas infecções secundárias a processos bacterianos. Acometem, principalmente, unhas das mãos de profissionais que manipulam água, como cozinheiros e lavadeiras (Baran *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006).

## 1.1 Onicomicoses

A unha recebe o nome científico de lâmina ungueal e é formada por queratinócitos compactados. A estrutura responsável pela produção da unha



chama-se matriz ungueal. É formada por queratina especial, chamada oquinina (dura), envolta por queratina mole. A oquinina é uma proteína rica em cistina (aminoácido que contém enxofre) e contém, ainda, cálcio, ferro e 7% a 16% de água. Na unha, pode ser identificadas 4 partes: raiz, lâmina, dobras laterais e borda livre (Zaias, 1996).

Sob o ponto de vista terapêutico, é importante, entre outras coisas, distinguir os vários tipos de onicomicoses. As onicomicoses foram classificadas em onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL), onicomicose branca superficial (OBS), onicomicose subungueal proximal (OSP) ou onicodistrofia total (OT), por Roberts *et al.* (1990). Segundo Zanardi *et al.* (2008) em um estudo realizado em Santa Catarina observado que de 2 a 5% das onicomicoses dermatofíticas são representadas pela onicomicose branca superficial, mais comumente observada nas unhas dos pés, caracterizada pela penetração *in situ* de estruturas fúngicas em direção ao interior da lâmina ungueal, podendo ser facilitada por traumas anteriores. A variedade clínica mais freqüente (90%) é a onicomicose subungueal distal e lateral, a invasão começa no hiponíquio e na borda distal e lateral da lâmina ungueal, estendendo-se de forma lenta e progressiva até o setor proximal da unha (Zanardi *et al.*, 2008).

Uma nova classificação foi proposta por Hay e Baran (2011), para facilitar o diagnóstico clínico. A primeira forma permanece como a mais comum de invasão da unha, ocorrendo no hiponíquio lateral ou distal (OSDL); os agentes mais comumente associados são dermatófitos (*Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*), *Candida albicans*, *Fusarium* spp., *Scytalidium* spp., mas FFND como *Scopulariopsis brevicaulis* podem levar a esta forma clínica. A segunda, onicomicose superficial, pode estar presente com variações de distrofias que dependem do agente causador. A invasão é superficial com aspecto mais profundo. O termo “onicomicose branca superficial” restringe-se a essa lesão, não incluindo aquelas de aspecto escuro descritas nas infecções por *T. rubrum* e *Scytalidium dimidiatum*. Além destes, *T. interdigitale*, *Acremonium* e *Fusarium* spp. também são comumente isolados dessa forma clínica. A terceira, onicomicose endoníquia

enquadra a invasão da placa ungueal, de divisão lamelar, descoloração e ausência de invasão do leito ungueal, havendo invasão mais interna. Distingue-se, histopatologicamente, pela ausência de inflamação e fungos no leito ungueal ou hiperqueratose subungueal, as muitas hifas fúngicas encontram-se no interior da placa ungueal. *T. soudanense* e *T. violaceum* são os fungos responsáveis por esse tipo de infecção. A quarta forma é a onicomicose subungueal proximal, classicamente, vista sob a porção proximal e capilar da unha. Apresenta manchas difusas ou estrias transversais. Estende-se de forma lenta e distal e é de difícil tratamento, sempre requerendo terapia oral. Pode ser causada, principalmente, por *T. rubrum*, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp. e *C. albicans*. O conceito de onicomicose distrófica total não mudou, representando o estágio final dos diversos modos de invasão; geralmente, são isolados desse tipo de lesão fungos dermatófitos, *C. albicans* e *Scytalidium* spp. Outra forma é a onicomicose secundária, quando a invasão fúngica ocorre após outra patologia da unha, sendo as alterações clínicas dominadas por características morfológicas da doença de base. A onicomicose padrão misto é dita quando há manifestação de diferentes formas em um mesmo paciente e na mesma unha (Seebacher *et al.*, 2008).

Os dermatófitos podem, ainda, provocar alterações ungueais distintas, caracterizadas por hiperqueratose subungueal, que se inicia pela borda livre das unhas, nas regiões lateral e/ou distal, descolamento ungueal na proximidade da cutícula, reação inflamatória comprometendo as dobras peri-ungueais (paroníquia), além de leuconíquia, que são manchas brancas na superfície da unha (Martins *et al.*, 2007).

## 1.2 Fármacos antifúngicos

O tratamento das onicomicoses pode ser feito de modo sistêmico ou local, sendo alguns fármacos quase que, exclusivamente, destinados ao tratamento de micoses cutâneas: alilaminas (terbinafina, butenafina),

morfolinas (amorolfina), griseofulvina e ciclopirox-olamina (Goodman e Gilman, 1999). A introdução do cetoconazol na prática clínica para micoses cutâneas e sistêmicas, no início da década de 1970 iniciou uma nova era na terapia antifúngica. A disponibilidade de um fármaco absorvido por via oral com baixa toxicidade permitiu a terapia ambulatorial de micoses profundas e profilaxia a longo prazo de pacientes imunocomprometidos. Mais tarde, fármacos azólicos mais modernos, substituíram, em grande parte, o cetoconazol, em virtude de sua maior eficácia, de seus efeitos hormonais mínimos e da possibilidade de administração intravenosa (Goodman e Gilman, 1999). Os azóis, fármacos usados amplamente na prática clínica para micoses cutâneas e invasivas, podem ser classificados em gerações (Lacaz *et al.*, 2002; Hamdan e Hahn, 2006; Ausma *et al.*, 2007) sendo:

- Primeira geração: flutrimazol, isoconazol, miconazol, oxiconazol, sulconazol e tioconazol, essencialmente, de uso tópico;
- Segunda geração: cetoconazol de uso oral e amplo espectro, usado por várias vias de administração;
- Terceira geração: fluconazol e itraconazol, ativos por via oral, tópica e parenteral.
- Quarta geração: voriconazol, ravuconazol, isavuconazol, posaconazol desenvolvidos para uso nas infecções fúngicas graves e invasivas.

Dentre os azóis, o fluconazol e o itraconazol são os mais frequentemente administrados e, no grupo das alilaminas, a terbinafina é fármaco de escolha para terapia das onicomicoses por dermatófitos (Favre *et al.*, 2003).

O itraconazol (Figura 1) é preferido ao cetoconazol para tratamento da histoplasmoze não meningeal e é útil na esporotricose cutânea e extracutânea, podendo ser usado em tratamento da candidíase orofaríngea, esofágica, sistêmica ou vaginal e onicomicoses. Seu uso é indicado para aspergilose e em dermatomicoses resistentes à griseofulvina e *pitiríase versicolor* extensa (Adams, 2007).

O fluconazol (Figura 2) atua na candidíase orofaríngea e esofagiana, além da candidíase vaginal; espécies como *C. krusei* e *C. glabrata* são resistentes a este fármaco, assim como espécies de *Aspergillus*. O fluconazol é usado no tratamento da meningite criptocócica, histoplasmose, blastomicose, esporotricose e dermatofitoses, em geral; porém nesses últimos casos a resposta parece ser inferior à aquela obtida com o itraconazol (Goodman e Gilman, 1999).

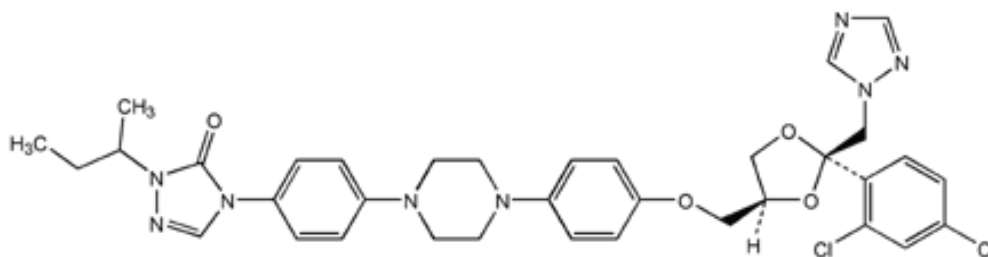
O mecanismo de ação dos azóis, basicamente, é a inibição da biossíntese de ergosterol, que é o lipídeo base para a estrutura da membrana fúngica, pela inativação da enzima esterol desmetilase, microsomal e dependente do citocromo P450. Os azóis, portanto, prejudicam a biossíntese do ergosterol fragilizando a membrana citoplasmática e conduzem a um acúmulo de 14-metilesteróis tóxicos para o fungo (Bossche *et al.*, 1995; Goodman e Gilman, 1999; Hamdan e Hahn, 2006). Esses metilesteróis podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acílicas dos fosfolípidios e prejudicar as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e enzimas do sistema do transporte de elétrons, inibindo, assim, o crescimento dos fungos; desse modo, os azóis são fungistáticos e fungicidas (Goodman e Gilman, 1999).

A terbinafina (Figura 3) é uma alilamina com amplo espectro de atividade contra fungos patogênicos da pele, cabelo e unhas. Esse fármaco é fungicida em concentrações baixas contra, principalmente, dermatófitos, além de fungos filamentosos, alguns demáceos (agentes das feohifomicoses) e alguns dimórficos (*Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii*). Sua atividade contra leveduras é fungistática ou fungicida, dependendo da espécie tratada (Lacaz *et al.*, 2002).

A terbinafina altera uma etapa inicial da biossíntese dos esteróis fúngicos; trata-se da inibição altamente específica da enzima esqualeno epoxidase. Essa inibição acarreta no acúmulo intracelular fúngico de esqualeno resultando na morte celular; devido a isso lhe é atribuída ação

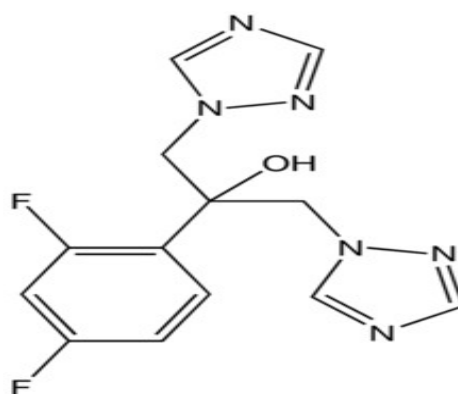
fungicida de amplo espectro. A enzima esqualeno epoxidase não está envolvida no sistema citocromo P450, como está a enzima alvo dos azóis (Goodman e Gilman, 1999; Lacaz *et al.*, 2002; BRASIL-ANVISA, 2005).

A Figura 4 ilustra as etapas- alvo de ação dos principais antifúngicos usados na terapia de onicomicoses.



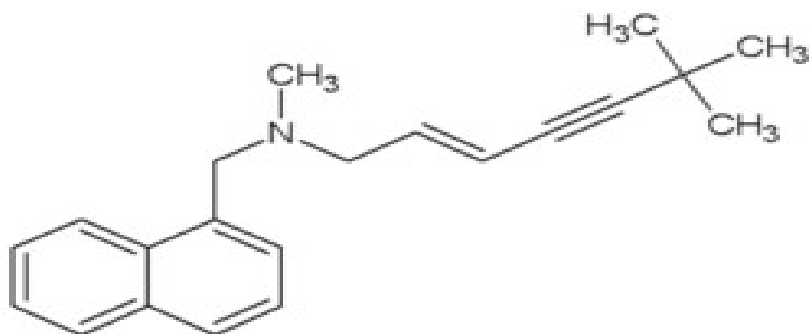
Fonte: (Goodman e Gilman, 1999)

Figura 1. Estrutura química do Itraconazol



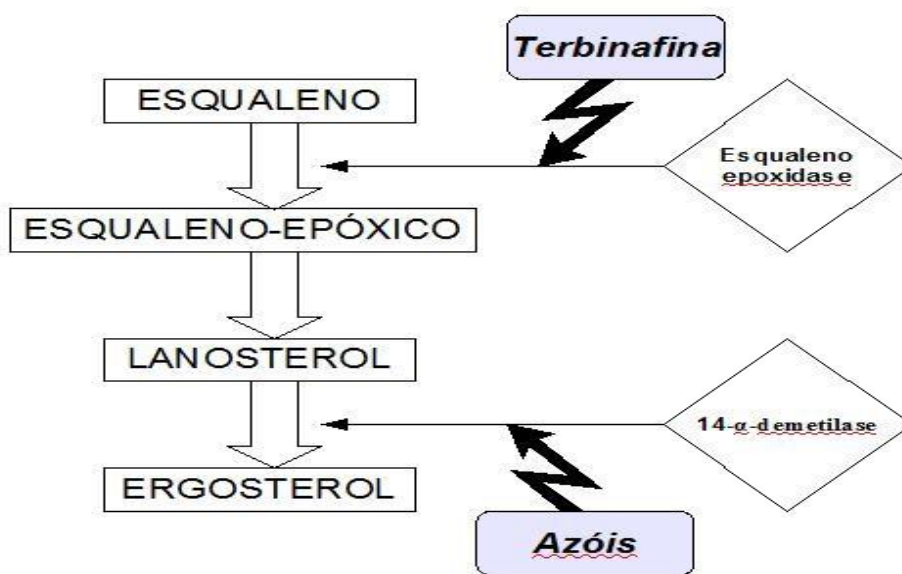
Fonte: Goodman e Gilman,1999

Figura 2. Estrutura química do Fluconazol



Fonte: Goodman e Gilman, 1999

Figura 3. Estrutura química da Terbinafina



Fonte: Goodman e Gilman, 1999

Figura 4. Cascata de biossíntese do ergosterol e etapas de inibição pelos antifúngicos

A análise da atividade antifúngica de todos os fármacos pode ser avaliada *in vitro* pela determinação da concentração inibitória mínima (*minimum inhibition concentration, MIC*) por método de referência norte americano (CLSI, 2008) ou europeu (AFST-EUCAST, 2012). Em 2004, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, ex-NCCLS) publicou o documento M38-A, referência para determinação da suscetibilidade a antifúngicos de alguns fungos filamentosos. Nesse documento foram

propostos parâmetros para testes com *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* (fase perfeita de *Scedosporium apiospermum*) e *Sporothrix schenckii* na fase filamentosa. Testes com os fungos dimórficos *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* variedade *capsulatum* e *Penicillium marneffeii* não foram, e nem são ainda hoje, recomendados. Em 2008, o mesmo grupo publicou um novo documento M38-A2, em atualização ao anterior, com alterações que incluem a recomendação dos testes com mais agentes de micoses, cutâneas e invasivas, como espécies de *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, e *Scedosporium prolificans*, fungos demáceos e zigomicetos (CLSI, 2008). Com a mesma finalidade, o comitê europeu *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), elaborou e publicou em 2008, um outro método (E.Def. 9.1) para testar a suscetibilidade de fungos filamentosos capazes de produzir conídios (exclui os zigomicetos), frente a antifúngicos, pela determinação da concentração inibitória mínima. Esse documento, além de trazer comentários sobre a importância dos testes de suscetibilidade para detecção e vigilância de fungos resistentes aos fármacos comumente utilizados e avaliação da atividade de novas drogas, ressalta também o papel de métodos de referência para confirmação de resultados conflitantes e indefinidos.

A determinação da suscetibilidade a fármacos, *in vitro*, dos agentes de onicomicoses é importante aspecto da epidemiologia que requer a identificação do agente. A distribuição dos agentes das onicomicoses e sua suscetibilidade a antifúngicos, porém, são dinâmicas ao longo do tempo e, portanto, o monitoramento, dos agentes etiológicos e análise de tendência na manutenção ou alteração de espécie, devem ser realizado continuamente, de forma sistemática e adequada. Além disso, a descrição dos agentes das onicomicoses em populações de maior risco serve de subsídio para o conhecimento da história natural da doença. Uma revisão bibliográfica atualizada serve de ferramenta de consulta importante para orientação de microbiologistas de laboratórios assistenciais e

dermatologistas, além de médicos do trabalho que atendem populações de risco para onicomicoses.

### 1.3 Fungos Filamentosos como Agentes de Onicomicoses

A distribuição geográfica dos agentes das onicomicoses é bastante variável; enquanto alguns são cosmopolitas, a distribuição de outros depende de fatores, como adaptação ao meio ambiente, deslocamento humano por migração, convívio com animais domésticos, aspectos socioeconômicos, sexo, idade e imunidade do hospedeiro. Esses aspectos promovem variações no espectro destes fungos, de região para região (Sidrim e Rocha, 2004).

Os dermatófitos incluem dezenas de espécies que pertencem a três gêneros, *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, com algumas de maior interesse médico (Tabela 1). A frequência de cada gênero e espécie é variada, sendo influenciada tanto por características geográficas, quanto por características individuais dos pacientes (Faergman e Baran, 2003). Dentre as espécies de *Trichophyton*, *T. rubrum* é o melhor exemplo de espécie antropofílica, sendo cosmopolita e a de maior importância em quadros de dermatofitoses humanas no mundo todo. No gênero *Microsporum* destaca-se *M. gypseum*, que é responsável por infecções de couro cabeludo, pele e onicomicoses, pouco frequente e o risco de adquirir a infecção é frequentemente associado à exposição a fatores de risco (Martinez et al., 2014). O gênero *Epidermophyton* possui apenas uma espécie de interesse médico (*E. floccosum*). Esta espécie é responsável pelas infecções de pele e, em menor grau, de unhas (Costa et al., 2002; Lacaz et al., 2002).

As onicomicoses causadas por fungos filamentosos não-dermatófitos têm se tornado cada vez mais frequente na prática médica (Hattori et al., 2005). Membros de distintos gêneros são considerados agentes etiológicos de onicomicoses, em particular, *Scytalidium* spp. e *Fusarium* spp. *S. dimidiatum* é considerado patógeno primário de unhas e *S.*



*hyalinum* como oportunista. *F. oxysporum*, apesar de ser considerado fungo anemófilo contaminante de ar atmosférico, pode causar infecções fúngicas em sítios distintos, como: olhos, sinus nasal, pele e unhas. Este fungo foi citado como responsável de 58,8% das infecções fúngicas oculares em exames realizados em São Paulo, no período de 1975 a maio de 2003 (Höfling-Lima *et al.*, 2005).

A ocorrência de infecções ungueais por esse grupo de fungos pode levar à dificuldade na decisão da etiologia do quadro, desde que estes fungos são contaminantes de meio ambiente e, conseqüente, na conduta terapêutica (Sidrim e Rocha, 2004).

<b>Epidermophyton</b>	<b>Microsporum</b>	<b>Trichophyton</b>
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
	<i>M. gypseum</i>	<i>T. rubrum</i>
	<i>M. audouinii</i>	<i>T. tonsurans</i>
		<i>T. violaceum</i>
		<i>T. schoenleinii</i>
		<i>T. verrucosum</i>
		<i>T. concentricum</i>

Tabela 1 Espécies de dermatófitos de maior importância médica

Fonte: Adaptado de SAENZ, 2001

## 1.4 Identificação de Fungos Filamentosos

### 1.4.1 Identificação Morfológica

A identificação tradicional dos fungos filamentosos tem como base a sua análise morfológica. Aspectos da colônia, como cor da superfície e verso, textura, formação da borda, melanização, velocidade de crescimento são considerados na identificação fenotípica. A proporção entre conídios pequenos e grandes (microconídios e macroconídios, respectivamente), forma e tamanho dos conídios, número de células do macroconídio, aspecto da parede dos conídios (lisa ou rugosa), bem como, formação de septos nas hifas, produção de melanina, presença de hifas pectinadas ou espiraladas, entre outros aspectos, podem definir o gênero do fungo filamentoso. Provas bioquímicas podem ser realizadas para distinção de algumas espécies, em particular de dermatófitos. Porém, a descrição de novas espécies, assim como, a semelhança entre espécies e, até mesmo de alguns gêneros, requerem, na atualidade, a complementação da identificação por análise molecular para a classificação definitiva de um isolado de fungo filamentoso (De Hoog et al., 2000).

#### 1.4.2 Identificação molecular

A evolução dos métodos de identificação em microbiologia visam maior rapidez e maior acurácia na determinação de gênero, mas, a identificação microbiológica de fungos patogênicos na rotina laboratorial, ainda tem sido realizada, classicamente, por métodos que envolvem cultura seguido de testes fenotípicos, explorando diferenças metabólicas que existem entre as várias espécies. Novos métodos diagnósticos, que utilizam diferenças no espectro de proteínas ou nos ácidos nucleicos estão, cada vez mais, em uso clínico, mas apesar de serem mais rápidos e precisos do que os métodos fenotípicos, ainda demandam padronização e aprimoramento técnico, além de orçamento diferenciado (Oliveira *et al.*, 2006).

##### 1.4.2.1 Identificação por análise de proteínas por Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight - MALDI-TOF

A sigla MALDI-TOF significa um método espectrofotométrico para análise de proteínas. Tem como base um procedimento no qual um isolado (uma porção da colônia ou um extrato proteico da mesma) é colocado em uma placa em que se adiciona uma matriz polimérica. Essa amostra é irradiada com um raio laser e é vaporizada em várias moléculas, ionizadas e aspiradas em um tubo de vácuo, sendo levadas a um detector; conforme as massas e tempos de chegada (*time of flight*) das moléculas ao detector o equipamento a classifica. Isso é inserido em gráfico, dando vários picos e, para cada espécie fúngica, obtém-se um gráfico específico. Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado, tudo com muita rapidez (Benagli *et al.*, 2011)

#### 1.4.2.2 Identificação por análise da região ITS

Segundo Oliveira *et al.* (2006), várias metodologias moleculares para identificação de isolados fúngicos têm sido descritas e a sequência nucleotídica das regiões ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal (rDNA) é a mais utilizada e com maior quantidade de dados gerados e depositados em bancos públicos. Na técnica de semi-nested PCR, descrita por Ahmad *et al.*(2002), os oligonucleotídeos iniciadores universais (*primers*) são capazes de permitir amplificação do final da extremidade 3' do rDNA 5.8S e a extremidade 5' inicial do rDNA 28S e a ITS2. No segundo ciclo de amplificação, iniciadores espécie-específicos complementares à região ITS2 revelam a identidade das espécies.

Frente ao conhecimento e as considerações tecidas sobre as onicomicoses nota-se a importância da determinação de gênero e espécie dos agentes das onicomicoses, para busca da fonte de infecção, em particular, na investigação de surtos e, também, para escolha do melhor tratamento ou terapia empírica. A disponibilidade de informações na literatura nacional e em banco de dados, específico de cada serviço assistencial ou regional, sobre a distribuição de espécies e sua suscetibilidade a antifúngicos é fundamental para melhor controle dessas infecções contagiosas, de alta morbidade e que acarretam sérios problemas sociais e, por vezes, econômicos para os pacientes, além de significar custo alto e duradouro para os serviços de saúde pública.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Descrever os agentes de onicomicoses, pertencentes aos grupos dos dermatófitos e dos fungos filamentosos não-dermatófitos, em pacientes atendidos no Hospital das Forças Armadas, com vistas à constituição de um banco de dados local e nacional, para avaliação de tendência temporal na distribuição das espécies, bem como, para subsídio de tratamento empírico.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência das onicomicoses causadas por fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos, em um grupo de pacientes adultos de serviço médico ambulatorial do Hospital da Aeronáutica;
- Descrever as características demográficas, doenças relacionadas à onicomicose, tempo de lesão ungueal e uso de medicação nos casos amostrados;
- Determinar as espécies de fungos filamentosos causadores de onicomicoses nessa população, e
- Avaliar o perfil de suscetibilidade, dos agentes de onicomicoses, a antifúngicos usados na clínica médica: fluconazol, terbinafina e itraconazol.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas do Núcleo de Hospital de Força Aérea de São Paulo e no Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

#### 3.1 Amostras Biológicas

Foram analisadas 80 amostras clínicas de unhas de pés e mãos de pacientes adultos, militares, atendidos entre julho de 2014 e julho de 2015 no serviço ambulatorial da Clínica de Dermatologia do Núcleo de Hospital de Força Aérea de São Paulo (NHFASP), localizado na cidade de São Paulo, SP, Brasil.

Das 80 amostras analisadas, foram excluídos 30 amostras que não estavam positivas ao exame direto e a cultura.

Todos os pacientes receberam explicação acerca da presente investigação e foram incluídos, apenas, aqueles que consentiram sua participação no estudo e preencheram um protocolo de permissão e avaliação (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, TCLE), conforme Anexo 1.

##### 3.1.1 Processamento das Amostras Biológicas

As amostras ungueais foram obtidas através de raspagem do local lesionado, após assepsia com álcool 70%. Para pacientes com comprometimento subungueal foram realizadas raspagens do leito ungueal com sonda exploratória autoclavada, sendo o material obtido entre o limite da unha normal e aquele da unha afetada.

Na presença de manchas na superfície da unha foi realizado raspado da lesão e na forma clínica proximal. Foi utilizada uma sonda exploratória para coleta em profundidade menos de 1mm. Nos casos em que a região lesionada apresentava difícil acesso, o material foi coletado por via transungueal com auxílio de sonda exploratória. A Figura 5 ilustra a coleta de amostra ungueal.

Parte de todos os materiais coletados foram realizados exames diretos, com adição de uma gota de KOH a 30% sobre lâmina de microscopia. A outra parte dos materiais foram semeado em estrias sobre meio de cultura seletivo para fungos patogênicos (Mycosel®), contendo cicloheximida que impede o crescimento de fungos anemófilos e cloranfenicol como agente bactericida. As placas de Petri, semeadas foram mantidas a 30°C e observadas, diariamente, por período de até 15 dias, para avaliação do crescimento de colônias filamentosas, entre a segunda e terceira semanas, com características de dermatófitos.

As colônias foram, então, examinadas ao microscópio para observação de presença de hifas finas, septadas, hialinas e ocorrência de conídios pequenos, redondos, piriformes ou ovalados e ocorrência de macroconídios multicelulares. As colônias com estas estruturas foram consideradas características de dermatófitos e, então, foram transferidas para tubos contendo ágar batata para identificação (KANE *et al*,1997). As culturas com características de *Scytalidium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e outros fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) foram transferidas, do mesmo modo, para tubos de ensaio contendo ágar batata para identificação presuntiva com base em sua morfologia e, posteriormente, definitiva, frente ao sequenciamento da região ITS (De Hoog *et al.*, 2000).



Figura 5. Sonda exploratória (esquerda) e posição de coleta de raspado de unhas de lesão ungueal sobre placa de Petri (direita). Fonte: Do autor

### 3.2 Identificação fenotípica dos agentes das onicomicoses

A identificação presuntiva do gênero e espécie de cada isolado de dermatófito teve como base as características da cultura pela técnica da colônia gigante (Figura 7) quanto aos aspectos de: velocidade de crescimento, cor do verso e anverso da cultura, aspecto da borda e superfície da cultura, presença de pigmento difusível no meio de cultura (Figura 8). A técnica de microcultivo (Figura 9), para complementar a identificação presuntiva, foi realizada em meio de ágar batata para estímulo da esporulação e preservação das estruturas morfológicas que foram observadas sob microscopia ótica comum (400x). (De Hoog *et al.*, 2000).

A forma e disposição dos microconídios, forma, tamanho, celularidade e superfície dos macroconídios, proporção entre esses dois tipos de conídios, presença de hifas em raquete, pectinada, em espiral, e/ou em candelabro (Kane *et al.*, 1997).

Todos os isolados foram mantidos sob água destilada estéril em tubos lacrados com tampa de borracha e metal, como descrito por Diogo *et al* 2005.



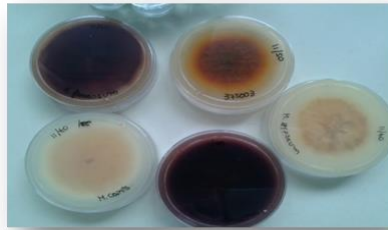


Figura 6 Verso de colônias gigantes em ágar batata, mostrando aspectos de superfície penugenta, algodonosa e granulosa. Fonte: Do autor

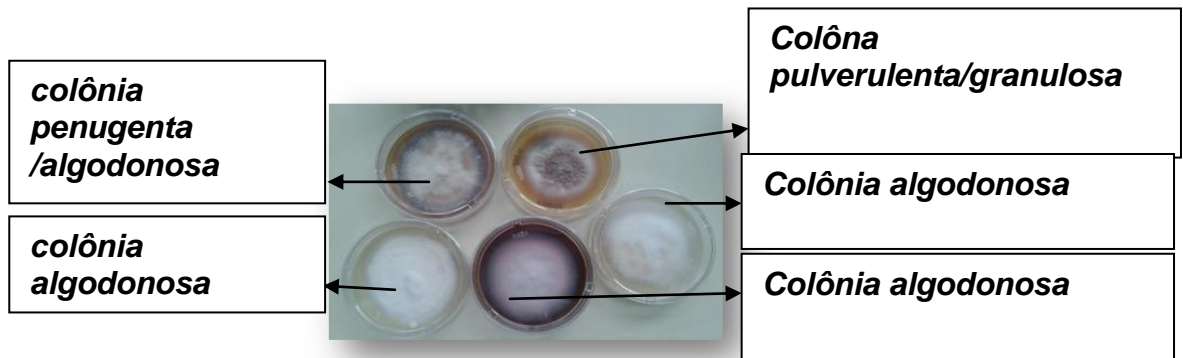


Figura 7. Superfície de colônias gigante em ágar batata, mostrando aspectos de superfície penugenta, algodonosa e granulosa. Fonte: Do autor

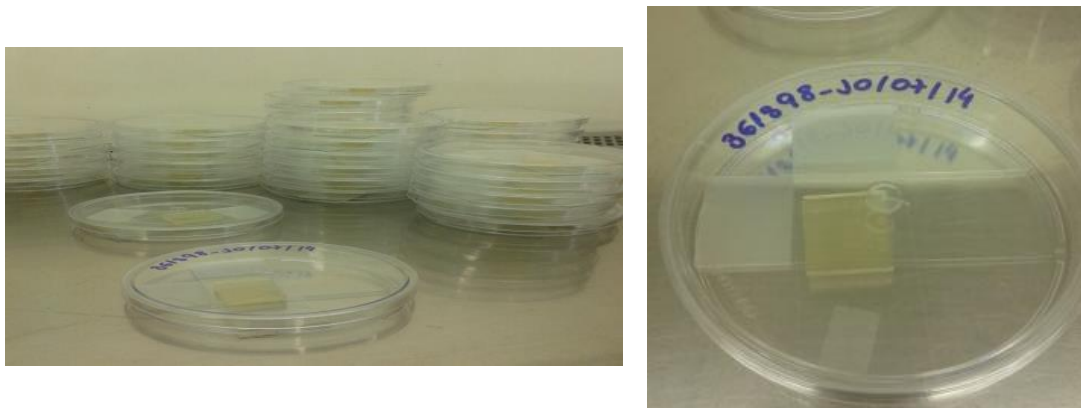


Figura 8. Placas usadas para técnica de microcultivo em lâmina para identificação de fungos filamentosos. Fonte: Do autor

### 3.3 Identificação por MALDI- TOF

O sistema Maldi Biotyper CA System (Bruker Daltonics EAU) foi utilizado para tal finalidade, o modelo usado foi o microflex LT/SH, tendo sido a extração realizada segundo Theel *et al.* (2011) e Erhard *et al.* (2008).

O protocolo utilizado para procedimentos de MALDI-TOF foi como segue:

1. Obtenção de cultura com crescimento abundante, entre 7 a 14 dias, conforme o agente etiológico, em ágar batata sob 25°C;
2. Obtenção de solução de cultura e adição de 1 mL de etanol 70%;
3. Centrifugação por 10 minutos a 15.000 rpm;
4. Secagem do sedimento por evaporação do álcool;
5. Ressuspensão do sedimento com 50µl de ácido fórmico 70%;
6. Homogeneização em *vortex* por 1 minuto;
7. Adição de 50µL de acetonitrila;
8. Homogeneização em *vortex* por 1 minuto;
9. Centrifugação por 10 minutos a 15.000 rpm;
10. Uso do sobrenadante para depósito (0,05ml) na placa do aparelho de MALDI-TOF.

A interpretação, conforme instruções do fabricante do equipamento, foi segundo o Quadro 1.

Quadro 1. Interpretação do resultado da pontuação no método de MALDI-TOF no equipamento da Bruker Daltonics

Pontuação ( <i>score</i> )	Descrição
2300-3000	Identificação altamente provável de espécie
2000-2999	Identificação segura de gênero, provável identificação de espécie
1700-1999	Identificação provável de gênero
0-1600	Identificação não confiável

Fonte: Bruker Daltonics

### 3.4 Identificação molecular por sequenciamento da região ITS1-ITS4

#### 3.4.1 Extração e purificação de DNA

As culturas foram centrifugadas por 15 min a 3.000 rpm. Após o descarte dos sobrenadantes, os sedimentos foram lavados por 3 vezes com 20 mL de água destilada estéril (por 15 min a 3.000 rpm) e transferidos para tubos de 1,5 mL. Para a fragilização das paredes, as células foram ressuspensas com 200mL de tampão TBE 50 mM contendo 30 mL de 60mg/mL da enzima lítica de *Trichoderma harzianum* (Sigma) e incubadas a 37°C por 2 a 3 h, fazendo agitações constantes. A seguir, os microtubos contendo os protoplastos foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos. A seguir, procedeu-se as extrações de DNA dos protoplastos, pelo método clorofórmio/isoamilálcool com modificações (Sambrook *et al.*,1989). Os protoplastos foram digeridos com 200mL proteinase K (100µg/mL) num tampão contendo 50mM Tris-HCl pH 8,0; 25mM EDTA; 2% SDS. Após a incubação a 50° C por 2 h, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 min e o sobrenadantes transferidos para outros microtubos. Para promover a precipitação das proteínas foram adicionados aos sobrenadantes 200mL de

clorofórmio-isopropanol (24:1). As misturas foram homogeneizadas e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min. A parte aquosa de cada tubo contendo somente os ácidos nucleicos foi transferida para um novo microtubo. A precipitação das moléculas de DNA foi realizada adicionando-se 3 vezes o volume de isopropanol. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 min. Após o descarte dos sobrenadantes, os sedimentos foram lavados com 200-500µL de etanol 70% e centrifugados a 12.000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram secos pela inversão do microtubo em papel de filtro. Aos sedimentos foram acrescentado 50µL de H<sub>2</sub>O ultrapura estocados a -20°C. O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras em DO (densidade ótica) 260/DO 280 nm que deveria apresentar valores entre 1,8 e 2,0. As leituras realizadas a 260nm determinaram as concentrações de DNA. Segundo Sambrook *et al.* (1989) absorvância igual a 1 equivale a concentração de 50 µg/mL de DNA de fita dupla.

#### 3.4.2 Reação em cadeia da polimerase

As amplificações foram realizadas utilizando um kit comercial (GoTaq®Green Master Mix - Promega) contendo 2 corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 µL do “mix” continha 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 50mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> e 200 mM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 1 µL do DNA alvo e 25 pmol de cada iniciador num volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador (LongGene). Para cada reação foi adicionado o controle negativo, onde foi utilizada água ultrapura que substituiu o DNA. O marcador molecular utilizado foi o ITS1/ITS4 (universal para fungos (TS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' e ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'),

que amplifica um fragmento da região ITS1–5.8S- ITS2 do rDNA (White *et al.* 1990).

As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento por 60°C por 90 seg e extensão a 72°C por 75 seg. A extensão final foi a 72°C por 10 min (Tavanti, 2005).

Procedeu-se às corridas eletroforéticas em gel de agarose a 2% em tampão Tris, ácido Bórico e EDTA (tampão TBE) 1X. Foi aplicada no gel 1µL de marcador molecular de 100pb e 4µL do produto da PCR das amostras.

A eletroforese foi processada sob voltagem de 100 V e amperagem de 400mA por 40min. Após a eletroforese, o gel da cuba foi colocada no banho de brometo (10mg/mL) por 15'. A seguir o gel foi levado a transiluminador Syngene e a imagem capturada, numerada e salva em computador. As análises eletroforéticas dos produtos da amplificação foram feitas pela comparação visual, dos tamanhos das bandas e pela co-migração dos marcadores de peso molecular de 100 pb.

### 3.4.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Sequenciamento, do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz-SP, no Sequenciador Automático Applied 3010XL.

Os produtos da PCR foram purificados com *kit* Pure Link PCR Purification (Invitrogen), seguindo as instruções do fornecedor.

Ambas as fitas do produto da PCR purificado foram sequenciadas (uma reação com marcador molecular ITS1 e outra com o ITS4) utilizando o kit BigDye Terminator cycle sequencing (Applied Biosystems). As condições da reação foram: 7,56 µL de água ultra pura, 2,0 µL de tampão fornecido pelo fabricante do *kit*, 0,8 µL de BigDye, 0,64 µL de *primer* e 1 µL do produto de PCR purificado.

As reações de sequenciamento foram colocadas em termociclador (Progene) e consistiram em ciclo inicial de desnaturação inicial de 1 min. a 96°C, 30 ciclos de: 96°C por 10 seg, 55°C por 15 segs e 60°C por 4 min. Após o término da reação, os tubos do termociclador foram retirados, embrulhados em papel-alumínio, e armazenados em *freezer*-20°C.

Para a etapa de purificação do sequenciamento, utilizou-se o *kit* Dye Ex 2.0 Spins (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A seguir, os produtos purificados foram transferidos para microplaca de PCR e coberta com filme plástico (selante). Antes de injetar a placa no sequenciador, foi feita a desnaturação, colocando-se a placa no termociclador por 3 min. a 96°C e, logo em seguida, no *freezer* cobrindo-se a placa com papel-alumínio.

Os alinhamentos das sequências foram realizados no programa *Sequencer*. As sequências alinhadas foram comparadas com aquelas disponíveis em bases de dados públicos, tais como GeneBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.com](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)) e base de dados do CBS. Ao realizar o alinhamento simples com as sequências disponíveis no Gen Bank, com auxílio do BLASTn, os isolados que apresentarem 99% a 100% de similaridade com as sequências depositadas permitiram a identificação de espécie.

### 3.5 Determinação da suscetibilidade dos agentes onicomicoses

Todos os isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade a 3 fármacos antifúngicos: fluconazol, itraconazol e terbinafina. A metodologia empregada foi a de referência norte-americana, publicada no documento denominado M38-A2 (CLSI, 2008). O método de microdiluição em placas de microtitulação foi realizado com meio de cultura RPMI 1640 sem bicarbonato de sódio e com L-glutamina (CULTILAB, Br). Todos os procedimentos foram executados com assepsia, dentro de câmara de segurança biológica classe II (VECO, Br). O perfil de suscetibilidade de cada isolado foi avaliado em

duplicata e os resultados dos testes expressos em concentração inibitória mínima (MIC).

### 3.5.1 Preparo dos inóculos

Para os testes foi preparado um inóculo de cada isolado, como segue: após o crescimento (4-7 dias, de acordo com a espécie), as colônias foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril contendo 1 gota de *Tween* 20 (Sigma- aldrich) e, a seguir, friccionadas, levemente, com ajuda de swab estéril. A solução salina contendo esporos foi transferida para um tubo estéril e após sedimentação, por decantação em repouso (5' a 10') sob temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril e homogeneizado em misturador tipo *vortex* por 15 segundos.

A suspensão contendo esporos foi, então, padronizada, por contagem de esporos em câmara de Neubauer (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2003). A contagem dos esporos foi realizada na parte central da câmara e a suspensão ajustada com solução salina para conter, aproximadamente, 300 esporos. A suspensão assim preparada constituiu-se de inóculo-mãe, contendo  $1,0 \times 10^6$  a  $5,0 \times 10^6$  células por mL. A partir da suspensão padronizada foi feita uma diluição 1:100 em meio RPMI -1640 com Lglutamina sem bicarbonato adicionado de MOPS pH7,0 (Sigma, EEUU) para obtenção de inóculo para uso no teste, contendo,  $X \times 10^*$  esporos/mL.

### 3.5.2 Preparo das soluções de antifúngicos

Os antifúngicos: fluconazol-FCZ (Eurofarma, Br), itraconazol-ITRA (Eurofarma, Br) e terbinafina-TERB (Eurofarma, Br) foram adquiridos na forma de pó P.A.

A solução-mãe de FCZ, na concentração de 5120 mg/L, foi preparada em água destilada e as de ITRA e TERB, contendo 1600 mg/L,

em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções de uso para serem colocadas nas placas de microtitulação para os testes, foram preparadas de modo que as concentrações finais dos antifúngicos, após a adição do inóculo de levedura, ficassem entre 64 mg/L e 0,125 mg/L para FCZ e entre 16 mg/L a 0,03 mg/L para ITRA e TERB.

Cada solução de antifúngico foi, então, distribuída em alíquotas de 100 µL, em uma placa de microtitulação, desde a coluna 2 até a 11, correspondendo a cada coluna, uma concentração. As placas foram, a seguir, congeladas à temperatura de -70 °C até o momento do uso, por período máximo de 6 meses.

### 3.5.3 Determinação da suscetibilidade

A determinação da suscetibilidade foi realizada por método de microdiluição em placas de microtitulação. Nas placas de microtitulação as duas colunas sem adição de antifúngicos foram destinadas aos controles internos de qualidade, sendo: coluna 1, destinada ao controle negativo, ou de esterilidade do meio RPMI-1640 usado na reação, e a coluna 12 usada para controle positivo, ou de crescimento de cada isolado (Figura 10).

As cepas-padrões *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram usadas em todos os testes para validar os resultados de MIC (CLSI 2008).

Os inóculos foram colocados por fileira (linha), sendo cada inóculo em cada uma das oito fileiras identificadas em ordem alfabética de A a H. Em cada placa foram colocados os dois controles internos de cepas ATCC já citados e seis isolados.

Cada placa contendo inóculo e um dos tres antifúngicos foi agitada, durante 15 minutos a 65 rpm em agitador de Klime, antes de sua incubação sob temperatura de 35°C ± 2°C.

As leituras, realizadas visivelmente foram realizadas em intervalos de 24h até 96h, mantendo-se as placas a 35°C ± 2°C até a obtenção de



crescimento do inóculo no controle positivo (coluna 12). A leitura das placas foi realizada da seguinte maneira: sob luz e sobre um suporte contendo um espelho para se avaliar a turbidez de cada orifício, resultante do crescimento do isolado. Determinou-se, nas diferentes concentrações de cada fármaco, o poço onde ocorreu a inibição do crescimento. O valor do MIC de ITZ e TBF foi feita na menor concentração dentre aquelas que resultaram em inibição significativa (i.e. 80%) do crescimento do isolado, em relação ao seu crescimento observado no controle positivo e para FCZ o ponto de leitura foi em 50% de inibição de crescimento, também em relação ao controle positivo. Para a validação das leituras das placas foi considerada correta aquela em que o controle negativo não mostrar crescimento e o controle positivo apresentar crescimento e os MICs das cepas-padrão situaram-se dentro do intervalo proposto no método referência M38-A2 (CLSI, 2008).



Figura 10. Esquema de placa de microtitulação utilizada para determinação da concentração inibitória mínima por método de referencia norte-americano M38-A2. Fonte: Do autor

### 3.6 Análise de Resultados

Os resultados de exame direto da amostra, isolamento, identificação morfológica, por MALDI-TOF e por amplificação da região ITS foram compilados e comparados. Os valores de MIC segundo gênero e/ou espécie foram tabulados de acordo com os seguintes parâmetros: intervalo de valores, média, moda, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, correspondendo respectivamente ao valor de MIC necessário para inibir 50% e 90% do conjunto de isolados avaliados.

## 4. RESULTADOS

O gênero foi masculino em 31 (62%) e feminino em 19 (38%) dos pacientes e a idade da população ficou entre 18 a 69 anos. Esse dado, assim como as características da população estudada, constam da Tabela 2.

Houve relato de doença relacionada à onicomicose em 33 (66%) casos, sendo mais frequente: hipertensão (7;14%), diabetes (9;20%) e hipercolesterolemia (5;10%) (Figura 11).

O tempo de lesão de onicomicose foi citado por 35 (70%) casos, variando de 1 mês a 10 anos. O tipo de onicomicose foi *Tinea pedis* distal em 37 (73%) dos casos e proximal em 5 (10%) dos casos e, ainda, *Tinea manuum* distal em 5 (10%) dos casos e proximal em 3 (7%) dos casos.

Quanto ao uso de medicação, este foi relatado por (23; 34%) casos, incluindo antifúngicos: itraconazol (1;2%), fluconazol (2; 4%) e isoconazol (1;2%) e outros para as co-morbidades, como Captopril (3;6%), Glibenclamida (3; 6%), sinvastatina (5;10%), insulina (3;6%), atenolol (3;6%), tiroxina (1;2%) e alodipina (1;2%) (Figura 12).

Tabela 2 Dados demográficos e clínicos de 50 casos de onicomicose, em Hospital da Aeronáutica, São Paulo, 2015-2016

Característica	N	%
<b>Gênero</b>		
masculino	31	62
feminino	19	38
<b>Faixa etária (anos)</b>		
0 - 19	5	10
20 - 29	12	24
30 - 39	7	14
40 - 49	8	16
50 - 59	8	16
60 - 69	10	20
<b>Localização</b>		
podotáctilos	42	84
distal	37	74
proximal	5	10
quirodáctilos	8	16
distal	5	10
proximal	3	6
<b>Tempo de evolução da onicomicose (meses)</b>		
≤3	15	30
4 a 11	18	36
12 a 24	5	10
24 a 48	6	12
48 a 72	5	10
>72	1	2

Nas 50 amostras de unha, metade (46%) dos resultados foi positivo ao exame micológico direto e maioria dos casos com cultura positiva (62,5%) (Tabela 3). Em 50 agentes identificados, *T. rubrum* foi o dermatófito mais encontrado (22; 44%), seguido por *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (19; 38%) e *M. gypseum* (3;6%). Fungos filamentosos não dermatófitos foram encontrados em porcentagem alta de pacientes, incluindo isolados do gênero *Chaetomium globosum* (4;8%), *Fusarium* spp. (1; 2%) e *Scytalidium* spp. (1; 2%) (Tabela 4). As culturas foram, também, processadas pela técnica de MALDI-TOF para identificação das espécies; porém , não houve êxito, pois todos os resultados foram inconclusivos, com *score* abaixo de 1.7. A qualidade do banco de dados define o desempenho do aparelho para identificação correta da espécie e/ou gênero (Benagli et al., 2011). A identificação foi realizada, portanto, por aspectos morfológicos e moleculares, com identificação por ITS .

Tabela 3. Resultado de exame micológico direto de amostras ungueais de pacientes com suspeita clínica de onicomicoses atendidos no ambulatório do Hospital de Aeronáutica de São Paulo

Resultado	Positivo	Negativo	Total
N	23	27	50
%	46	54	100

Tabela 4. Agentes etiológicos e localização das onicomicoses em 50 pacientes militares da aeronáutica

<b>Agente</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>localização</b>
<i>Trichophyton rubrum</i>	22	44	Mãos 3 Pés 19
<i>T. interdigitale*</i>	19	38	Mãos 3 Pés 16
<i>Chaetomium globosum</i>	4	8	Mãos 3 Pés 19
<i>Microsporium gypseum</i>	3	6	Mãos 1 Pés 2
<i>Fusarium solani</i>	1	2	Mãos 0 Pés 1
<i>Scytalidium spp</i>	1	2	Mãos 0 Pés 1
<b>Total</b>	50	100	

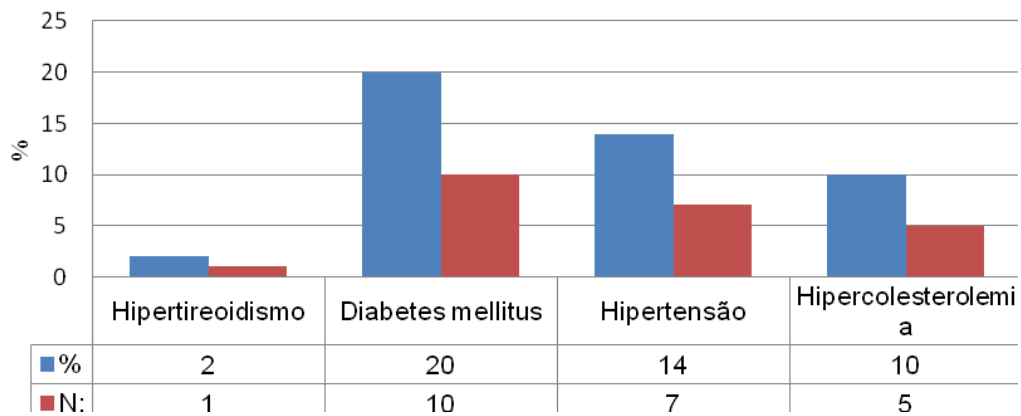


Figura 11. Doenças relacionadas a onicomicoses em pacientes com suspeita clínica de onicomicoses

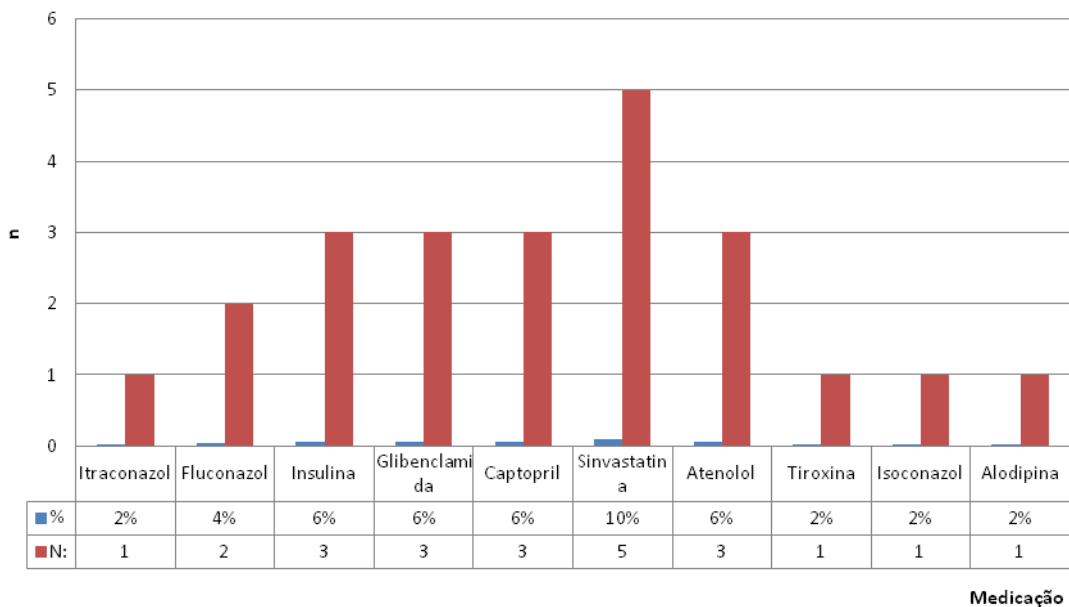


Figura 9 Distribuição dos pacientes, com suspeita clínica de onicomicoses, atendidos no ambulatório do Hospital de Aeronáutica de São Paulo, quanto ao uso de medicamentos

Em relação à suscetibilidade, o ponto final de determinação das leituras foi realizado visualmente baseado na comparação do crescimento nos poços contendo os compostos com aqueles do controle de crescimento. Foram verificados intervalos de MIC entre 0,015 mg/L a 0,5 mg/L para itraconazol, entre 0,25 mg/L a 64 mg/L para fluconazol e entre 0,015 mg/L a 1 mg/L para terbinafina. Os valores de MIC50 e MIC90, respectivamente para itraconazol, fluconazol e terbinafina, foram de: 0,06 mg/L e 0,12 mg/L; 32 mg/L e 32 mg/L; e 0,015 mg/L e 0,06 mg/L.

A distribuição dos valores de MIC consta das Tabelas 5 e 6 e está ilustrada na Figura 13.

Tabela 3. Suscetibilidade a 3 fármacos, segundo intervalos de valores obtidos por método AFST-EUCAST

<b>Fármaco</b>	<b>Intervalo de MIC (mg/L)</b>
Itraconazol	0,015 – 0,5
Fluconazol	0,25 – 64
Terbinafina	0,015 – 1,0

AFST, *Antifungal susceptibility testing-european committee antimicrobial susceptibility testing*; MIC, concentração inibitória mínima



Tabela 4 Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 3 fármacos frente a 50 agentes de onicomicoses, obtidos por método CLSI

ESPÉCIE	ANTIFÚNGICO	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)												
		0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<b>T.RUBRUM</b> 22	FLUCONAZOL	Na	Na	Na	0	0	0	0	01	03	02	05*	10	01
	ITRACONAZOL	02	06	05*	07	0	02	0	0	0	0	0	0	0
	TERBINAFINA	15*	02	04	0	0	01	0	0	0	0	0	0	0
<b>T.INTERDIGITALE</b> 19	FLUCONAZOL	Na	Na	Na	0	0	0	01	01	0	01	04	11*	1
	ITRACONAZOL	01	05	06*	07	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TERBINAFINA	16*	03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>CHAETOMIUM GLOBOSUM</b> 03	FLUCONAZOL	Na	Na	Na	0	0	0	01	0	0	01	0	0	01
	ITRACONAZOL	01	01	01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TERBINAFINA	03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>MICROSPORIUM GYPSEUM</b> 03	FLUCONAZOL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	01	02	0
	ITRACONAZOL	0	01	0	01	01	0	0	0	0	0	0	0	0
	TERBINAFINA	01	01	01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>FUSARIUM SOLANI</b> 01	FLUCONAZOL	0	0	0	0	0	0	0	0	01	0	0	0	0
	ITRACONAZOL	0	0	01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TERBINAFINA	0	0	01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>NEOSCYTALIDIUM</b> 01	FLUCONAZOL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	01	0
	ITRACONAZOL	0	0	01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TERBINAFINA	01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*MIC50

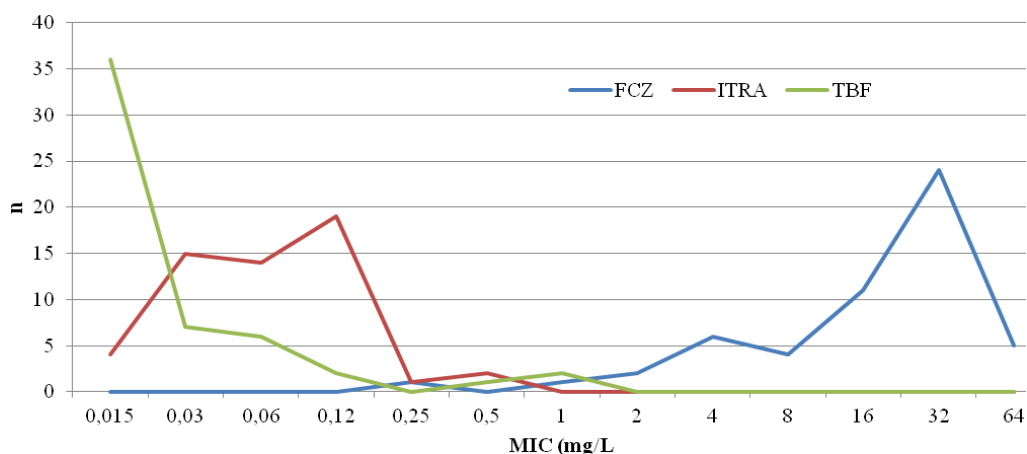


Figura 3. Distribuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 3 fármacos frente a 50 agentes de onicomicoses, de população militar atendida no Hospital de Aeronáutica de São Paulo, obtidos por método AFST-EUCAST

## 5. DISCUSSÃO

A onicomicose pode ter danos psicológicos importantes, incluindo-se constrangimento constante, depressão, ansiedade, preocupação com aparência e constrangimento em situações íntimas (Lubeck DP, 1993, Gupta, Donnikov e Lynde, 2001). Isso ficou evidente em um estudo de Jarv *et al.* (2004), na Estônia, sendo que a maior queixa dos pacientes foi o constrangimento, além do desconforto ao andar, dor e limitações no trabalho, causados pela ocorrência de onicomicoses. Assim sendo, a resolução do quadro, o mais rápido possível leva à melhor qualidade de vida e trabalho de muitos indivíduos acometidos pela doença. Nesse contexto, o diagnóstico acurado ou presuntivo, disponível para o dermatologista ou médico assistente, pode ter impacto positivo na introdução de terapia adequada para rápido e eficiente manejo da onicomicose.

Desse modo, conhecer seus agentes e suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos é tarefa relevante, em vista, da diversidade de espécies possíveis e distintos perfis de suscetibilidade aos fármacos utilizados na clínica médica.

O diagnóstico de onicomicose foi aqui estabelecido em 50 militares, pelo exame micológico, dentre os 80 indivíduos que apresentavam suspeita clínica de onicomicose. Considera-se que frequência de onicomicose, comprovada laboratorialmente, foi alta (>60%) na população amostrada o que pode ser explicado por distintos aspectos.

A população militar é uma das mais suscetíveis às onicomicoses podais, com conseqüente, possibilidade de transmissão para unhas dos quirodáctilos. A localização podal e, em particular, a distal foi mais frequente na população militar avaliada, fato que pode estar relacionado à essa profissão. Considerando unhas dos pododáctilos e quirodáctilos, os dermatófitos representaram, respectivamente, 70% (n=36) e 14% (n=07), enquanto os FFND foram identificados em 14% (n=06) e 2% (n= 01). A onicomicose de pododáctilos, em geral, é a mais frequente, como demonstrado em estudo (68%) e tendo como causa os dermatófitos na

maior parte dos casos, seguido por leveduras (26%) e por FFND (15%); dentre as unhas das mãos, as leveduras foram os agentes da extensa maioria (93%) dos casos na cidade do Rio de Janeiro (Araújo *et al.*, 2003). O Brasil possui condições favoráveis para a proliferação de fungos já que é um país de clima tropical quente e úmido. Soma-se aos hábitos militares de uso de calçados fechadas (coturnos) e marchas prolongadas, favorecendo à manutenção de umidade e maceração distal dos pododáctilos.

Além da questão da vestimenta, a maioria (66%) dos casos relatou doença relacionada à onicomicose, incluindo: hipertensão (14%) e diabetes (20%). Essas são, de fato, doenças tidas como predisponentes para onicomicoses, em particular, esta última pela doença circulatória periférica, que diminui a resistência a agentes invasores. Nos pacientes com *diabetes mellitus*, a prevalência de onicomicose varia de 1,2% a 26% (Kuvandik, *et al* 2007). Cursi *et al.* (2011) relatam que, dos casos com onicomicoses, 20% são pacientes diabéticos e cerca de 60% são portadores de doenças circulatórias. Os pacientes diabéticos são duas vezes mais propensos a terem onicomicoses do que aqueles sem essa doença (Araújo *et al.*, 2003b).

Adultos acima de 60 anos são mais predispostos às onicomicoses (Eisman e Sinclair, 2014) e, nessa população, as onicomicoses podem chegar a atingir 60% dessa população (Walling e Sniezek, 2007; Allevalo, 2010). Além disso, a taxa de crescimento das unhas, para reposição de queratina é menor na idade avançada (>65 anos), agravada por presença de doença vascular periférica (Elewski, 2005) No entanto, não foi observada maior frequência de onicomicose em população idosa neste estudo, contrariando a ideia de que, com o avançar da idade pela circulação periférica mais lenta, traumas ungueais, exposição aos fungos patogênicos por mais tempo, esse grupo tem maior probabilidade de manifestar essa doença.

A maioria dos pacientes era do gênero masculino, provavelmente expressando o contingente militar (dados não mostrados), representado por homens, em sua grande maioria. Não há nenhum fator específico para determinar maior prevalência segundo gênero. Roberts *et al.* (1992)

observaram que não há diferença quanto ao gênero. A literatura, no entanto, é controversa, sendo que, alguns autores observaram preponderância do feminino (70%) sobre o masculino (60) (Araújo *et al*, 2003; Alvarez *et al*, 2004). Outros grupos de especialistas (Gupta *et al*, 2003; Perea *et al* 2000) observaram exatamente o contrário, com cerca de 64% dos casos ocorrendo no gênero masculino. A justificativa para estas discrepâncias talvez esteja na composição populacional de onde as amostras foram escolhidas, uma vez que a infecção fúngica depende de ecologia e hábitos culturais.

A taxa de positividade verificada para os exames micológicos diretos (n=23) foi baixa, não chegando a metade da positividade verificada nas culturas, para dermatófitos (n=43) e por FFND(n=7). Possivelmente, houve falta de acurácia no exame direto, desde que a literatura indica ser este um exame mais sensível do que a cultura, embora menos específico. Para diagnóstico de micoses causadas por infecções fúngicas de pele e unhas na Índia, Chowdhry *et al.* (2013) verificaram que 60% de pacientes com onicomicoses tiveram exame direto da amostra positivo e 45% pelo isolamento do agente em cultura. Comparando-se a eficácia de exames laboratoriais no diagnóstico de onicomicose, como exame micológico direto com KOH e cultura, em cerca de 100 pacientes com suspeita clínica de onicomicose, foi verificado que esses métodos mostraram positividade, respectivamente, de 53% e 35% (Shenoy *et al.*, 2008), proporção discordante da verificada neste estudo, em que o resultado de culturas positivas foi maior do que os exames diretos das amostras biológicas.

A coleta, conservação e transporte das amostras biológicas para o diagnóstico laboratorial das dermatofitoses devem ser realizados de forma adequada, já que influenciarão muito no resultado final do exame laboratorial. É importante assegurar que o paciente não esteja fazendo uso de medicação antifúngica no momento da colheita, para que não haja interferência nos resultados; caso ele esteja medicado, é necessário que haja a suspensão do uso por pelo menos uma semana antes da colheita do material. A quantidade do material a ser colhido deve ser suficiente para a realização de pelo menos dois exames laboratoriais, porém existem

situações em que há pouca descamação observada na lesão; sendo assim, não é possível colher grande quantidade de material. O material biológico a ser examinado não deve ser das áreas lesionadas mais antigas como o centro das lesões na pele ou a região distal das unhas infectadas, pois o fungo geralmente apresenta-se em menor quantidade.

Ainda que demore, o isolamento em cultura do agente etiológico da infecção micótica é o padrão-ouro para diagnóstico do quadro. Alguns estudos tiveram por objetivo utilizar técnicas de biologia molecular na detecção do DNA do dermatófito e, por consequência, em sua identificação (Kano,1999; Harmsen,1999). A possibilidade de detectar diretamente DNA de dermatófitos a partir de material clínico foi demonstrado por Turin *et al.* (2000). Os autores usaram um ensaio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para DNA ribossomal, e assim, conseguiram detectar DNA de várias espécies de fungos, incluindo-se, entre elas, dermatófitos em 40 amostras clínicas de origem humana e animal. Machouart-Dubach *et al.* (2001), por sua vez, compararam o ensaio de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Lengthy Polymorphism*), no qual fragmentos de DNA de dermatófitos contidos em material de lesão foram extraídos, amplificados e, posteriormente, digeridos com enzimas de restrição (SANTOS, 2002). Apesar de todos esses avanços e da intensa pesquisa que está sendo realizada nesse campo, o diagnóstico baseado na detecção e identificação de DNA fúngico ainda não pode ser considerado uma metodologia recomendada para ser utilizada no dia a dia da rotina de diagnóstico das dermatofitoses, tendo em vista a inexistência, até o momento, de uma padronização para os diferentes ensaios genéticos, o alto custo dos reagentes utilizados, a infraestrutura necessária para a realização desses testes e o treinamento do pessoal de laboratório (Santos,2002).

A cultura deve ser sempre realizada para determinação exata da etiologia das onicomicoses. O envolvimento crescente de novas espécies fúngicas faz com que seja necessária a adoção de procedimentos laboratoriais que envolvam não só técnicas de coletas adequadas, como também processamento correto de amostras e conhecimento de aspectos

morfológicos dessa ampla variedade de espécies, contribuindo para a correta terapêutica. Os dermatófitos, sendo grupo de fungos especializados em degradar queratina, são os agentes mais prováveis de serem implicados em onicomicoses e, de fato, foram os mais frequentes neste estudo. Dermatófitos foram os fungos responsáveis pela maioria das infecções, tanto em unhas dos pododáctilos, quanto quirodáctilos, reafirmando a importância desse grupo de fungos nas onicomicoses. Os dermatófitos apresentam enorme variação epidemiológica, portanto, sendo influenciados também por características individuais dos pacientes (Faergman e Baran, 2003). Os dermatófitos antropofílicos são parasitas obrigatórios associados aos seres humanos, em geral causando infecções leves, mas tendendo à cronicidade; por outro lado, espécies zoofílicas e geofílicas, menos adaptadas ao homem, causam infecções mais agudas, com caráter inflamatório, muitas vezes com formação de vesículas e pústulas (Weitzman e Summerbell, 1995).

*T. rubrum*, o agente mais frequente identificado nessa população, pode produzir distintos quadros clínicos de dermatofitoses, mas tem como característica principal a tendência para cronicidade pelo seu caráter antropofílico estrito e menor suscetibilidade a antifúngicos tradicionais (De Hoog *et al.*, 2000). *T. rubrum*, uma espécie antropofílica, foi a mais encontrada na população deste estudo, em concordância com achados de diversos estudos internacionais (Lopes *et al.*, 1999; Gupt *et al.*, 2000). A relevância clínica dessa espécie é alta, não apenas pela frequência, mas devido à transmissão, exclusivamente, inter-humana ou por fômites contaminados agregando a esse agente um forte potencial para causar surtos (Chimelli *et al.*, 2003). De fato, estudos epidemiológicos realizados no Brasil têm mostrado o predomínio de *T. rubrum* como agente causal das dermatofitoses humanas desde há décadas (Costa *et al.*, 1999; Mezzari *et al.*, 1998). Na região sul, Porto Alegre, Aquino *et al.* (2007) encontraram *T. rubrum* como agente mais freqüente de *tinea ungueum* em, assim como descrito em Goiania por Costa *et al.* (2002) em 50% de quase 2000 casos. Na região sudeste, Rio de Janeiro, um estudo com 1416 casos, apontou essa espécie como prevalente (70%) de onicomicoses causadas por

dermatófitos (Araújo *et al.*, 2003). Em São Paulo, Botucatu, 3,3% das *tinea capitis* foram causadas por *T. rubrum* (Marques *et al.*, 2005). No nordeste, Fortaleza, Ceará, em 2297 casos a espécie foi o agente de mais de 70% das lesões fúngicas de *tinea corporis* (Brilhante, 2003).

*T. rubrum* é, também, o agente etiológico mais prevalente no continente norte americano, Canadá (Summerbell *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2003) e EUA (Kemna & Elewski, 1996), assim como na Europa, incluindo Grécia (Koussidou *et al.*, 2002), Itália (Gianni *et al.*, 2000; Tosti *et al.*, 2000), Finlândia (Heikkilä, 1995) e Inglaterra (Clayton, 1992). Um dos mais longos estudos encontrados na literatura vem da Grécia, onde durante 7 anos 520 pacientes com lesões ungueais foram avaliados, revelando que 27,5% dos casos tinham onicomicose, cujo agente principal (51,2%) era *T. rubrum* (Maraki *et al.*, 2007). No Oriente, em estudo realizado no Líbano (2006) com 772 pacientes durante 5 anos, foram isolados dermatófitos na maioria dos casos, mas *T. interdigitales* superou (36%) a frequência de *T. rubrum* (27,5%) nas onicomicoses (El Sayed *et al.*, 2006).

*T. mentagrophytes* foi o segundo agente (38%) de onicomicoses na população de militares avaliada, coincidindo com os dados de Zaias (1966), Gupta *et al.* (2001) e, ainda que em maior frequência, com aqueles verificados (15,9%) por Maraki *et al.* (2007). Em população civil, no Brasil, *T. mentagrophytes* é citado como um dos dermatófitos responsáveis por 50% das onicomicoses dos pés, em casos atendidos no Rio de Janeiro, 31% de pacientes de Goiânia e, em menor taxa (6,2%) de onicomicoses e outras micoses cutâneas em Fortaleza (Araújo, *et al.*, 2003; Brilhante, *et al.*, 2004, Costa *et al.*, 2002). *T. mentagrophytes* pode ser também agente de *tinea capitis*, como citado em um trabalho realizado em São Paulo, em taxa de 1,6% (Marques *et al.*, 2005).

*M. gypseum* é raro como agente de onicomicose, como observado neste estudo (6%). Um estudo realizado na Guatemala analisou as características epidemiológicas e clínicas de 18 casos de onicomicose do *Microsporum* (*M. canis*, n = 10; *M. gypseum*, n = 7; *M. nanum*, n = 1) (prevalência = 0,43%), num total de 4220 casos de onicomicose

diagnosticados entre maio de 2008 e setembro de 2011 (Martinez *et al.*; 2014).

*M. canis* é responsável por infecções fúngicas do couro cabeludo e outras partes do corpo (Lacaz *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2002). As infecções por essa espécie em estudos brasileiros, mesmo que em taxas relativamente baixas, envolvem o couro cabeludo, como o realizado em Fortaleza (Ceará) (0,6%) e Botucatu (São Paulo) em crianças abaixo (1,8%) e acima de 5 anos (2,2%) (Brilhante *et al.*, 2004, Marques *et al.*, 2005). Em Fortaleza, em 7% de 534 casos de dermatomicoses esse agente foi isolado, mostrando distribuição distinta das espécies de dermatófitos (Brilhante *et al.*, 2003).

*T. tonsurans* não foi identificado na população militar deste estudo, mas outros estudos mostram a ocorrência dessa espécie, como agente de menor importância (1%) em 99 casos de onicomicose, na cidade do Rio de Janeiro (Araújo *et al.*, 2003). Outro estudo, em São Paulo, também indica presença menor desse agente (Chimelli *et al.* 2003). De fato, *T. tonsurans* é mais prevalente como agente causal de micoses do couro cabeludo (Delacrétaz, *et al.*, 1978). Nessa forma de dermatofitose foi o agente mais freqüente (74%) em Fortaleza (Brilhante *et al.*, 2004), com menor presença (3,9%) em São Paulo (Marques *et al.*, 2005) e Goiânia (1,1%), nesta como agente de micoses cutâneas (Costa *et al.*, 2002). Interessante ressaltar que, também, não foi identificado *E. floccosum* como agente de onicomicoses na população estudada, em forte contraste com achados no Rio de Janeiro, em que representou 64,7% dos dermatófitos (Araújo *et al.*, 2003).

Embora os dermatófitos ainda sejam os principais agentes etiológicos das onicomicoses, neste trabalho foram evidenciados FFND em taxa notável (12%). Entre os fatores de risco para invasão das unhas por FFND, descritos na literatura, foram compilados das declarações da população militar analisada: imunossupressão, psoríase, estilo de vida, prática de esportes e além de fatores ocupacionais (Schechtman, 2008). No grupo estudado, havia ainda diabetes, que pode levar à imunodepressão e, especialmente, o risco ocupacional pelo uso de coturnos. FFND colonizam, ativamente, a epiderme e não são considerados queratinofílicos, pois vivem



à custa do cimento intracelular ou ainda, da queratina desnaturada por trauma ou doença. O trauma do uso contínuo de coturno de couro rígido pode representar um fator preponderante na população militar.

A onicomicose por FFND pode ser semelhante à dermatofitose o que dificulta o diagnóstico clínico. O diagnóstico laboratorial, por sua vez, também é complicado, exigindo critérios mais rigorosos do que para confirmar infecção por dermatófitos e, tanto os critérios diagnósticos, quanto os aplicados à definição de cura são inconsistentes entre os diversos especialistas (Gupta *et al.*, 2001; Summerbell *et al.*, 2005; Zaitz, 2010). A coleta a partir da lesão ungueal é de grande importância para retirada de porção significativa de amostra biológica e a sonda exploratória, utilizada neste estudo, teve papel fundamental para tal. A sonda exploratória é um instrumento metálico com ponta em gancho, utilizado em odontologia, denominado também de explorador dental, a ponta do gancho é afiado e serve para escarificar superfícies duras e servindo, desse modo, para escarificar o material queratínico que constitui as unhas.

Os dados publicados sobre métodos de diagnóstico confirmatórios para onicomicoses causadas por FFND são limitados. Na rotina laboratorial de micologia o padrão ouro para diagnóstico de onicomicoses por FFND é a obtenção de resultados positivos a partir de exame micológico direto, compatíveis com os achados em meios de cultura. Neste estudo, todos os 7 pacientes acometidos de FFND apresentavam exame micológico direto positivo, sendo este um dos critérios diagnósticos de onicomicose por FFND, desde que comprova a invasão da unha.

A frequência de FFND como agentes de onicomicoses na população de militares estudada (14%) está dentro das taxas descritas na literatura mundial consultada. No Brasil, em investigações anteriores, foi descrita taxa menor em população civil (7,9 %) do Rio de Janeiro (Araújo *et al.*, 2003a), mas similar (12%) à observada por Martelozo *et al.* (2005) entre 322 agentes de onicomicoses.

A frequência global da onicomicoses por FFND varia de 4 % a 22% nos diferentes estudos (Srinivas *et al.*, 1993; Tosti *et al.*, 2000; Gianni *et al.*,

2000; Gupta *et al.*, 2001; Ghannoum *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2003). Menor taxa de ocorrência, foi relatada por Finch e Warshaw (2007), em um grande estudo retrospectivo germânico envolvendo cerca de 5 mil amostras de unhas (75% de pés) de mais de 4 mil pacientes, que observaram em 68% dos casos dermatófitos como agentes etiológicos, leveduras em 29% e apenas 3% de FFND. Segundo Calado *et al.*, (2006), nos últimos anos, os casos de onicomicoses não-dermatofítica aumentaram rapidamente, sobretudo na Europa, onde são responsáveis por percentagens que variam de 1,6% a 6%. Em pacientes do Líbano, com 772 pacientes e duração de 5 anos, dermatófitos foram isolados em 77,1% das culturas, leveduras do gênero *Candida spp* em 18,9% e FFND em 4% dos casos (El Sayed *et al.*, 2006).

Na atualidade, o comprometimento crônico das unhas por fungos não-dermatófitos constitui-se em sério problema da dificuldade em seu diagnóstico, tanto para clínicos como para micologistas, desde que são fungos anemófilos e podem ser oriundos de contaminação da amostra biológica. Soma-se a esse problema condutas e seguimentos terapêuticos inadequados, como instalação de terapia empírica com fluconazol. Além disso, onicomicose é uma lesão indolor e quando as unhas acometidas são as dos pés, menos expostas em situações sociais, pode haver descaso pelo paciente que procura, tardiamente, os serviços de saúde para diagnóstico (Sidrim e Rocha, 2004). Aproximadamente a metade dos militares apresentavam doença ungueal há 3 meses ou mais, comprovando a demora em busca de auxílio médico e favorecendo a cronicidade da infecção.

*Scytalidium hyalinum* e *Fusarium solani*, como observado na população de militares avaliada, são os agentes mais comuns dentre FFND associados às onicomicoses. Dentre os hialo-hifomicetos, os mais descritos na literatura, são: *Fusarium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis* e *Scytalidium hyalinum* (Tosti *et al.*, 2000; Bassiri-Jahromi e Khaksari, 2010; Ahmed *et al.*, 2013; Bonifaz *et al.*, 2013). Néji *et al.* (2013) comentam que a estimativa de onicomicose por *Fusarium spp.* seja de 0,09% entre os pacientes com dermatomicoses na Tunísia. No Brasil, poucos estudos

descrevem com precisão as espécies de FFND como agentes de onicomicoses. *Scytalidium* spp, incluindo *S. dimidiatum* e *S. hyalinum*, este considerado uma variedade da primeira espécie é um gênero de FFND relevante nas onicomicoses (Lacaz *et al.*, 1998). No Brasil, *S. hyalinum* foi citada por Araújo *et al.* (2003) como emergente, em onicomicoses, situando-se entre 9,4% dos agentes de casos, de ambos os gêneros, nas infecções das unhas. Há relatos de *S. hyalinum* e *S. dimidiatum* causando onicomicose em pacientes com HIV e população idosa (Lima *et al.*, 2009). Pontarelli *et al.* (2005) isolaram de onicomicoses em pododátalos de pacientes em Santa Catarina e Oliveira *et al.* (2006) também encontraram esse gênero em Manaus. Na cidade de Rio de Janeiro *Scytalidium*, sendo mais frequente *S. dimidiatum*, seguido de *S. hyalinum* foram também identificados de casos com onicomicoses (Xavier *et al.*, 2010; Cursi *et al.*, 2011). Do interior de São Paulo (São José do Rio Preto), talvez seja a maior taxa de frequência de FFND da literatura nacional disponível, sendo *S. dimidiatum* (14%), *Fusarium* spp. (14%), *Aspergillus* spp. (7%), *Acremonium* spp. e *Paecilomyces* spp. (2% cada) os mais frequentes (Martins *et al.*, 2007). *F. solani* e *F. oxysporum* metabolizam a queratina das unhas e por isso se explica sua capacidade patogênica nas onicomicoses (Araújo *et al.*, 2003b).

A ocorrência de infecções ungueais por esse grupo de fungos pode levar à dificuldade na decisão da etiologia do quadro e conduta terapêutica que deverá ser estabelecida, desde que estes fungos são contaminantes de meio ambiente (Sidrim & Rocha, 2004).

Quanto à suscetibilidade de dermatófitos aos fármacos, a diminuição desse grupo de fungos aos tratamentos clássicos, atualmente, é visível, bem como o aparecimento de efeitos indesejáveis a certos antifúngicos, o que tem impulsionado a pesquisa de novos agentes anti-dermatofíticos (Silva *et al.*, 2005). Testes de suscetibilidade a antifúngicos são recomendados em todas as cepas provenientes de infecções invasivas, também são indicados em casos de fracasso terapêutico e casos que receberam profilaxia antifúngica. Os testes de sensibilidade podem orientar

para o tratamento mais adequado, ou alterar a estratégia terapêutica, aumentando a dose ou trocando o antifúngico, ou mesmo, induzindo o uso de terapia combinada. Além dessa aplicação direcionada a um caso em particular, a compilação dos dados serve para programas de vigilância de resistência a antimicrobianos e tratamento empírico.

Este estudo se concentrou em fármacos, comumente, utilizados no tratamento de onicomicoses, como: fluconazol, itraconazol e terbinafina. Esses fármacos foram escolhidos, pois são padronizados pela Comissão de Farmácia Terapêutica do NuHFASP. Os resultados de suscetibilidade encontrados para os fungos dermatófitos e não dermatófitos foram condizentes com a literatura disponível. Os resultados mostram a importância da realização de ensaios de sensibilidade *in vitro*, pois entre alguns isolados da mesma espécie apresentam diferentes perfis de sensibilidade. Quanto aos antimicóticos avaliados, a terbinafina mostrou-se o agente mais eficaz, resultado semelhante ao estudo de Favre et al. (2003). A variação das espécies de dermatófitos influenciou a sensibilidade ao fluconazol. O fluconazol apresentou menor sensibilidade entre os antifúngicos testados, mostrando que está de acordo com outros estudos dentre esses o estudo de Santos (2004) e corroborando os dados de Yamazaki et al. (2010).

Para fluconazol frente a *T. rubrum*, os valores de MIC estão entre 0,39 mg/L a 3,1 mg/L (Yamazaki et al., 2010). Para itraconazol, os estudos indicam MICs de 0,125 mg/L (Carillo-Muñoz et al., 2008) ou entre <0,015 a 0,25 mg/L (Tamura et al., 2014). Santos (2004), em sua dissertação sobre susceptibilidade a fármacos antifúngicos de *T. rubrum*, demonstrou que a terbinafina foi o apresentou a maior atividade *in vitro*; o cetoconazol e fluconazol apresentaram menor atividade *in vitro* (maiores valores de MIC) e o itraconazol apresentou uma taxa significativa de amostras suscetíveis dose-dependentes (consideradas intermediárias). No entanto, *T. rubrum* é a espécie que melhor sustenta o argumento de resistência à terbinafina. No estudo de Osborne et al. (2003) realizado, *in vitro*, com essa espécie os autores descreveram a ocorrência de mutantes resistentes, devido à

exposição prolongada da cepa infectante à terbinafina. Em contrapartida a essa afirmação, a terbinafina mostrou alto índice de atividade contra os dermatófitos nos estudos de Jessup *et al.* (1999) e Carrillo-Muñoz *et al.* (2004), incluindo-se as cepas de *T. rubrum*. Para terbinafina, valores entre 0,01 a 0,06 mg/L (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2008) ou menores (0,004 mg/L) (Tamura *et al.*, 2014) foram observados em estudos anteriores. Portanto, a correta identificação laboratorial, por exame microscópico direto e por cultura micológica, influencia a tomada da decisão do clínico na escolha sobre qual medicamento e outras providências serão tomadas para tratar a doença. Frente a AMB, MIC de valor baixo e único (0,2 mg/L) para diversas espécies foi descrito, anteriormente (Yamazaki *et al.*, 2010) mas o fármaco é, prioritariamente, destinado a micoses sistêmicas.

Para *T. mentagrophytes* frente à fluconazol, os valores de MIC descritos são 3,6 mg/L a 22 mg/L (Yamazaki *et al.*, 2010). Para itraconazol, os estudos indicam MICs entre  $\leq 0,015$  mg/L a 0,5 mg/L (Carrillo-Muñoz *et al.* 2008; Tamura *et al.*, 2014). Para terbinafina, valores de MIC de 0,03 a 0,06 mg/L (Carrillo-Muñoz *et al.* 2008; Tamura *et al.*, 2014) foram observados. Frente a AMB, valor uniforme de 0,39 mg/L foi citado (Yamazaki *et al.*, 2010).

Com o resultado de MIC faz-se a interpretação deste valor, conforme os pontos de corte (*breakpoints*) que, até o momento, estão estabelecidos apenas para algumas espécies de leveduras frente a certos fármacos. O comitê norte-americano CLSI não têm, ainda, *breakpoints* para fungos filamentosos. Isto se deve à escassez de estudos clínicos que indiquem a correlação do valor de MIC de um antifúngico frente a determinado agente etiológico e a evolução clínica após o tratamento da infecção, causada por esse organismo, com essa medicação.

A interpretação dos resultados para fungos filamentosos apresenta, ainda, muitas dificuldades de padronização, além de não terem sido estabelecidos pontos de corte (*breakpoints*). Ressalta este comitê que a relevância clínica de testes para fungos filamentosos é, portanto, incerta. Os dados mais consistentes que se conhece provêm de resultados com

*Aspergillus spp*, provenientes de casos de aspergilose invasiva. Portanto, o comitê europeu considera que a interpretação do resultado de MIC para fungos filamentosos devem ser realizadas com muito critério.

A determinação da suscetibilidade de um isolado pode ser realizada por métodos comerciais ou por método de referência. A importância de um método de referência é prover normas-padrão, que sirvam de base para o desenvolvimento de outras metodologias mais simples, confiáveis, reproduzíveis, de baixo custo, de uso rotineiro e que possa orientar a terapia. Os métodos de referência foram desenvolvidos e selecionados para distintos tipos de fungos, i.e., leveduras e fungos filamentosos. Mesmo dentro de cada um destes grupos há protocolos diferentes para os diversos gêneros. A cada ano, são publicados estudos avaliando melhor tanto os parâmetros de reação, quanto a interpretação de resultados, de modo que, esta é uma área em constante mudança e manter-se atualizado no tema é obrigação de quem executa estas metodologias.

A aplicação dos testes de suscetibilidade para leveduras está mais adiantada, em relação aos indicados para fungos filamentosos e dois métodos reconhecidos como referência, que apresentam reprodutibilidade intra e inter-laboratorial, são: o do instituto norte-americano *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, ex-NCCLS, *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) e o do comitê europeu *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST). O método europeu teve como base o norte-americano, mas, difere em alguns pontos. O documento do método norte-americano descreve a técnica de diluição em meio líquido, macrodiluição em tubos de ensaio e microdiluição em placas de microtitulação, para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de distintos antifúngicos.

Um dos pontos mais relevantes é a diluição e armazenamento adequado dos fármacos que devem ser adquiridos sob forma de pó p.a. e nunca formuladas para uso clínico. O solvente para fluconazol é a água destilada estéril e, para os demais fármacos, usa-se solvente orgânico dimetil sulfóxido (DMSO). A seguir, as concentrações preparadas de cada

droga devem ser usadas de imediato ou distribuídas em placas de microtitulação onde será realizada a reação. As placas podem ser lacradas e armazenadas sob temperatura abaixo de 70°C, por período de até 6 meses, o que facilita muito o trabalho laboratorial. Outro ponto frágil deste método é a concentração e homogeneidade do inóculo que pode levar a erros graves que interferem sobremaneira no resultado. O documento M38-A2 (CLSI, 2008), dessa maneira, foi publicado após avaliação de todos os parâmetros laboratoriais, porém, a correlação “*in vitro e in vivo*” não foi realizada em humanos, apenas com animais de laboratório.

No documento M38-A2, uma série de medidas é citada e devem ser seguidas de modo rigoroso, pois, de outro modo pode haver influência drástica nos resultados. Em testes de suscetibilidade a fármacos, são utilizadas cepas-controle de origem *American Type Culture Collection* (ATCC) para as quais os valores de MICs são pré-estabelecidos, de modo a validar o teste. Isto é necessário, pois o teste tem vários pontos críticos, sendo o primeiro deles a pureza da amostra a ser analisada. A certeza da ausência de contaminação bacteriana e inexistência de mais de uma espécie na amostra a ser analisada é fundamental para obtenção de resultados acurados. Neste estudo a fase de purificação das culturas obtidas das amostras ungueais foi cuidadosa e extensa, demandando longos períodos de trabalho. Os pontos críticos do método que influenciam sobremaneira os resultados estão relacionados ao preparo dos inóculos a serem avaliados frente aos antifúngicos. Os fungos filamentosos crescem, em geral, entre 3 e 17 dias e apresentam esporos com diversas formas e tamanhos, conforme a espécie e gênero e, esses foram os aspectos considerados essenciais para boa reprodutibilidade e acurácia dos resultados. Para a realização do teste, o fungo deve ser cultivado em meio de ágar batata-dextrose para indução de conídios. O tempo de crescimento e temperatura de incubação foi variável, de acordo com o tipo (dermatófitos ou FFND) e gênero. Para a preparação do inóculo o método recomenda cobrir as colônias com solução salina estéril para a retirada dos esporos e ajustar a suspensão de modo a resultar em concentração de  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times$

$10^4$  ufc/mL de meio RPMI 1640. Entretanto, a densidade óptica (DO) a 530nm, requerida no ensaio, depende do tamanho dos conídios do fungo em estudo (CLSI, 2008). Como os agentes de onicomicoses, neste estudo pertenciam a classes distintas, a quantificação do inóculo foi processada para determinar o número viável de unidades formadoras de colônias presentes no inóculo dos testes de suscetibilidade. O armazenamento, à temperatura de 80 graus negativos, das placas contendo os antifúngicos facilitou, sobremaneira a execução dos testes após o seu descongelamento, distribui-se os inóculos, como detalhado no documento M28-A2. A leitura da reação de inibição do crescimento dos inóculos pelas distintas concentrações de cada fármaco foi realizada a olho "nu" para facilitar a leitura, adaptou-se a placa a um suporte sobre um espelho para melhor observação da turbidez, significando crescimento. Valores de 0 a 4 são atribuídos de acordo com o grau de inibição, considerando a seguinte equivalência: 0 = oticamente claro, significando inibição total de crescimento, 1 = levemente turvo, 2 = redução proeminente da turvação, 3 = leve redução da turvação, 4 = ausência de inibição.

Testes com terbinafina apresentam ponto final de reação pouco definido e a leitura de MIC corresponde a 80% de inibição (ou mais), em relação ao verificado no orifício usado para controle de crescimento (CLSI, 2008); do mesmo modo, testes com fluconazol frente a dermatófitos a leitura de MIC é em 80% de inibição e frente a FFND é em 50% (ou mais) de inibição, o que requer treinamento intenso antes da execução do teste. Por outro lado, as leituras das provas com itraconazol é menos difícil pois a inibição é de 100% do crescimento, portanto, compara-se com o controle negativo (orifício contendo apenas meio de cultura (RMPI-1640). O critério de leitura em porcentagem de inibição, minimiza o erro decorrente do fenômeno de *trailing*, ou crescimento residual. Na vigência deste fenômeno a turbidez, significando crescimento do isolado em uma, ou mais, concentrações do fármaco acima do MIC. Caso este fenômeno ocorra, o laboratorista será induzido ao erro de considerar um valor mais alto de MIC, informando menor sensibilidade da amostra avaliada e, conforme o valor



informado isso pode significar resultado falso-positivo de amostra resistente (CLSI, 2008, EUCAST, 2008).

Pelo exposto, nota-se que inúmeros fatores podem interferir na qualidade e execução dos testes de suscetibilidade e os critérios de leitura e interpretação dos resultados ainda estão por serem definidos. Pode-se concluir que os resultados devem ser avaliados com muita cautela, pois os dados relacionados a casos humanos ainda são insuficientes; esses testes, quando comparados aos realizados com leveduras, ainda apresentam limitações. De qualquer modo, existem alguns estudos descrevendo a suscetibilidade a novos antifúngicos em relação aos tradicionais frente a agentes de infecções cutâneas e invasivas. Em geral, os fungos filamentosos não são suscetíveis ao fluconazol e os MICs são superiores a 64µg/mL. Também para itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol foram verificados que o MIC é bem variado, entre 0,03 a 16µg/mL. No entanto, para itraconazol, MIC acima de 8 µg/mL, obtido com leitura após 48 horas de incubação, foi associado com resistência clínica; da mesma forma que ocorre com cetoconazol, ainda não há correlação entre MIC e resultado de tratamento. Em relação ao voriconazol e posaconazol, não existem dados disponíveis que relacionem MIC e eficácia terapêutica; entretanto, alguns isolados mutantes para MIC para itraconazol, foram também associados a elevados valores de MIC para voriconazol e/ou para posaconazol. Desse modo, resistência cruzada entre essas itraconazol e estes dois novos fármacos deve ser levada em consideração.

Além da baixa suscetibilidade dos agentes etiológicos aos fármacos usados, as causas para a dificuldade de tratamento das onicomicoses são várias. Destacam-se a falta de aderência do paciente ao tratamento, toxicidade de fármacos via oral, baixa penetração de fármacos tópicos e demora em reposição de unhas saudáveis. As unhas da mão crescem em taxa de 2mm a 3mm por mês e as do pé em taxa de 1mm por mês. Entretanto, são necessários cerca de 6 meses para a reposição total das unhas da mão e cerca de 12 a 18 meses para as unhas do pé (Elewski, 2005).

O avanço dos agentes antifúngicos sistêmicos na prática medica fez com que passasse a ser importante definir sua eficácia, toxicidade e suas interações com outros fármacos. A opção mais ampla de preparações farmacêuticas em suas formas diversas por cremes, loções, pomadas, supositórios, linimentos, loções, comprimidos, cápsulas, soluções injetáveis, óvulos vaginais - complicou o processo de seleção para o clínico e, em virtude dos novos azóis, vendidos sem prescrição médica, também para o paciente, em virtude das inúmeras interações medicamentosas que podem existir entre antifúngicos e outras classes de medicamentos amplamente difundidos na sociedade leiga (Goodman e Gilman, 1999; Lacaz *et al.*, 2002). A escolha da melhor medicação depende da extensão da lesão. Os tratamentos tópicos são válidos se grandes áreas das unhas não estiverem afetadas. A decisão terapêutica, também, depende do agente patológico identificado pela cultura e/ou exame direto, mas existe uma dificuldade generalizada em tratar onicomicose, pois esta se revela como um grande desafio, tanto para o micologista como para o clinico. Os fungos são difíceis de erradicar, em virtude da queratina, muito densa, que participa da estrutura da unha. Há, ainda, pouca vascularização, explicando, assim, a pouca penetração dos medicamentos por via sistêmica, bem como o crescimento lento das unhas: 5 a 6 meses para as unhas das mãos e 12 a 18 meses para as dos pés (Sidrim & Rocha, 2004).

O tratamento das infecções ungueais por fungos tem gerado muitos gastos aos sistemas de saúde. Alguns autores consideram essa infecção a micose superficial de mais difícil tratamento, e, mesmo nos casos em que a medicação é adequada ao agente etiológico identificado, nem sempre se obtém cura, sendo freqüentes as recidivas da doença (Armstrong, 2000). Recidivas e resistência clínica ao tratamento das onicomicoses são observadas com freqüência, podendo ter relação com a menor suscetibilidade *in vitro* do agente etiológico ao medicamento utilizado (Favre *et al.*, 2003). Em vista do relatado, nota-se que as onicomicoses são freqüentes, de etiologia variada e difícil tratamento. A cronicidade das lesões, a característica de quadro recidivante, podendo levar à perda de

acuidade sensorial, além de problemas estéticos, fazem da onicomicose um problema de saúde pública. Poucos estudos estudaram população de hospital das forças armadas e, desde que, as condições de trabalho e hábitos de vestimenta são específicas desse grupo, é importante descrever os agentes etiológicos e perfil de suscetibilidade a antifúngicos dos agentes das onicomicoses nesse seguimento de pacientes, para dar subsídio a tratamentos empíricos e monitoramento de tendências na etiologia desses processos.

## 6. CONCLUSÕES

- Taxa alta de onicomicose (68%) foi observada em um grupo de 80 pacientes adultos com lesões ungueais, em serviço médico ambulatorial de hospital público da aeronáutica amostrada, indicando a necessidade de uma rotina de exames micológicos nessa população; o isolamento em cultura, dos agentes etiológicos das infecções, permitiu maior número de diagnósticos do que o exame micológico direto das amostras biológicas, ressaltando-se a importância desse procedimento como apoio ao diagnóstico das onicomicoses; ainda sob uso de medicação antifúngica anterior (34%) incluindo itraconazol, fluconazol e isoconazol, o diagnóstico micológico foi realizado por cultura; uma, ou mais, doenças associadas à onicomicose, foram relatadas, entre elas: hipertensão e diabetes que poderiam explicar tal taxa de onicomicose, além do uso de coturnos que favorecem a onicomicose podal, desde que a forma distal foi o tipo mais frequente;

- O gênero masculino foi prevalente, assim como, a faixa etária dessa população (18 a 69 anos), dados que devem refletir, somente, a distribuição de gênero na população militar;

- O tempo de lesão da onicomicose foi, em geral, longo indicando a demora para o diagnóstico micológico e caracterizando a cronicidade da lesão, possivelmente, também, pela grande frequência de *T. rubrum*, espécie reconhecidamente antropofílica e menos sensível a antifúngicos;

- A identificação molecular permitiu diagnóstico etiológico acurado para espécies de dermatófitos, contribuindo, assim, para melhor detalhamento epidemiológico das onicomicoses no grupo estudado e dando subsídios para tratamento mais específico dos quadros; de outro modo, a técnica de MALDI-TOF como realizada neste estudo não contribuiu para a elucidação diagnóstica das onicomicoses;

- A distribuição das espécies de fungos filamentosos agentes de onicomicoses em confirmou prevalência de dermatófitos, com *T. rubrum* (44%), seguido de *T. interdigitale* (38%) e *M. gypseum* (6%), confirmando a etiologia de onicomicoses descrita na literatura para outros grupos populacionais;

- Fungos filamentosos não dermatófitos tiveram participação relevante no processo de onicomicoses da população militar, incluindo os gêneros mais comumente descritos, *Fusarium solani* e *Scytalidium* spp. (2%, cada);

- Foi surpreendente o encontro de alta taxa de isolados de *Chaetomium globosum* (8%) como agente etiológico de onicomicose em população militar da aeronáutica, estimulando desenvolvimento de estudos que busquem a relação entre essa espécie rara em onicomicoses e fatores de risco para tal ocorrência;

- Dado o encontro de 12% de fungos filamentosos não dermatófitos na população analisada, não é recomendável o tratamento empírico com fluconazol, mas sim o exame micológico acurado para terapia adequada; além disso, o perfil dos agentes de onicomicoses aos fármacos antifúngicos fluconazol, terbinafina e itraconazol indicou maior suscetibilidade a terbinafina e itraconazol, sendo menor ao fluconazol, em concordância a dados de literatura; a terapia empírica com fluconazol não seria indicada para a população do estudo, tendo em vista os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* que indicaram maior atividade de terbinafina e itraconazol;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, A. I. H. (2007). Análise químico-farmacológico de estabilidade do voriconazol. Tese de doutorado, UFRGS, Porto Alegre

Ahmed R, Kharal SA, Durrani MA, Sabir M, Chang AH, Fakharuddin. Frequency of Candida in onychomycosis J Pak Med Assoc. 2013;63(3)350-3.

Alvarez MI, González LA, Castro LA. Onychomycosis in Cali, Colombia. Mycopathologia 2004; 158: 181 – 186.

Aquino VR, Constante CC, Bakos L., Freqüência das dermatofitoses em exames micológicos em hospital geral de Porto Alegre, Brasil, An Bras Dermatol, 2007, 82(3): 239-44.

Araújo AJG, Bastos OMP, Souza MAJS. Oliveira JC. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. An. Bras. Dermatol 2003b; 78 (4): 445 – 455

Araújo AJG, Souza MAJ, Bastos OMP, Oliveira JC. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. An Bras Dermatol. 2003;78:445-55.

Armstrong, J.D.; Kuns, B.A. Photoreactivation implicates cyclobutane dimers as the major promutagenic UVB lesions in yeast. Mutat Res 2000; 268:83-94

Ausma, J.; Pennick, G.; Bohets, H.; Velde, V. van de; Borgers, M; Fothergill, A. Absence of an active metabolite for the triazole antifungal pramiconazole. Acta Derm Venereol 2007; 87:22-26.

Avner, S.; NIR, N.; Henri, T. Combination of oral terbinafine and topical ciclopirox compared to oral terbinafine for the treatment of onychomycosis. J Dermatol Treatment 2006; 16:327-330.

Baran R, Kaoukhov A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: na overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. JEADV 2005;19: 21 – 29

Bassiri-Jahromi S, Khaksar AA. Nondermatophytic moulds as a causative agente of onychomycosis in Tehran. *Indian J Dermatol.* 2010; 55 (2): 140-143.

Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One.* 2011;6(1):e16424.

Bonifaz A, Rios-Yuil JM, Arenas R, Araiza J, Fernández R, Mercadillo-Pérez P, Ponce-Oliveira RM. Comparison of direct microscopy, culture and calcofluor White for the diagnosis of onychomycosis. *REV iberoam Micol.* 2013;30(2):109-111.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. CBM: Compêndio de Bulas de Medicamentos vol. 1 e 2. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

Brilhante RSN, Paixao GC, Salvino LK, Diogenes MJ, Bandeira SP, Rocha MFG, *et al.* Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patogeno emergente da *Tinea capitis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;3:417-25.

Brilhante RS, Cordeiro RA, Rocha MF, Monteiro AJ, Meireles TE, Sidrim JJ. *Tinea capitis* in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brazil: on role of *Trichophyton tonsurans*. *Int J Dermatol.* 2004;43:575-9.

Calado NB, Souza F Jr, Gomes NO, Cardoso FR, Zaror LC, Milan EP. *Fusarium* nail and skin infection: a report of eight cases from Natal, Brazil. *Mycopathologia.* 2006;161:27-31.

Carillo-Muñoz, A J, Giusiano G, Cárdenes D, Hernández-Molina J M, Eraso E, Quindós G, Guarro J. Terbinafine susceptibility patterns for onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *International journal of antimicrobial agents* 2008;31(6):540-543.

Chimelli PAV, Sofiatti AA, Nunes RS, Martins J. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2003;45:259-263.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard — Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008

Costa, T.R.; Costa, M.R.; Silva, M.R.R.; Silva, M.V.; Rodrigues, A.B.; Fernandes, O.D.L.; Soares, A.J.; Silva, M.J. Etiologia e epidemiologia das dermatofitoses em Goiânia-Go. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999; 32:367-371.

Costa, M.; Passos, X.S.; Souza, L.K.H.; Miranda, A. T. B.; Lemos, J. A.; Júnior, J. G. O., And Silva, M. R. R. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35(1): 19-22, jan-fev.

Cursi IB, Freitas LB, Neves Mde L, Silva IC. Onychomycosis due to *Scytalidium* spp.: a clinical and epidemiologic study at a University Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *An Bras Dermatol*. 2011 Jul-Aug;86(4):689-93.

De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 4nd edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands & Universitat Rovira i Virgili, Reus): Spain; 2000

Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. *Anais Bras Dermatol*. 2005; 80:591-594.

Eisman S, Sinclair R. Fungal nail infection: diagnosis and management. *BMJ: British Medical Journal*, 2014;348:1800.

El Sayed F, Ammouy A, Haybe RF, Dhaybi R. Onychomycosis in Lebanon: a mycological survey of 772 patients. *Mycoses*. 2006 May;49(3):216-9.

Elewski B, Tavakkol A. Safety and tolerability of oral antifungal agents in the treatment of fungal nail disease: a proven reality. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2005; 1 (4): 299 – 306).

Erhard M, Hipler UC, Burmester A, Brakhage AA, Wöstemeyer J. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea



pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Experimental Dermatology* 2008; 17:356-361.

Faergemann, J.; Baran, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *Br. J. Dermatol.*, 149(s65):1-4, 2003.

Finch, J.J.; marshaw, E.M. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. *Dermatol Therapy* 2007; 20:31-46.

Favre B, Hofbauer B, Hildering K, Ryder NS. Comparison of in vitro activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4817-9.

Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R *et al.* 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.

Gianni C, Cerri A, Crosti C. Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. *Mycoses* 2000; 43: 29 – 33.

Goodman, L.S.; Gilman, A. (Eds); Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1999. p. 864-875.

Gupta AK, Cooper EA, MacDonald P, Summerbell RC. Utility of inoculum counting (Walshe and English criteria) in clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. *J Clin Microbiol.*2001; 39:2115-2,

Gupta AK, Ryder JE, Summerbell RC. The diagnosis of nondermatophyte mold onychomycosis. *Int J Dermatol.* 2003;42:272-3.

Hamdan, J.S.; Hahn, R.C. Antifungal drugs for systemic mycosis: an overview of mechanism of action and resistance. *Anti-infective agents in medicinal chemistry* 2006; 5:403-412.

Hattori N, Shirai A, Sugiura Y, Li W, Yokoyama K, Misawa Y, Okuzumi K, Tamaki K. Onychomycosis caused by *Fusarium proliferatum*. *British Journal of Dermatology*,2005;153:647 – 649.

Hay RJ, Baran R. Onychomycosis: a proposed revision of the clinical classification. *J Am Acad Dermatol*. 65:1219-27, 2011.

Henry JB. *Diagnostico Clinico e Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 19ª edição. Rio de Janeiro: Manole; 1999.

Kemna ASCP, Elewski BE. A U.S. epidemiologic survey of superficial fungal diseases. *J Am Acad Dermatol*. 35:539-42, 1996.

Kuvandik G, Cetin M, Genctoy G, Horoz M, Duru M, Akcali C, Satar S, Kiykim AA, Kaya H. The prevalence, epidemiology and risk factors for onychomycosis in hemodialysis patients. *BMC Infect Dis*.2007; 30;7:102.

Lacaz CS, Porto E, Melo NT. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse medico*. 1ª edição. São Paulo: Savier; 1998.

Lacaz CS. *Tratado de micologia médica*. 9ª edição. São Paulo: Sarvier; 2002

Lima KM, Delgado M, Castro CMMB. Espécies e suscetibilidade antifúngica in vitro de leveduras isoladas em unha de pacientes com vírus da imunodeficiência humana. *Rev Ciênc Méd. Campinas*. 2009;18(2):89-97.

Lubeck DP, Patrick DL, McNulty, Fifer SK, Birnbaum J. Quality of life of persons with onychomycosis. *Qual Life Res*. 1993;2:341–348.

MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 13:788-799, 2013.

Maraki S, Tselentis Y. Dermatophytoses in Crete, Greece,.*Mycoses Mar*; 2007;41(3-4): 175-178.

Marques AS, Camargo RMP, Fares AHG, Takashi RM, Stolf HO. *Tinea capitis*: epidemiologia e ecologia dos casos observados entre 1983 e 2003

na Faculdade de Medicina de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. An Bras Dermatol. 2005;80:597-602

Martelozo IC, Guilhermetti E, Svidzinski TIE. Ocorrência de onicomicose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. Acta Sci. Health Sci. Maringá: 2005; 27(2):177-182.

Martínez E, Ameen M, Tejada D, Arenas R. *Microsporum* spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. Braz J Infect Dis. 2014 Mar-Apr;18(2):181-6.

Martins EA, Guerrer LV, Cunha KC, Soares MMCN, Almeida MTG. Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. Rev Soc Bras Med Trop 2007, 40(5):596-598.

Mendes-Giannini MJ, Melhem MSC. FUNGOS *In*: Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001.

Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Velásquez-Hernández V, Millan-Chiu B, Hernández-Hernández F, Mondragón-González R. Resistência a compostos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp. Rev Iberoam Mico. 2007; 24:320-322.

Mezzari A. Frequency of dermatophytes in the metropolitan Area of Porto Alegre, RS, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1998 Mar; 40(2): 71-76.

Oliveira JAA, Barros JA, Cortez ACA, Oliveira JSRL. Superficial mycoses in the City of Manaus/AM between March and November/2003. An Bras Dermatol. 2006;81(3):238-43.

Organização Mundial de Saúde (2005) Epidemiology and management of common skin diseases in children in developing countries. Department of Child and Adolescent Health and Development. 54 p. Department of Child and Adolescent Health and Development. WHO reference number WHO/FCH/CAH/05.12.54 WHO reference number WHO/FCH/CAH/05.12.

Peres NTA, Sanches PR, Falcão JP, Silveira HCS, Paião FG, Maranhão FCA. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in

response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. BMC Microbiol.10:39, 2010.

Pontarelli LN, Hasse J, Galindo CC, Coelho MPP, Nappi BP, Ivo-Dos-Santos, J. Onychomycosis by *Scytalidium dimidiatum*: report of two cases in Santa Catarina, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo. 2005;47(6):351-353.

Roberts DT, Evans EGV, Allen R. Fungal nail disease. London, England: Gower Medical Publishing; 1990. P. 86.

Roberts DT. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: results of an omnibus survey. Br J Dermatol 1992 Feb; 126 Suppl. 39: 23-7.

Saenz, F. J. Identificación de hongos dermatófitos. España, Revista Iberoamericana de Micología 2001; 1-11.

Santos J, Coelho MPP, Nappi BP. Dermatophytosis laboratorial diagnosis, RBAC, vol. 34(1): 3-6, 2002.

Santos DA, Hamdan JS. In vitro antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes, Medical Mycology 2004; 44(4): 357 – 362.

Schechtman, RC. Nondermatophytic Filamentous Fungi Infection in South America: Reality or Misdiagnosis. Dermatol Clin 2008;26:271-283.

Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. Mycopathologia. 2008; 166: 335-52.

Shenoy MM, Teerthanath S, Kanarker V K, Girisha B S, Krishna P M S, Comparison of potassium hydroxide mount and mycological culture with histopathologic examination using periodic acid- Schiff staining of the nail clippings in the diagnosis of onychomycosis. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2008;74(3):226-229.

Sidrim JJ, Rocha M. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 12:107-131.

Siqueira ER, Ferreira JC, Maffei CM, Candido RC. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. Rev Soc Bras Med Trop. 2006. 39:269-7.

Summerbell RC, Cooper E, Bunn U, Jamieson F, Gupta AK. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. Med Mycol. 2005 Feb;43(1):39-59.

Tamura T, Asahara M, Yamamoto M, Yamaura M, Matsumura M, Goto K,. In vitro susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dematophytes. Microbiol Immunol 2014;58:1-8.

Thappa, D.M. Current treatment of onychomycosis. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2007; 73(6):373-376.

Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases Journal of the American Academy of Dermatology.2000;42:217-224.

Weitzman I, Summerbell RC. The Dermathophytes. Clin. Microbiol.Rev., 1995; 8:240-259.

Xavier APM, Carvalhaes de Oliveira J, Ribeiro VLS, Souza MAJ. Epidemiological aspects of patients with ungual and cutaneous lesions caused by *Scytalidium* spp. Na Bras Dermatol.2010; 85 (6):805 – 810.

Yamazaki H, Nakamoto M, Shimizu M, Murayama N, Niwa T. Potential impact of cytochrome P450 3A5 in human liver on drug interactions with triazoles. Br J Clin Pharmacol. 2010 Jun;69(6):593-7

Zaias N, Tosti A, Rebell G. Autosomal dominant pattern of distal subungual onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*.J Am Acad Dermatol 1996; 34: 302–4.

Zaitz, Clarisse, 2 ed - Compêndio de micologia médica Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010.

Zanardi D. Nunes DH, Pacheco AS, Tubone MQ, De Souza Filho JJ. Evaluation of the diagnostic methods of onychomycosis. An. Bras. Dermatol 2008; 83(2): 119 – 124.

**Apêndice 1. Características dos pacientes com lesões ungueais e resultado de exame micológico direto**

<b>Caso</b>	<b>Local da lesão</b>	<b>Micológico Direto</b>	<b>Doença relacionada</b>	<b>1ª coleta</b>	<b>Uso de medicamento</b>	<b>Tempo de lesão</b>
1	Unha pé distal	+	Não	sim	não	3 anos
2	Pé- distal	Negativo	Não	não	não	6meses
3	Pé- proximal	Negativo	Não	sim	não	4 meses
4	Pé-distal	+	Hipertensão	sim	não	NR
5	Pé-distal	+	Não	sim	Itraconazol	1ano
6	Pé-distal	Negativo	Não	sim	não	6mese
7	Pé-distal	Negativo	Hipertireiodismo	sim	Tiroxina	10 anos
8	Pé-distal	+	Hipertensão e Diabetes	sim	Captopril e glibenclamida	NR
9	Pé-distal	+	Não	sim	não	NR
10	Mão	Negativo	Não	não	não	NR
11	Pé- distal	+	Diabetes	não	glibenclamida	7meses
12	Pé-distal	+	Não	sim	Isoconazol	5meses
13	Pé-distal	Negativo	Hipercolesterolemia	sim	Sinvastatina / Anlodipina	6meses
14	Pé-distal	Negativo	Não	sim	fluconazol	7meses
15	Pé-distal	+	Não	não	Não	1ano
16	Pé-distal	Negativo	Hipercolesterolemia	sim	sinvastatina	7meses
17	Pé- superficial	Negativo	Hipertensão/ hipercolesterolemia	não	Sinvastatina/captopril	2 anos
18	Pé- proximal	Negativo	Hipertensão	sim	captopril	NR
19	Mão	Negativo	Não	sim	não	9meses
20	Pé distal	+	Não	sim	não	5mese
21	Pé	+	Não	sim	não	NR

	proximal					
22	Pé distal	+	Não	não	não	NR
23	Pé distal	Negativo	Não	sim	Não	8meses
24	Pé superficial	+	Não	sim	não	6mese
25	Pé distal	+	Diabete	sim	Insulina	1ano
26	Pé distal	Negativo	Não	sim	não	NR
27	Pé distal	Negativo	Não	sim	não	NR
28	Pé distal	Negativo	Diabetes	não	glibenclamda	2anos
29	Mão	+	Não	sim	não	9meses
30	Mão	Negativo	Não	sim	não	4meses
31	Pé distal	Negativo	Não	sim	Não	NR
32	Pé distal	+	Diabetes / Hipertensão	sim	Atenolol/insulina	1ano
33	Pé-distal	+	Não	sim	não	2anos
34	Pé-distal	Negativo	Não	sim	não	4meses
35	Pé-distal	+	Hipertensão	sim	Não	1 mês
36	Pé-distal	Negativo	Não	sim	Antiinflamatório	NR
37	Pé-distal	Negativo	Não	sim	Não	NR
38	Pé-distal	+	Não	sim	Não	NR
39	Pé-distal	+	Diabetes	sim	fluconazol	NR
40	Pé-distal	Negativo	Diabetes	sim	Glibenclamida	8meses
41	Pé-distal	Negativo	Hipertensão / Hipercolesterolemia	não	Atenolol/sinvastatina	2anos
42	Pé-distal	Negativo	Diabetes	não	Insulina	1ano e meio
43	Pé-distal	Negativo	Não	sim	Não	NR
44	Pé-distal	Negativo	Diabetes	sim	Não	NR
45	MÃO	+	Diabetes	Sim	Sim	3 anos
46	Pé-distal	Negativo	Não	Não	Não	NR
47	Mão	+	Não	sim	Não	7meses
48	Mão	Negativo	Hipercolesterolemia	sim	Não	4meses
49	Pé-distal	+	Não	Não	Não	1 ano



50	Pé	+	Não	Não	Não	NR
----	----	---	-----	-----	-----	----

NR, não relatado; +, positivo; -, negativo

**Apêndice 2. Resultados de Identificação Fenotípica e Identificação (id) por Sequenciamento da Região ITS1-ITS4 de 50 Agentes de Onicomicoses em População Militar da Aeronáutica**

Nº	ng/µL	260/280	Identificação fenotípica	Identificação por sequenciamento ITS1-4
1	54,9	1,59	Não realizado	<i>Chaetomium globosum</i>
2	41,4	2,06	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
3	91,1	2,04	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
4	76,5	2,00	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
5	62,9	1,78	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
6	75,3	1,79	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
7	231,7	1,27	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
8	237,6	1,52	Não realizado	<i>Chaetomium globosum</i>
9	28,6	1,70	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
10	369,0	1,33	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
11	57,9	1,34	<i>Trichophyton rubrum</i>	Não realizado
12	63,4	1,41	Não realizado	<i>Chaetomium globosum</i>
13	76,8	1,95	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
14	59,5	1,30	<i>Trichophyton rubrum</i>	Não realizado
15	60,4	1,52	Não realizado	<i>Chaetomium globosum</i>
16	117,9	1,60	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
17	161,9	1,08	<i>Trichophyton rubrum</i>	Não realizado
18	55,9	1,81	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>

19	47,7	1,40	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
20	81,8	1,73	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
21	61,7	1,91	Não realizado	<b><i>Scytalidium hyalinum</i></b> <b><i>neoscytalidium</i></b>
22	161,4	1,37	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
23	271,4	1,28	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
24	114,1	1,41	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
25	163,0	1,35	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
26	60,8	1,04	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
27	42,3	1,56	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
28	106,0	1,74	<b><i>Trichophytonmentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
29	329,4	1,46	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>
30	70,2	1,89	<b><i>Trichophytonmentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
31	129,5	1,63	<b><i>Trichophytonmentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
32	99,4	1,66	<b><i>Trichophytonmentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
33	51,2	1,60	<b><i>Trichophytonmentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
34	39,6	1,04	<b><i>Microsporum gypseum</i></b>	Não realizado
35	85,0	1,20	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
36	398,5	1,08	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
37	147,3	1,54	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
38	31,9	1,85	<b><i>Microsporum gypseum</i></b>	<b><i>Microsporum gypseum</i></b>
39	77,6	1,38	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
40	88,4	1,30	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
41	170,2	1,27	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
42	96,3	1,51	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>
43	67,2	1,02	<b><i>Trichophytonmentagrophytes</i></b>	<b><i>Trichophyton interdigitale</i></b>

44	121,7	1,47	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
45	118,6	1,17	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
46	32,3	1,87	Não realizado	<b><i>Fusarium solani</i></b>
47	105,7	2,25	<b><i>Microsporium gypseum</i></b>	<b><i>Microsporium gypseum</i></b>
48	84,1	1,35	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
49	29,7	1,41	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado
50	91,1	1,03	<b><i>Trichophyton rubrum</i></b>	Não realizado

Nº, número do isolado; ng/ $\mu$ L e 260/280, relação das concentrações DNA e proteína após extração; id, identificação.

## **Anexo 1 . Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Prezado (a) Sr. (Sra.),

Sou a farmacêutica e bioquímica, Larissa Lopes Milane Bentine, aluna do Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde. Estou realizando uma pesquisa sob orientação da Dra. Marcia S.C.Melhem do Instituto Adolfo Lutz cujo objetivo é avaliar a causa das micoses de unhas com o propósito de analisar a incidência de casos, determinar os agentes da infecção podendo levar à mudança da terapia medicamentosa.

Sua participação envolve a permissão de analisar o resultado do exame realizado através do método de exame direto nas lesões das unhas. Não haverá risco adicional ou sofrimento adicional ao procedimento usual para essa coleta. Quando o médico indicar a colheita do material, será agendada com você a data da coleta a qual será realizada em lugar reservado por profissionais treinados e com material descartável. Esse material será analisado, onde será identificado o micro-organismo responsável pela infecção, pelos exames clássicos, como exame micológico direto e cultura e, a seguir, o micro-organismo será armazenado para ser utilizado em pesquisas futuras.

A participação nesse estudo é voluntária e se você decidir não participar tem absoluta liberdade de fazê-lo sem qualquer prejuízo das suas atividades. Como benefício direto, você poderá ter a alteração do esquema terapêutico, visando uma adequada conduta terapêutica, caso você tenha uma resistência aos antifúngicos. E como benefício indireto a população atendida nesse hospital terá como rotina os exames de resistência aos antifúngicos.

Na publicação dos resultados desta pesquisa, sua identidade será mantida no mais rigoroso sigilo. Serão omitidas todas as informações que permitam identificá-lo (a) e você estará contribuindo para a produção de conhecimento científico.

Qualquer dúvida relativa à pesquisa poderá ser esclarecida pela pesquisadora 1º Tenente Farmacêutica Larissa Lopes Milane Bentine, no telefone: (11)98207-4402 ou no Comitê de Ética em Pesquisa no telefone (11) 3068-2859. Agradeço sua atenção, atenciosamente.

Consinto em participar deste estudo e declaro ter recebido uma cópia deste termo de consentimento.

Nome:.....

Data:.....

Assinatura: .....

## Anexo 2. Autorização para Coleta de Dados



**MINISTÉRIO DA DEFESA  
COMANDO DA AERONÁUTICA  
NÚCLEO DO HOSPITAL DE FORÇA AÉREA DE SÃO PAULO**

São Paulo, 9 de março de 2015.

Do: Chefe da DFAR  
Ao: Instituto Adolfo Lutz

Assunto: Autorização para Coleta de dados

Autorizo a 1º Ten QOCON Farm Larissa Lopes Milane Bentine, realizar a coleta de dados relativa aos exames micológicos, para o projeto de mestrado: *Dermatófitos como agentes de onicomicoses em população adulta de serviço ambulatorial do Hospital de Aeronáutica de São Paulo, Brasil.*

João Vicente de Oliveira – Ten Cel Farm  
Chefe da DFAR

João Vicente de Oliveira  
Ten. Cel Farm - AER  
CRF-SP 14 906  
CHEFE DA DIVISÃO DE FARM

## Anexo 3. Termos de Aprovação nos Comitês de Ética

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Dermatôfitos como agentes de onicomicoses em população adulta de serviço ambulatorial do Hospital de Aeronáutica de São Paulo, na cidade de São Paulo, Brasil

**Pesquisador:** MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 43301015.6.0000.0059

**Instituição Proponente:** Instituto Adolfo Lutz

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.203.991

#### **Apresentação do Projeto:**

Idem ao parecer substanciado do CEPIAL de 24 de abril de 2015.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Idem ao parecer substanciado do CEPIAL de 24 de abril de 2015.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Idem ao parecer substanciado do CEPIAL de 24 de abril de 2015.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Análise ética com base no parecer substanciado do CEPIAL de 24 de abril de 2015 e respostas às pendências.

A pesquisadora responsável justificou o armazenamento do material biológico e informou que serão mantidos no Núcleo de Micologia do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz para identificação das culturas, e depois de terminado o estudo, os isolados serão enviados para armazenamento no Núcleo de Coleção de Micro-organismos do Centro de Procedimentos Interdisciplinares da mesma instituição.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.203.991

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Análise ética com base no parecer consubstanciado do CEPIAL de 24 de abril de 2015 e respostas às pendências.

Documentos apresentados e de acordo.

1. TCLE (documento adicionado durante a relatoria pela coordenadora do CEPIAL em 27/08/2015).  
A pesquisadora responsável revisou o texto contemplando as exigências das normas éticas, e considerou os benefícios aos participantes da pesquisa e, no futuro, aos usuários do Serviço Ambulatorial da Clínica de Dermatologia e Geriatria do Hospital da Aeronáutica de São Paulo.

2. Aprovação quanto ao mérito científico pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, corroborada pela diretoria geral da instituição.

**Recomendações:**

Nada a declarar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pesquisadora responsável respondeu satisfatoriamente todos os questionamentos apontados no parecer anterior, bem como revisou o protocolo de pesquisa, especificamente reformulando o documento "PB Informações Básicas do Projeto" na Plataforma Brasil, com esclarecimento do armazenamento do material biológico, e anexando os documentos complementares exigidos pelo CEPIAL.

Protocolo de pesquisa aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL com base nas deliberações da reunião ordinária de 20 de agosto de 2015.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90  
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br



Continuação do Parecer: 1.203.991

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	FOLHA DE ETICA DG IAL.jpg	18/03/2015 12:54:57		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_271683.pdf	18/03/2015 12:55:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	LARISSA TLCE 11ago2015.docx	11/08/2015 17:20:02		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Larissa Projeto a Plataforma Brasil 2015.doc	11/08/2015 17:25:18		Aceito
Outros	larissa ctc aprovacao.jpg	11/08/2015 17:55:13		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_271683.pdf	11/08/2015 17:57:19		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90  
 Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

SAO PAULO, 27 de Agosto de 2015

---

**Assinado por:**  
**Luz Marina Trujillo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90  
**Bairro:** Cerqueira César **CEP:** 01.246-902  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br