

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

Perfil de suscetibilidade antifúngica e fatores de virulência de
leveduras isoladas de onicomiose de pacientes atendidos no
Laboratório central do Estado do Pará (LACEN).

Susan Beatriz Batista de Oliveira

Belém-PA
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

Perfil de suscetibilidade antifúngica e fatores de virulência de
leveduras isoladas de onicomiose de pacientes atendidos no
Laboratório central do Estado do Pará (LACEN).

Susan Beatriz Batista de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, com área de concentração em Biologia Celular.

Belém-PA
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Oliveira, Susan Beatriz Batista, 1980-
Perfil de suscetibilidade antifúngica e
fatores de virulência de leveduras isoladas de
onicomicose de pacientes atendidos no
Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN) /
Susan Beatriz Batista Oliveira. - 2014.

Orientador: Claudio Guedes Salgado.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
do Pará, Instituto de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Unhas (Anatomia) Doenças. 2. Onicomicose.
3. Leveduras (Fungos). I. Título.
CDD 22. ed. 616.547

Susan Beatriz Batista de Oliveira

Perfil de suscetibilidade antifúngica e fatores de virulência de leveduras isoladas de onicomicose de pacientes atendidos no Laboratório central do Estado do Pará (LACEN).

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, com área de concentração em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Moises Batista da Silva

Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior

Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Universidade Federal do Pará

Belém-Pará
2014

“A menos que modifiquemos a nossa
maneira de pensar, não seremos capazes de
resolver os problemas causados pela forma como
nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, saúde, minha família, meus amigos e por me guiar nessa incrível tarefa chamada pós graduação.

A minha querida família, em especial a minha mãe, Maria do Carmo, por ser meu exemplo de luta, persistência, honestidade e amor.

Ao Prof. Dr. Claudio Salgado pela disponibilidade manifestada em orientar este trabalho, pelo apoio e partilha de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Moises Silva, pela atenção, disponibilidade e ensinamentos que ampliaram meu horizonte.

Aos amigos do Laboratório de Dermato-Imunologia, Heleno, Daniella, Tânia, Patrícia pelo apoio em diferentes momentos durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da seção de Bacteriologia e Micologia, do Laboratório Central do estado do Pará, que me auxiliaram para que este trabalho fosse executado.

Ao Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN-PA), onde realizei este trabalho.

As instituições Universidade Federal do Pará (UFPA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES).

LISTA DE FIGURAS

Figura 01-	Estrutura da unha. Partes constituintes da estrutura ungueal.....	12
Figura 02-	Classificação das onicomicose, segundo a localização do sítio de infecção: a) onicomicose subungueal distal; b) onicomicose subungueal proximal; c) onicomicose superficial branca; d) onicomicose distrófica total.....	13
Figura 03-	Exemplos de unhas alteradas cujos pacientes foram encaminhados ao LACEN para exame micológico direto e cultura.....	26
Figura 04-	Coleta do material ungueal. Raspado subungueal distal coletado para análise pelo exame micológico direto e semeio em meio de cultura.....	27
Figura 05-	Culturas isoladas de raspado ungueal. Crescimento de leveduras em meio de cultura agar sabouraud com cloranfenicol.....	28
Figura 06-	Processamento das amostras no instrumento Vitek 2. Tubos de poliestireno estéril contendo suspensões com turbidez de 1,8 - 2,2 no padrão de McFarland, cadastramento, carregamento e incubação das amostras para teste de identificação e antifúngico.....	29
Figura 07-	Caracterização dos fatores de virulência. Processamento das amostras para o teste de fosfolipase e proteinase.....	31
Figura 08-	Estruturas fúngicas visualizadas na microscopia direta (400x): a) Blastoconídios; b) Pseudohifa; c) Hifas com blastoconídios e d) Hifas hialinas septadas.....	33
Figura 09-	Atividade enzimática para fosfolipase.....	38
Figura 10-	Atividade enzimática para proteinase.....	39
Figura 11-	Espécies isoladas segundo a idade e gênero.....	41

LISTA DE TABELAS E GRÁFICO

Tabela 01-	Resultado Exame Micológico Direto.....	34
Tabela 02-	Resultado dos Valores positivos e negativos do Exame Micológico direto versus Cultura positiva e negativa.....	35
Tabela 03-	Espécies de <i>Candida</i> isoladas frente ao teste de suscetibilidade.....	37
Tabela 04-	Perfil de atividade enzimática de leveduras isoladas de acordo com PRICE <i>et al.</i> (1982).....	40
Gráfico 01-	Espécies de leveduras isoladas de onicomicoses.....	35

RESUMO

Introdução: Onicomicoses são infecções ungueais causadas por fungos, podendo ser causadas por dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos. O diagnóstico de leveduras como agente de onicomicose tem aumentado significativamente, tal evidência tem sido atribuída ao crescente número de indivíduos imunocomprometidos e transplantados, ao aumento do uso de drogas antibacterianas de amplo espectro, à fatores genéticos, tendências atópicas e ao aumento da vida média da população. O objetivo principal do trabalho foi determinar o perfil de suscetibilidade antifúngica e alguns dos fatores de virulência de leveduras causadoras de onicomicoses. **Métodos e Resultados:** Foram estudadas 100 amostras de raspado ungueal semeadas em Agar Sabouraud com cloranfenicol e em Agar Mycosel. A identificação e o teste de suscetibilidade antifúngica (fluconazol, anfotericina B, fluocitocina e voriconazol) foram realizados através do método automatizado Vitek 2 e visando a pesquisa dos fatores de virulência para detecção de fosfolipase e proteinase foram utilizados os meios com emulsão de ovo a 50% e o ágar BSA (Bovine Serum Albumin), respectivamente. Das 100 amostras coletadas, 57 (57%) foram positivas no exame micológico direto e 42 (42%) na cultura. Dos isolados, 29 (69%) eram *Candida parapsilosis*, 8 (19%) *C. albicans*, 3 (7,2%) *C. haemulonii*, 1 (2,38%) *C. lusitanea* e 1 (2,38%) *C. tropicalis*. Todas as espécies de *C. albicans*, *C. lusitanea* e *C. tropicalis* foram sensíveis aos antifúngicos. As espécies de *C. parapsilosis* apresentaram resistência em 6 (20,7%) cepas ao fluconazol, e em 3 (10,34%) ao voriconazol. *C. haemulonii* apresentou resistência em 1 (33,33%) cepa ao fluconazol, 1 (33,33%) a flucitosina, 1 (33,33%) ao voriconazol e 3 (100%) à anfotericina B. Os Fatores de resistência, fosfolipase e proteinase, estiveram presentes somente nas espécies de *C. albicans* com positividade de 87,5% e 50% respectivamente. **Conclusão:** A espécie *C. parapsilosis* é um agente emergente de onicomicose, apresentando cepas resistentes aos antifúngicos. *C. haemulonii* apresentou perfil multirresistente. *C. albicans*, ainda que sensível a todos os fármacos testados foi a única espécie que apresentou os fatores de virulência estudados.

Palavras-chave: Onicomicose, Suscetibilidade antifúngica, Fatores de virulência.

SUMÁRIO

CAPA.....	i
FOLHA DE ROSTO.....	ii
BANCA EXAMINADORA.....	iii
EPÍGRAFE.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS E GRÁFICO.....	vii
RESUMO.....	viii
SUMÁRIO.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 ESTRUTURAS DA UNHA.....	11
1.2 ONICOMICOSSES.....	12
1.3 AGENTES ETIOLÓGICOS DE ONICOMICOSSES.....	14
1.3.1 LEVEDURAS.....	14
1.3.2 DERMATÓFITOS.....	15
1.3.3 FUNGOS FILAMENTOSOS NÃO DERMATÓFITOS.....	16
1.4 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	17
1.5.1 FOSFOLIPASE.....	18
1.5.2 PROTEINASE.....	20
1.6 DIAGNÓSTICOS DAS ONICOMICOSSES.....	21
1.7 TRATAMENTO DAS ONICOMICOSSES.....	22
1.8 SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	22
1.9 MÉTODOS AUTOMATIZADOS DE IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA – SISTEMA VITEK 2 (BIOMÉRIEUX SA, MARCY L'ETOILE, FRANÇA).....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 AMOSTRAS.....	26

3.1.1 CRITÉRIO DE INCLUSÃO.....	26
3.1.2 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO.....	27
3.2 COLETA.....	27
3.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	28
3.3.1 EXAME MICOLÓGICO DIRETO.....	28
3.3.2 CULTURA.....	28
3.3.3 PROCEDIMENTO DO TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	29
3.3.4 PROCEDIMENTO DO TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	29
4. CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA.....	30
4.1 PRODUÇÃO DE FOSFOLIPASE.....	30
4.2 PRODUÇÃO DE PROTEINASE.....	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1 EXAME MICOLÓGICO DIRETO.....	33
5.2 CULTURA.....	34
5.3 RESULTADOS LIBERADOS NOS LAUDOS LABORATORIAIS.....	35
5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS.....	35
5.5 SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	36
5.6 PRODUÇÃO DE FOSFOLIPASE.....	38
5.7 PRODUÇÃO DE PROTEINASE.....	39
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	46
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	47

1. INTRODUÇÃO

As unhas são importantes para proteção das pontas dos dedos contra traumatismos assim como aumentam a sensibilidade táctil e melhoram a capacidade de manipular pequenos objetos (Fernández *et al.*, 2002).

Porém, a funcionalidade da unha pode ser comprometida por desordens na sua estrutura física, ocasionada por diversos distúrbios, sendo a infecção a causa mais comum. Infecções nas unhas são um grande problema em dermatologia clínica.

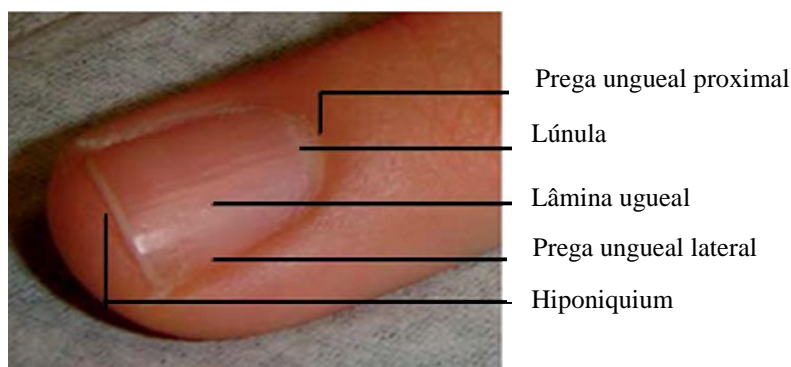
As infecções ungueais causadas por fungos são chamadas de onicomicoses, o número de casos novos tem aumentado gradativamente e a prevalência dessa infecção é variável e está sujeita à influência de diversos fatores como clima, hábitos culturais, região geográfica e fatores genéticos (Souza *et al.*, 2007).

Os fungos são os agentes mais comuns das infecções ungueais, em especial os dermatófitos e secundariamente as leveduras e os fungos filamentosos não dermatófitos (Midgley *et al.*, 1998). Espécies de fungos emergentes vêm sendo descritas como causadoras de onicomicoses, tornando necessário o desenvolvimento de novos estudos sobre o tema para a compreensão da prevalência e importância deste tipo de infecção (Araújo *et al.*, 2003).

1.1 ESTRUTURA DA UNHA

As unhas ocupam a superfície dorsal das falanges distais de quirodátilos e pododátilos e são constituídas por quatro epitélios especializados: a matriz ungueal, o leito ungueal, a prega ungueal (proximal e lateral) e o hiponíquium. A matriz é um epitélio germinativo cuja proliferação celular dá origem a uma estrutura de múltiplas camadas de células corneificadas que cobre o leito, denominada de lâmina ungueal. A lâmina ungueal é uma estrutura retangular, translúcida, cuja aparência rosada lhe é conferida pelos capilares presentes no leito ungueal. Na porção proximal da lâmina ungueal é visível a lúnula, uma estrutura opaca, esbranquiçada, em forma de semicírculo que corresponde à visualização da porção distal da matriz. A camada córnea da prega proximal forma a cutícula (Gomes *et al.*, 2012) (Figura 01).

Figura 01. Estrutura da unha. Partes constituintes da estrutura ungueal. Fonte: Gomes *et al.*, 2012.



O centro germinativo, também conhecido como matriz ungueal, é formado a partir de células epidérmicas que passam por um processo de diferenciação, sofrendo anucleação, achatamento, corneificação e finalmente a queratinização, ao final deste processo está formada a lâmina ungueal ou a unha propriamente dita. O crescimento médio diário é de 0,1mm e 3mm ao mês, sendo que o crescimento das unhas dos pés são mais lentos quando comparados com às das mãos e os anciões apresentam o crescimento ungueal mais lento que os jovens (Fernández *et al.*, 2002).

A estrutura física e química da unha e pele é composta de queratina que os protegem das infecções fúngicas, pois a maioria dos microrganismos não pode usar para a nutrição, entretanto, leveduras de *Candida albicans* e fungos dermatófitos, produzem queratinases, que hidrolisam esta substância favorecendo a infecção (Wagner *et al.*, 1995).

1.2 ONICOMICOSSES

A onicomicose não se resume a um problema estético, pois causa importante impacto psicológico e social, além da lesão ser dolorosa em alguns indivíduos (Nazar *et al.*, 2012). A alta prevalência de onicomicose deve-se à dificuldade do diagnóstico clínico laboratorial, a coleta do material inapropriado para análise e ao tratamento não efetivo (Brilhante *et al.*, 2005).

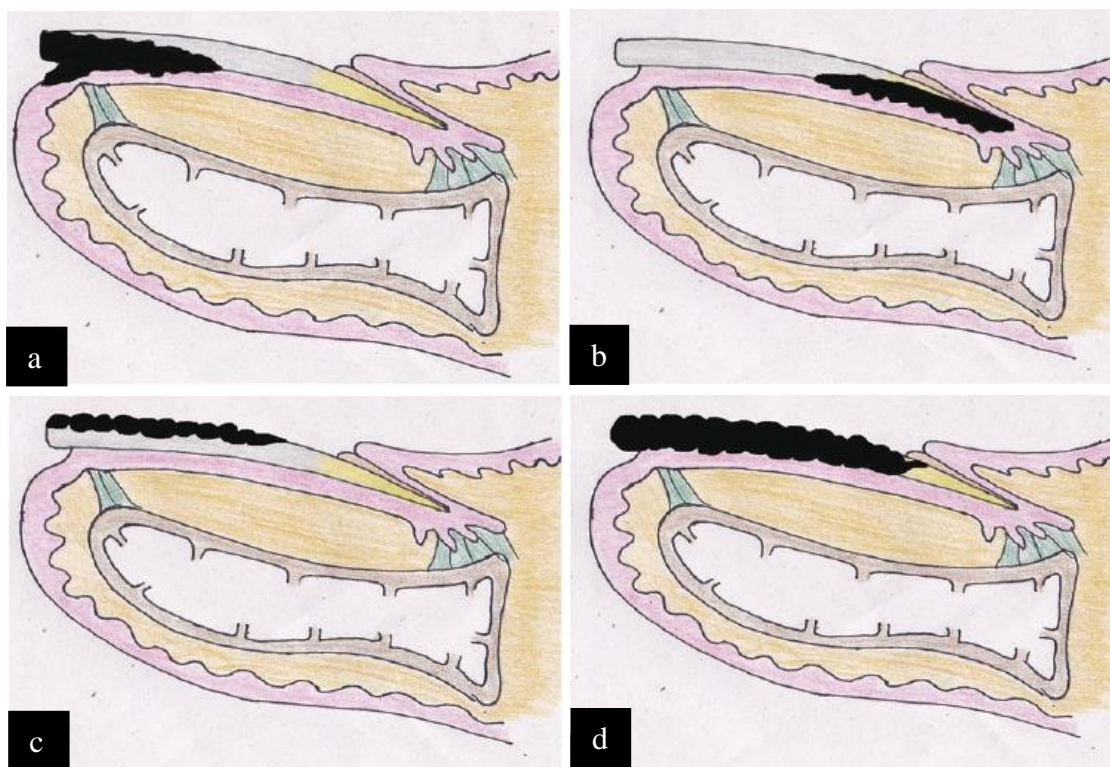
Cuidados devem ser tomados para identificar corretamente os sinais e sintomas de outras doenças que imitam clinicamente a onicomicose. Estes incluem psoríase (a doença

mais comum), infecções bacterianas, dermatite de contato, onicodistrofia traumática, paquioníquia congênita e onicólise idiopática (Elewski *et al.*, 1998).

Os fungos invadem o aparelho ungueal, primeiramente aderindo a superfície e em seguida invadem as subcamadas da unha. O Envolvimento ungueal ocorre a partir da penetração de elementos fúngicos e da secreção de enzimas que degradam os componentes da unha. (Grover *et al.*, 2012).

De acordo com as características clínicas e o tipo de invasão do tecido ungueal, as onicomicoses são classificadas, como: onicomicose subungueal distal, onicomicose subungueal proximal, onicomicose superficial branca e onicomicose distrófica total (Elewski *et al.*, 1998) (Figura 02).

Figura 02 - Classificação das onicomicose, segundo a localização do sítio de infecção: a) onicomicose subungueal distal; b) onicomicose subungueal proximal; c) onicomicose superficial branca; d) onicomicose distrófica total. (fonte: Grover *et al.*, 2012.)



A Onicomicose subungueal distal é a forma mais comum de onicomicose, é caracterizada pela invasão do leito da unha, começando no hiponíquio (Fig. 2a). O fungo migra através da matriz da unha subjacente, provocando onicólise (descolamento da placa ungueal do leito ungueal) e espessamento da região subungueal (Elewski *et al.*, 1998).

Na onicomicose subungueal proximal o fungo invade a unidade ungueal via prega ungueal proximal através da área de cutícula, penetra na placa ungueal recém-formada e migra distalmente (Figura 2b). O quadro clínico inclui hiperqueratose subungueal, onicólise proximal, leuconíquia e destruição da placa ungueal proximal (Elewski *et al.*, 1998).

A Onicomicose superficial branca ocorre quando o fungo invade as camadas superficiais da placa ungueal diretamente (Figura 2c). Enquanto que na onicomicose distrófica total a unidade de unha se torna inteiramente espessa e distrófica (Figura 2d). (Elewski *et al.*, 1998).

O crescimento lento das unhas favorece a infecção por fungos na população adulta, sendo as crianças menos afetadas, pois suas unhas crescem mais rápido, além de possuírem uma menor área superficial para invasão, menor probabilidade de trauma, reduzida incidência de tinea pedis e apresentam menor contato com esporos infectantes (Arenas *et al.*, 2004). Entretanto os pacientes geriátricos, com doenças crônicas, como má circulação ou doenças vasculares periféricas, diabetes, ou complicações cardiovasculares estão mais propensos a desenvolverem infecções nas unhas (Dias *et al.*, 2011).

A onicomicose não é doença de notificação compulsória o que dificulta a avaliação precisa da extensão do problema em nossa região. Assim, é preciso realizar estudos que determinem a prevalência de onicomicose, os agentes que predominam neste tipo de infecção em nosso meio, bem como caracterizar o perfil de suscetibilidade antifúngica juntamente com os fatores de virulência para que possam ser tomadas medidas efetivas de tratamento (Aghamirian, 2010).

O tratamento das onicomicoses é difícil e está associado a altas taxas de recidiva e a ineficácia terapêutica interferindo na qualidade de vida do paciente e gerando prejuízo estético, refletindo diretamente na auto-estima, vaidade, discriminação social e no potencial de trabalho do paciente (Lopes *et al.*, 1999).

1.3 AGENTES ETIOLÓGICOS DE ONICOMICOSSES

1.3.1 LEVEDURAS

Leveduras que fazem parte da microbiota normal de mucosas, pele e anexos, eram consideradas agentes contaminantes, sem importância clínica. Contudo, na atualidade têm

sido consideradas responsáveis por número expressivo de casos de onicomicose confirmados laboratorialmente (Souza *et al.*, 2007).

Leveduras do gênero *Candida* são os principais microrganismos leveduriformes apontados como agentes de onicomicose, resultando em inchaço e vermelhidão, e as infecções persistentes e recorrentes por esta levedura nas membranas mucosas, pele e unhas, pode ocasionar uma candidíase mucocutânea crônica, forma esta de difícil tratamento (Wagner *et al.*, 1995).

A candidíase mucocutânea crônica com envolvimento ungueal pode apresentar-se de forma grave, produzindo espessamento, distorção, e fragmentação das unhas, com inchaço crônico da falange distal (Wagner *et al.*, 1995). A espécie *C. albicans* é normalmente a mais relatada como agente de onicomicose, porém atualmente tem-se relatado o envolvimento de *C. parapsilosis* em infecções de unha com prevalência maior que *C. albicans* (Mujica *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2007).

1.3.2 FUNGOS DERMATÓFITOS

Dermatófitos são fungos filamentos, hialinos, queratinofílicos e são usualmente classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, e dependendo do habitat primário são divididos em zoofílicos, geofílicos e antropofílicos, podendo estar presente em pacientes assintomáticos (Siqueira *et al.*, 2006; Peres *et al.*, 2010). Os dermatófitos que normalmente estão envolvidos na infecção da unha são *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophyte* e *Epidermophyton floccosum* (Wagner *et al.*, 1995).

O gênero *Trichophyton* apresenta poucos macroconídios e quando presentes apresentam parede lisa e fina com 01 a 12 septos e podem ser alongados ou em forma de lápis, clavata, fusiforme, ou cilíndricos. Eles variam em tamanho 8-86 por 4 a 14 mm. Os microconídios são geralmente abundante neste gênero podendo ser globosos, piriforme ou clavata, e são produzidas individualmente ao longo dos lados das hifas (Weitzman *et al.*, 1995).

Os *Microsporum* são caracterizados pela presença abundante de macroconídios grandes e fusiformes de paredes espessa e verrucosa, possuem septos finos e poucos microconídios, estes geralmente encontram-se dispostos isoladamente ou ao longo da hifa (Weitzman *et al.*, 1995).

O gênero *Epidermophyton* apresenta macroconídios abundantes e microconídios ausentes. Os macroconídios em formato de clava, comparados a sapatos de neve, com paredes lisa e fina moderadamente espessas, apresentando de 1-9 septos, 20-60 por 4 a 13 µm de tamanho (Weitzman *et al.*, 1995).

1.3.3 FUNGOS FILAMENTOSOS NÃO DERMATÓFITOS

Infecções causadas por fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) são difíceis de ocorrer, com exceção para os casos de onicomicose nos quais se têm observado tendência crescente, tornando necessária a realização de estudos para obtenção de conhecimentos da prevalência de FFND (López-Jodra *et al.*, 1999). Os FFND foram os agentes mais comuns isolados de onicomicose em região de clima tropical, na Malásia, seguido por leveduras do gênero *candida* e pequeno percentual por dermatófitos (Leelavathi *et al.*, 2012).

As espécies de FFND relatadas como agentes de onicomicose são: *Scytalidium dimidiatum*, *Curvularia sp.*, *Fusarium SP*, *Aspergillus spp* (Araújo *et al.*, 2003). Embora o *Aspergillus spp.* esteja relacionado com infecções de unha de uma população acima de 50 anos, envolvendo tanto homens quanto mulheres (Leelavanthi *et al.*, 2012).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

Na epidemiologia e etiologia das onicomicoses, existem diferenças geográficas, especialmente na frequência de cada grupo de fungos responsável pela infecção. A prevalência da onicomicose na Europa situa-se em 8% e nos Estados Unidos da América do Norte, é estimada em 13% (Roberts, 1992). *T. rubrum* é a espécie mais frequente de onicomicose na Europa, Canadá e EUA, enquanto a alta prevalência de *Candida spp.* tem sido relatada na Bélgica, Arábia Saudita e Espanha (Vélez, *et al.*, 1997).

Estudos de casos de onicomicose no Brasil revelaram 19,35% de casos no estado do Rio de Janeiro, tendo como agente predominante os dermatófitos (Araújo, *et al.*, 2003). Enquanto que o estado do Ceará, apresentou 52% de casos, com predomínio de leveduras e o estado do Paraná, apresentou 82,18% de positividade, dentre os quais, 47% foram leveduras e 53% foram fungos filamentosos ((Brilhante, *et al.* 2005; Souza, *et al.*, 2007). A positividade

no estado de São Paulo, foi de 71% das amostras estudadas, das quais o agente mais comum foi a levedura (Martins, 2007). O estudo de onicomicose no estado do Pará, no período de 11 anos, mostrou a incidência de dermatófito (20%) e leveduras (30%) presentes em infecções ungueais.

A microbiota fúngica é alterada no mundo periodicamente em sua composição quantitativa e qualitativa, em função de fatores ambientais, como o desenvolvimento urbano, a industrialização, a localização geográfica e condições climáticas, tais como temperatura e tempo de exposição à radiação ultravioleta, assim, o exame periódico da composição da microbiota torna-se vantajoso e de importância epidemiológica (Araújo, *et. al.*, 2003).

1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

As capacidades de um dado microrganismo de adesão, invasão e infecção são definidas como potencial de virulência deste agente, sendo estes potenciais determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a condições adequadas, causando a infecção (Tamura *et al.*, 2007).

Os fungos foram desenvolvendo uma variedade de mecanismos para escapar ou diminuir a regulação da resposta imune do hospedeiro, principalmente por modificação da exposição do componente da parede celular, tal mudança fenotípica é uma estratégia empregada por vários fungos patogênicos, como *Candida albicans*, sendo capaz de passar de uma forma da célula, levedura, para a forma de hifas (Rizzeto *et al.*, 2013). A formação de hifas está associada ao mecanismo de evasão por perda de reconhecimento adequado pelo sistema imune do hospedeiro (Van de Veerdonk *et al.*, 2008).

Espécies de fungos comensais, muitas vezes se tornam patogênicas, quando o equilíbrio da microbiota normal é interrompido ou as defesas imunitárias estão comprometidas. Determinar exatamente como essa conversão de comensal para patógeno ocorre e como pode ser prevenida é um desafio permanente para o campo de micologia médica. Com efeito, verifica-se que a transição de comensais inofensivos para patógeno é uma linha fina e atribuível a um repertório extenso de determinantes de virulência expressos selectivamente sob condições adequadas de predisposição (Naglik *et al.*, 2004).

Algumas condições são necessárias na interação parasito-hospedeiro, dentre elas temos a oferta nutricional adequada para que haja a propagação do espécime, bem como, o

clima adequado e os hábitos dos seres humanos. Os microrganismos foram se desenvolvendo e se adaptando as predisposições do hospedeiro, causando-o ou não prejuízos (Rubio *et al.*, 1999).

Leveduras do gênero *Candida* geralmente residem como organismos comensais, fazendo parte da microbiota normal de um indivíduo e possuem habilidade de passar da condição de comensal a patogênica quando encontram condições favoráveis no hospedeiro, dependendo para isso dos diversos fatores de virulência (Macêdo *et al.*, 2009). A virulência e patogenicidade de *C. albicans* é atribuída à sua capacidade de adesão celular, à produção de formas filamentosas e a atividade de suas enzimas hidrolíticas (Naglik *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 1995).

Enzimas hidrolíticas são capazes de destruir ou desorganizar elementos de membranas das células hospedeiras, levando a disfunção da membrana e/ou ruptura física (Schulze *et al.*, 2009). As principais enzimas hidrolíticas produzidas por leveduras do gênero *Candida* são as proteinases e as fosfolipases (Candido *et al.*, 2000), sendo a espécie *Candida albicans* maior produtora de fosfolipase e proteinase (Rörig *et al.*, 2009).

As enzimas proteinase e fosfolipase são importantes na patogênese, facilitando a invasão do patógeno e a destruição das células hospedeiras. A fosfolipase destrói os fosfolípidos na superfície da célula e a proteinase destrói algumas proteínas importantes no sistema imune da célula hospedeira, tais como imunoglobulina, lactoperoxidase, lactoferrina, mucina (Akçagar *et al.*, 2011).

Embora *Candida albicans* seja a levedura mais freqüentemente isolada como agente de infecção humana, padrões de mudança das espécies de *Candida* detectada entre isolados clínicos na última década mostram que outras espécies de *Candida* têm tornado-se emergentes. Portanto a identificação rápida e confiável de espécies de *Candida* produtoras de fatores de virulência é importante na rotina da prática de microbiologia clínica (Dostál *et al.*, 2003).

1.5.1 FOSFOLIPASE

As fosfolipases são enzimas hidrolíticas, capazes de degradar fosfolípidos sendo classificadas fosfolipases A, B, C e D, lisofosfolipases e lisofosfolipases transacilases. Os fosfolípidos são os maiores componentes da membrana biológica, podendo ser encontrados

em todos os animais, plantas e bactérias. Entre os fosfolipídios naturais o mais comum é a fosfatidilcolina (lecitina) que funciona como substrato para as quatro fosfolipases. A presença destas enzimas na superfície da levedura e na extremidade do pseudomicélio propicia a lesão tecidual (Niewerth *et al.* 2001).

As Fosfolipases invadem as células hospedeiras, clivam os constituintes lipídicos da membrana celular, provocando danos nos tecidos, ruptura das membranas das células epiteliais, e permitindo que as hifas penetrem no citoplasma prejudicando a estabilidade da membrana e ocasionando lise celular (D`Eça *et al.*, 2011).

As Fosfolipases invadem as células hospedeiras, clivando os constituintes lipídicos da membrana celular, resultando na ruptura dessas membranas, permitindo que as hifas penetrem no citoplasma, prejudicando a estabilidade da membrana e ocasionando lise celular (D`Eça *et al.*, 2011).

A produção de fosfolipases concentra-se nas pontas das hifas e a atividade de produção é maior quando a hifa está em contato direto com a membrana, mostrando que essas enzimas são importantes na invasão tecidual (Komiyama *et al.*, 2007).

Algumas espécies de *Candida* são produtoras de fosfolipase, principalmente *C. albicans*, e a atividade de fosfolipase está relacionada às cepas mais aderentes às células epiteliais e, portanto maior é a sua patogenicidade (Barrett-Bee *et al.*, 1985). A importância desta enzima na patogenese de leveduras é comprovada pela menor virulência apresentada por *C. albicans* mutantes, espécies que perderam esta enzima, tornando-as mais sensíveis à fagocitose (Akçagar *et al.*, 2011).

1.5.2 PROTEINASE

A Produção de proteinase aumenta a capacidade de certos organismos de colonizar e penetrar o tecido hospedeiro, enganar o sistema imunológico, causando danos a um número significativo de proteínas importantes para a imunidade, tais como imunoglobulinas, proteínas do complemento e citocinas (Staniszewska *et al.*, 2012; Ombrella *et al.*, 2008).

Enzimas proteolíticas foram encontradas em espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* obtidas de várias amostras clínicas (Oliveira *et al.*, 1998). A proteinase extracelular produzida por diferentes espécies de *Candida* é capaz de degradar vários substratos, tais como: queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular, facilitando a adesão e invasão de tecidos e destruição das células e moléculas do sistema imunológico do hospedeiro para evitar ou resistir ao ataque antimicrobiano.

As proteinases secretadas por *C. albicans* pertencem a classe de enzimas aspartil proteinases (Saps), onde 10 genes Sap são responsáveis pela expressão das proteinases, indicando que uma variedade de células hospedeiras e de tecidos podem ser acometidos durante a infecção. O gene Sap proporciona um sistema proteolítico eficiente e flexível que pode revelar-se essencial para o sucesso de *C. albicans* como um agente patogênico oportunista e pode explicar parcialmente a razão pelo qual *C. albicans* é um fungo patogênico comum em humanos (Naglik *et al.*, 2004).

Para *C. albicans* e *C. tropicalis* a atividade secretora proteolítica é considerada um fator importante na virulência, porém para *C. parapsilosis*, ainda não foi estabelecido uma correlação entre a actividade proteolítica e virulência em seres humanos e animais, apesar do seu potencial proteolítico (Ruchel *et al.*, 1986).

Estudos sugerem que as proteinases podem influenciar na virulência de *C. albicans* por prováveis mecanismos que: 1) facilitam a adesão através da proteólise das proteínas de superfície de acolhimento, resultando em dano do tecido hospedeiro; 2) destroem a resposta imune do hospedeiro; 3) danificam células endoteliais e 4) estimulam mecanismos proteolíticos no hospedeiro (Akçaglar *et al.*, 2011).

In vitro, a produção de proteinase é induzida em meio de cultura contendo proteína exógena, albumina de soro bovino (BSA), como a única fonte de nitrogênio, e a produção de protease é revelada pela formação de um halo de hidrólise translúcido ao redor da colônia (Dostál *et al.*, 2003).

O nível de atividade das exoenzimas no laboratório geralmente é avaliado através de uma unidade denominada de zona de precipitação (Pz) que é a razão entre o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, $Pz = dc / dcp$. A amostra produtora da enzima forma um halo ao redor do inóculo. De acordo com esse sistema a atividade enzimática é considerada alta quando $Pz \leq 63$, moderada no intervalo de $0,64 \leq Pz \leq 0,99$ e sem atividade enzimática quando Pz é igual a 1 (Prince *et al.*, 1982).

1.6 DIAGNÓSTICOS DAS ONICOMICOSSES

O diagnóstico das onicomicoses é baseado na análise clínica, na investigação pelo exame micológico direto e cultura do material biológico em meios específicos para fungos (Aghamirian, 2010). As amostras para análise devem ser obtidas o mais próximo possível da área lesionada, onde se localiza as estruturas fúngicas viáveis. (Tang, 2010).

O exame micológico direto deve ser realizado após a preparação do material com KOH 20-30% e a cultura, necessária para a identificação do fungo a nível de gênero e espécie, deve ser realizada a partir de semeio em ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloheximida (Midgley, 1998).

A cultura para leveduras e FFND é definida pelo crescimento, no mínimo, em dois tubos de semeio e crescimento na área em que o material ungueal é semeado (Nazar J. *et al.*, 2012). Quanto maior a cronicidade da lesão ungueal maiores são os resultados de cultura negativa, devido a menor viabilidade do fungo patogênico (Nazar *et al.*, 2012).

Os critérios definidos para o diagnóstico de onicomicose são: a) presença de estruturas fúngicas no exame micológico direto independente do resultado da cultura; b) cultura positiva para fungos, ainda que o resultado do exame micológico direto seja negativo (Nazar *et al.*, 2012).

1.7 TRATAMENTO DAS ONICOMICOSSES

A escolha do tratamento das onicomicoses requer a realização de diagnóstico laboratorial, para que seja fornecido ao clínico informações necessárias para a seleção de uma terapia antifúngica mais adequada (Midgley *et al.*, 1998; Aghamirian, 2010).

A terapia da onicomicose pode ser tanto por medicamento oral, quanto tópico ou por associação. O tratamento tópico é o ideal uma vez que não apresenta risco de efeito colateral sistêmico ou interações medicamentosas em potencial, porém é eficaz somente quando a infecção acomete até 50% da unha total, e nos casos de maior acometimento ungueal é necessário a associação com antifúngicos sistêmicos (Llambrich *et al.*, 2002).

Infecções de unha causadas por dermatófitos, muitas vezes respondem mal ao tratamento tópico, exigindo uso prolongado de um agente antifúngico por via oral, como a griseofulvina, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, ou terbinafina (Wagner *et al.*, 1995). Enquanto que no tratamento das infecções causadas por *Candida* é empregado o uso de Fluconazol, voriconazol, itraconazol, flucitosina e anfotericina B (Gualco *et al.* 2007).

Apesar da busca incessante por fármacos cada vez mais eficientes no tratamento das onicomicoses, o tratamento é dificultado por diversos fatores, tais como: a crescente incidência em pacientes imunodeficientes, a predisposição de pacientes com diabetes mellitus, as características farmacocinéticas do medicamento de escolha e o desenvolvimento de resistência do fungo ao fármaco, bem como a correta identificação do agente etiológico (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2010).

1.8 SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA

O estudo da suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos auxilia na seleção de fármacos mais adequados para o tratamento das infecções fúngicas com a determinação da resistência ou sensibilidade. Dessa forma, o conhecimento de cepas resistentes, conduziu à variações nas diretrizes de tratamento entre as diferentes áreas geográficas. Além disso, conhecer os valores da concentração inibitória mínima (MIC) dos antifúngicos frente a diferentes espécies pode ser significativo no tratamento de um caso particular (Cuenca-Estrella *et al.*, 2010).

Mecanismos de escape à terapêutica farmacológica podem ser desenvolvidos pelos fungos, dentre eles temos: a baixa concentração intracelular da droga, as mutações genéticas,

a superexpressão de bombas de efluxo de drogas e as alterações do teor de ergosterol da membrana (Bossche, 1997).

Por esses motivos, a conduta no tratamento farmacológico das infecções fúngicas não pode ser generalizada. Além disso, estudos da variabilidade de fungos quanto à suscetibilidade antifúngica frente ao fluconazol, cetoconazol, itraconazol e terbinafina, tem mostrado que o mesmo fungo responde de forma distinta à diferentes fármacos, da mesma forma que a sensibilidade antifúngica a determinada droga varia entre as espécies (Almeida *et al.*, 2009).

Assim, o estudo da fisiologia, da genética e bioquímica dos fungos, bem como da patogênese, da resposta imunológica do hospedeiro frente às infecções por fungos e o estudo da suscetibilidade aos antifúngicos fornecem ferramentas importantes na terapêutica e profilaxia dessas infecções (Peres *et al.*, 2010).

1.9 MÉTODOS AUTOMATIZADOS DE IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA – SISTEMA VITEK 2 (BIOMÉRIEUX SA, MARCY L'ETOILE, FRANÇA)

O aumento do número de infecções fúngicas e da resistência aos antifúngicos adquirida por leveduras justifica a necessidade de uma identificação rápida e correta destes microrganismos. Os métodos de identificação convencionais (análise morfológica, assimilação das fontes de carbono e nitrogênio, fermentação de carboidratos e hidrólise da ureia) são trabalhosos e demorados, enquanto que os métodos automatizados apresentam simplicidade técnica e operacional, além da diminuição no tempo de identificação, aliada a maior número de provas bioquímicas, o que aumentam substancialmente a confiabilidade do resultado (Souza *et al.*, 2001).

Vários sistemas comerciais automatizados e semi-automatizados também têm sido desenvolvidos para a realização do teste de sensibilidade, a partir da padronização dos procedimentos de testes de suscetibilidade antifúngica (AST) pelo Laboratório Clínico Standards Institute (CLSI), sendo eles métodos acessíveis, simples e flexíveis para uso em laboratório clínico (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b; Cuenca-Estrella *et al.*, 2010).

Atualmente, encontramos diversos métodos de assimilação de nutrientes que simplificam tanto o uso quanto a interpretação. O método automatizado Vitek 2 yeast

(Biomérieux) identifica, confiavelmente, espécies de leveduras clinicamente mais importantes, dentro de 15h. É um método alternativo de identificação excelente para os laboratórios clínicos que executam diagnósticos fúngicos (Meurman *et al.*, 2006).

A tecnologia Vitek 2 por ser um método totalmente automatizado possibilita determinar o crescimento de leveduras espectrofotometricamente, permitindo a identificação e determinação de MIC simultaneamente, obtendo resultados rápidos e precisos (Farina *et al.*, 2011; Posteraro *et al.*, 2009).

A compatibilidade dos testes de susceptibilidade antifúngica foram estudadas entre os método de referência de microdiluição CLSI M27-A2 com o sistema Vitek 2 AST-Ys (Biomérieux), o que mostrou concordância entre os resultados obtidos (Borghi *et al.*, 2010).

A vantagem do sistema automatizado Vitek 2 é a capacidade de determinar o valor de MIC mais fácil e rapidamente do que outras técnicas desenvolvidos tanto pelo CLSI ou o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Também proporciona a determinação confiável do teste de suscetibilidade antifúngica de espécies de *Candida* spp. e outras espécies de leveduras, tais como *C. neoformans* e espécies emergentes, contribuindo na identificação de resistência à azólicos e a anfotericina B, *in vitro* (Posteraro *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de suscetibilidade antifúngica e os fatores de virulência fosfolipase e proteinase dos agentes de onicomicoses isolados de pacientes atendidos no laboratório central do estado do Pará.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar os agentes de onicomicoses;
- b) Identificar as leveduras causadoras de onicomicoses;
- c) Verificar a suscetibilidade antifúngica das leveduras causadoras de onicomicoses frente ao fluconazol, voriconazol, anfotericina B e flucitosina;
- d) Verificar a produção de enzimas fosfolipase e proteinase das leveduras isoladas.

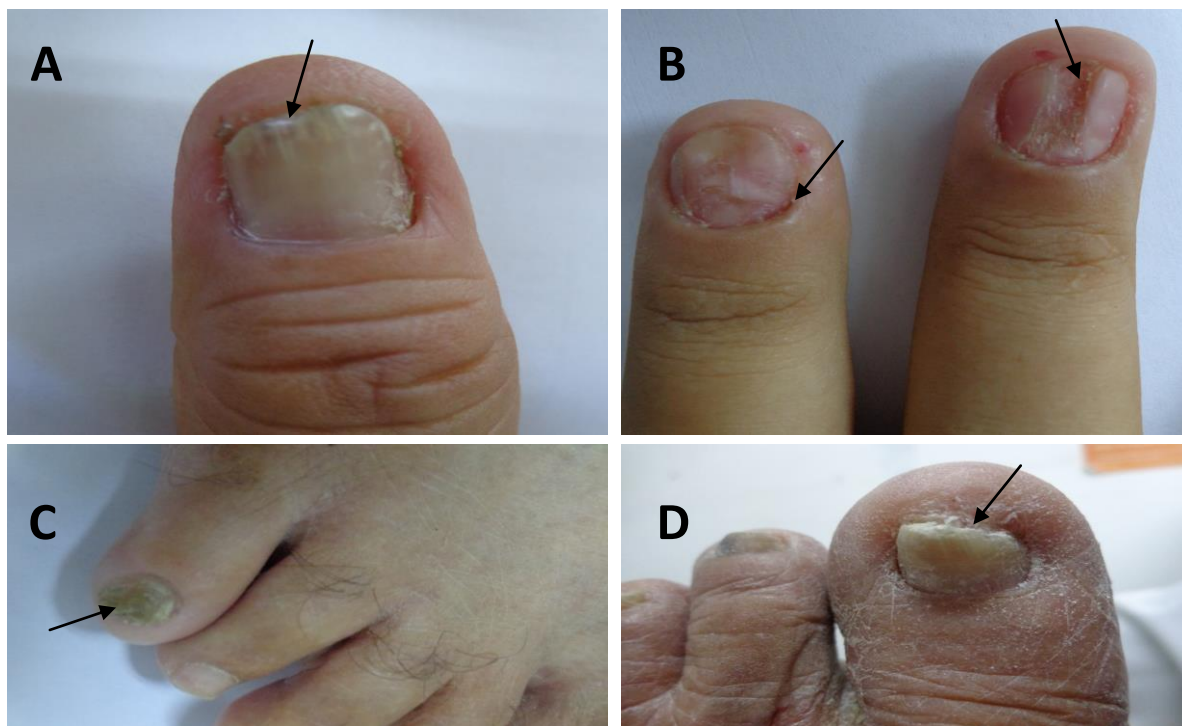
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- AMOSTRAS

As amostras estudadas foram coletadas de 100 pacientes encaminhados para atendimento ao Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN), no período de Novembro de 2011 a Novembro de 2012.

O material clínico utilizado foi o Raspado ungueal e subungueal (Figura 03). A coleta foi realizada conforme as instruções de detecção e identificação de fungos de importância médica – ANVISA / 2004.

Figura 03 - Exemplos de unhas alteradas cujos pacientes foram encaminhados ao LACEN para exame micológico direto e cultura. a) onicólise; b) paroníquia e onicorrexe; c) distrofia e alteração da coloração e d) espessamento associado a onicólise.



3.1.1 - CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Pacientes apresentando unhas com alterações em sua estrutura, com aumento da espessura ou mudança da coloração da lâmina ungueal, associadas ou não a onicólise ou onicorrexe.

3.1.2 - CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

- a) Pacientes com unhas tratadas com antifúngico por período inferior a 15 dias antes da coleta.
- b) Amostras com pomadas, creme, esmalte ou qualquer outro tipo de substância no dia da coleta.
- c) Pacientes em uso de antifúngicos orais.

3.2- COLETA

As coletas das amostras foram realizadas após assepsia local com solução fisiológica, utilizando uma espátula ou lâmina de bisturi para a retirada do material ungueal e sub-ungueal, desprezando a primeira porção. O material coletado foi depositado em placa de Petri estéril para análise, conforme a figura 04.

Figura 04- Coleta do material ungueal. Raspado subungueal distal coletado para análise pelo exame micológico direto e semeio em meio de cultura.



3.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

3.3.1- EXAME MICOLÓGICO DIRETO

As amostras foram analisadas pelo método direto entre lâmina e lamínula utilizando KOH 20% por 20 minutos para a clarificação das células queratinizadas com observação posterior em microscópio óptico comum, utilizando as objetivas com aumento de 10x e 40x para pesquisa de estruturas fúngicas. O resultado do exame micológico direto foi considerado positivo quando visualizado estrutura fúngica na amostra analisada, tais como: leveduras e hifas.

3.3.2- CULTURA

As amostras foram cultivadas, em meio de cultura Agar Sabouraud com Cloranfenicol e Mycosel (Agar Sabouraud + Cloranfenicol+ Ciclohexamida). Todas as amostras foram semeadas em triplicata e incubadas a temperatura ambiente por até 30 dias.

O resultado da cultura foi considerado positivo quando houve crescimento fúngico em pelo menos dois tubos de cultura (Figura 05). Características das colônias, tais como: a textura, a cor e presença de relevo, foram os primeiros critérios para a distinção dos fungos filamentosos e de leveduras, com confirmação em microscopia direta utilizando KOH 20% em objetiva com aumento de 10x e 40x.

Figura 05- Culturas isoladas de raspado ungueal. Crescimento de leveduras em meio de cultura agar sabouraud com cloranfenicol.



3.3.3- PROCEDIMENTO DO TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

As leveduras foram identificadas pelo sistema Vitek 2, utilizando os cartões do Vitek 2 yeast (ID-YST), de acordo com as instruções do fabricante.

As suspensões do inóculo para os cartões Vitek 2 ID-YST foram obtidos a partir de culturas puras de leveduras com 24h de crescimento em ágar Sabouraud Dextrose, com a turbidez ajustada para 1,8 - 2,2 no padrão de McFarland utilizando o instrumento Bio-Mérieux Densicheck, de acordo com as recomendações do fabricante.

A suspensão padronizada, contida em tubo poliestireno estéril, foi colocada numa cassete de Vitek 2 e inserido neste tubo um cartão Vitek 2 ID-YST contendo a série bioquímica para a identificação de leveduras. Na sequência houve o carregamento da cassete com a diluição das suspensões de leveduras, sendo o enchimento do cartão executado automaticamente pelo sistema de Vitek 2. O tempo de incubação variou de acordo com a taxa de crescimento. Cepas de controle de qualidade foram incluídas em cada sessão de trabalho (Figura 06).

3.3.4 - PROCEDIMENTO DO TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA

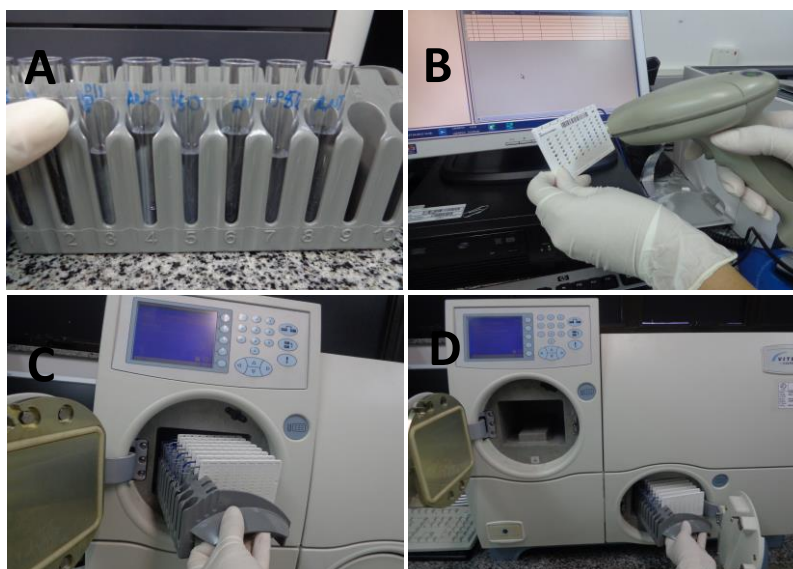
Os testes de suscetibilidade antifúngica para as leveduras foram realizadas pelo sistema vitek 2, utilizando cartões AST-YS, que possibilita realizações de testes de suscetibilidades antifúngica automatizada, padronizada e rápida, excelente para laboratório clínico. Os antifungicos testados foram o fluconazol, voriconazol, anfotericina B e flucitocina.

As suspensões do inóculo para as cartelas Vitek 2 YS-AST foram obtidos a partir de culturas puras de leveduras com 24h de crescimento em ágar Sabouraud Dextrose, com a turbidez ajustada para 1,8-2,2 no padrão de McFarland utilizando o instrumento Bio-Mérieux Densicheck, de acordo com as recomendações do fabricante.

Os testes de suscetibilidade com o sistema Vitek 2 (Biomérieux) foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A suspensão padronizada, contida em tubo poliestireno estéril, foi colocada numa cassete de Vitek 2 e inserido neste tubo um cartão Vitek 2 AST-YS contendo duas diluições em série de anfotericina B (intervalo de 0,25-16 µg / ml), flucitosina (intervalo de 1 a 64 µg / ml), o fluconazol (intervalo de 1-64 µg / ml), e o voriconazol (intervalo de 0,12-8 µg / ml). Na sequência houve o carregamento da cassete com

a diluição das suspensões de leveduras, sendo o enchimento do cartão executado automaticamente pelo sistema de Vitek 2. O tempo de incubação variou de acordo com a taxa de crescimento. Cepas de controle de qualidade foram incluídas em cada sessão de trabalho (Figura 06).

Figura 06 - Processamento das amostras no instrumento Vitek 2. a) Tubos de poliestireno estéril contendo suspensões com turbidez de 1,8 - 2,2 no padrão de McFarland; b) cadastramento; c) carregamento e d) incubação das amostras para teste de identificação e antifúngico.



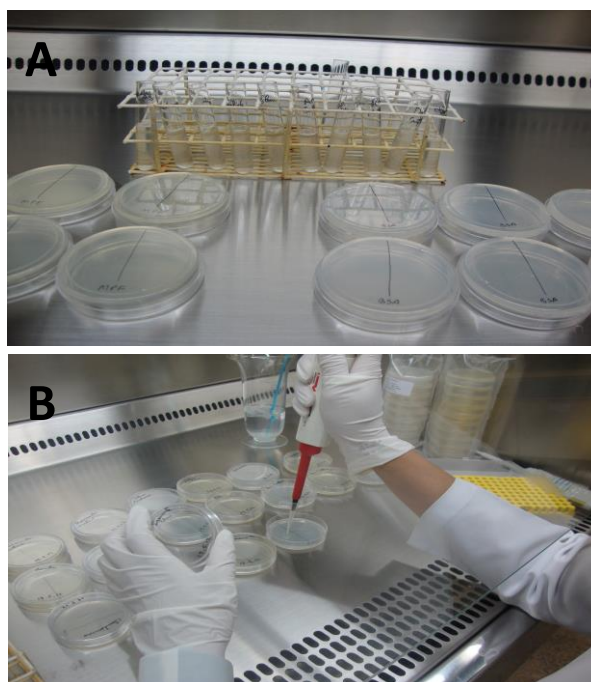
4. CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA

4.1 PRODUÇÃO DE FOSFOLIPASE

A atividade de fosfolipase foi realizada de acordo com método de Price *et al.*, 1982. Culturas de leveduras com 24h de crescimento em ágar Sabouraud Dextrose foram inoculadas em placas com meio base, contendo emulsão de ovo a 50% em solução fisiológica. O meio base é constituído de 10g de peptona, 30g de glicose, 57,3g de cloreto de sódio, 0,55g de cloreto de cálcio, 20g de ágar e 1000 mL de água destilada. A esta solução previamente esterilizada em autoclave foi acrescentada 4% da emulsão de gema de ovo 50% (Difco). Para cada levedura foi preparada uma suspensão de células em solução salina ajustada na escala 1 McFarland. Foram inoculados 10 μ L dessa suspensão de leveduras em pontos equidistantes

nas placas. Em cada placa foram inoculadas duas leveduras em duplicata (Koga-Ito *et al.*, 2006) (Figura 07).

Figura 07 - Caracterização dos fatores de virulência. a) meios utilizados no teste de fosfolipase e proteinase; b) inoculação de 10 μ L da suspensão de levedura em duplicata e em pontos equidistantes.



A leitura do teste foi realizada após quatro dias de incubação a 37°C, sendo considerado como positivo a produção de zona opaca de precipitação ao redor da colônia.

A atividade enzimática (Pz) foi medida, de acordo com Price *et al.*, 1982, através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática, assim sendo, Pz= 1 indica ausência de atividade enzimática, $0,64 < Pz < 1$ indica atividade enzimática positiva e quando $Pz \leq 0,63$ há atividade enzimática fortemente positiva.

4.2 PRODUÇÃO DE PROTEINASE

As leveduras foram cultivadas por 24h em Ágar Sabouraud Dextrose a 25°C e inoculadas em placas com ágar BSA (Bovine Serum Albumin), que consiste em uma solução

de 300 mL de água destilada, 0,2g de sulfato de magnésio heptahidratado, 2,5g de fosfato de potássio bibásico, 5g de cloreto de sódio, 1g de extrato de levedura, 20g de glicose e 2,5g de albumina bovina fração V (Sigma), que foi ajustada a pH 3,5 com HCl e posteriormente esterilizada por filtração em filtros Millipore de 0,22 μ m de diâmetro e adicionada de 20g de ágar em 700 mL de água esterilizados por autoclave (Koga-Ito *et al.*, 2006). A padronização do inóculo foi feita conforme descrito para o teste de produção de fosfolipase. Em cada placa foram inoculadas duas leveduras em duplicata (Figura 07).

A leitura do teste foi realizada após sete dias de incubação a 37°C, sendo considerado como positivo a produção de halo transparente ao redor da colônia.

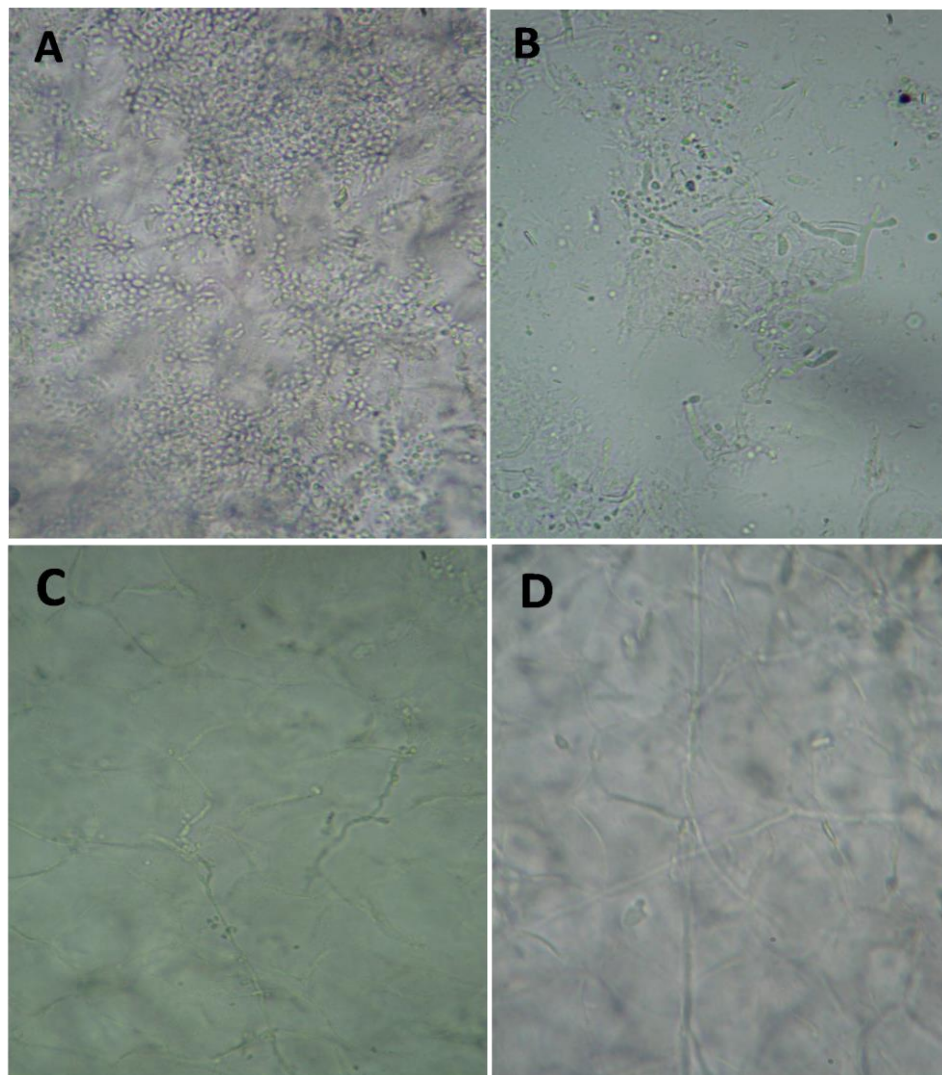
A atividade enzimática (Pz) foi medida, de acordo com Price *et al.*, 1982, através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática, assim sendo, Pz= 1 indica ausência de atividade enzimática, $0,64 < Pz < 1$ indica atividade enzimática positiva e quando $Pz \leq 0,63$ há atividade enzimática fortemente positiva.

5. RESULTADOS

5.1 EXAME MICOLÓGICO DIRETO

Foram analisadas 100 amostras de material ungueal e subungueal pelo método micológico direto, das quais 57 (57%) amostras apresentaram estruturas fúngicas quando observadas com KOH 20%, tais como: blastoconídios, pseudohifas, hifas com blastoconídios e hifas hialinas septadas (Figura 08).

Figura 08 – Estruturas fúngicas visualizadas no exame micológico direto com KOH 20% (400x): a) Blastoconídios; b) Pseudohifa; c) Hifas com blastoconídios e d) Hifas hialinas septadas.



Das 57 amostras positivas no exame micológico direto, 44 (77,2%) foram positivas para leveduras quando apresentaram blastoconídios com ou sem hifas e pseudohifas e 13 (22,8%) apresentaram hifas hialinas septadas com ou sem artroconídios compatíveis com fungos filamentosos, incluso tanto os dermatófitos quanto os fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) (tabela 01).

Tabela 01 - Resultado Exame Micológico Direto.

Microscopia Direta	Fungos		
	Leveduras	Filamentosos	Total
Positivo	44 (77,2%)	13 (22,8%)	57 (57%)
Negativo	-	-	43 (43%)
Total	44 (77,2%)	13 (22,8%)	100 (100%)

5.2 CULTURA

Foram semeadas 100 amostras em meios de cultura Agar Sabouraud com Cloranfenicol e em Agar Mycosel, dentre as quais, 42 amostras foram positivas para leveduras. Das 57 amostras positivas no exame micológico direto, 54,4% (31/57) foram positivas na cultura e dentre as 43 amostras negativas no exame micológico direto, 25,6% (11/43) foram positivas na cultura. A associação do exame micológico direto e cultura aumentou a positividade de onicomicose para 68% (68/100) (Tabela 02).

Tabela 02 - Resultado dos Valores positivos e negativos do Exame Micológico direto versus Cultura positiva e negativa.

Exame Micológico Direto	Cultura		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	31 (54,4%)	26(45,6%)	57 (100%)
Negativo	11 (25,6%)	32 (74,4%)	43 (100%)
Total	42 (42%)	58 (58%)	100 (100%)

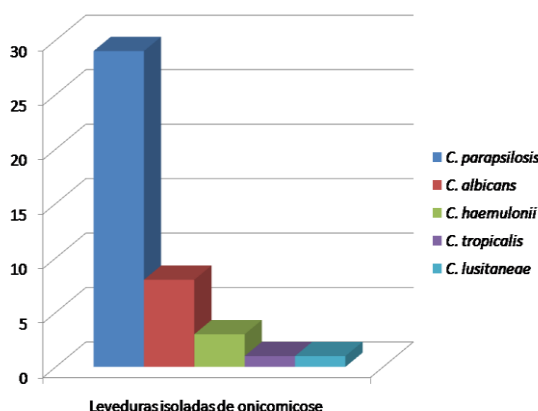
5.3 RESULTADOS LIBERADOS NOS LAUDOS LABORATORIAIS

De acordo com a visualização de estruturas fúngicas no exame micológico direto e o crescimento fúngico nos meios de cultura, os resultados foram liberados para os pacientes como exame micológico direto positivo para leveduras ou fungos filamentosos, com cultura negativa ou cultura positiva, neste caso associada ao perfil de resistência.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS

Todas as leveduras isoladas, 42 (100%) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Candida*, sendo 29 (69%) *Candida parapsilosis*, 8 (19%) *C. albicans*, 3 (7,2%) *C. haemulonii*, 1 (2,38%) *C. lusitanea* e 1 (2,38%) *C. tropicalis* (Gráfico 01).

Gráfico 01- Espécies de leveduras isoladas de onicomicoses.



5.5 SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Todas as espécies de *C. albicans*, *C. lusitanea* e *C. tropicalis* foram sensíveis aos antifúngicos fluconazol, anfotericina B, fluocitocina e voriconazol, enquanto que 20,7% (6/29) de *C. parapsilosis* e 100% (3/3) de *C. haemulonii* apresentaram resistência a pelo menos um dos antifúngicos testados (Tabela 03).

Tabela 03 - Espécies de *Candida* isoladas frente ao teste de suscetibilidade.

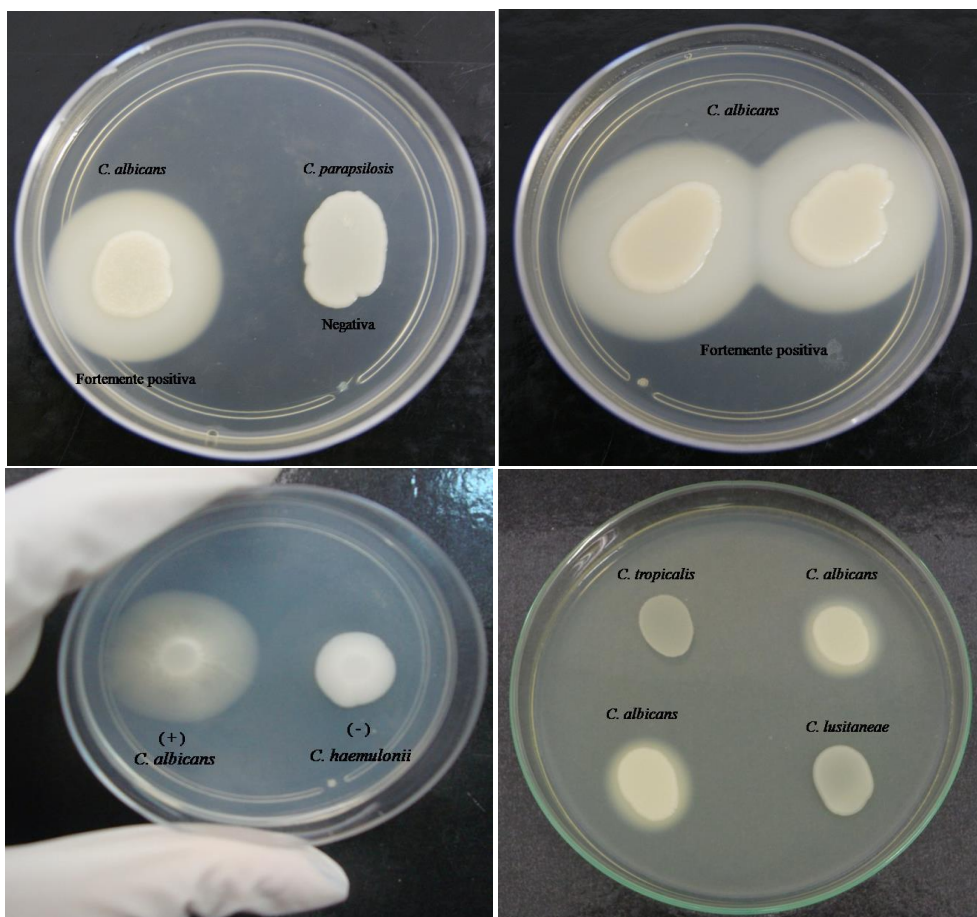
Espécies (nº de isolados)	Fluconazol			Voriconazol			Flucitosina			Anfotericina B		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>C. parapsilosis</i> (29)	23 (79,32%)		6 (20,68%)	23 (79,32%)	3 (10,34%)	3 (10,34%)	29 (100%)		6 (20,68%)		29 (100%)	
<i>C. albicans</i> (8)	8 (100%)			8 (100%)			8 (100%)				8 (100%)	
<i>C. haemulonii</i> (3)	1 (33,33%)	1 (33,33%)	1 (33,33%)	2 (66,66%)		1 (33,33%)	2 (66,66 %)		1 (33,33%)			3 (100%)
<i>C. lusitaneae</i> (1)	1 (100%)			1 (100%)			1 (100%)				1 (100%)	
<i>C. tropicalis</i> (1)	1 (100%)			1 (100%)			1 (100%)				1 (100%)	

S – Sensível; I – Intermediário; R - Resistente

5.6 PRODUÇÃO DE FOSFOLIPASE

Quarenta e duas cepas do gênero *Candida*, foram submetidas à prova de detecção de enzima fosfolipase. A produção de fosfolipase esteve presente apenas na espécie *C. albicans*, com 03 cepas apresentando $0,64 < Pz < 1$ (atividade enzimática positiva) e 04 cepas com $Pz \leq 0,63$ (atividade enzimática fortemente positiva), com positividade de 87,5% nas espécies *C. albicans* (Figura 09 e Tabela 04).

Figura 09- Atividade enzimática para fosfolipase. Fosfolipase positivo: formação de zona opaca ao redor da colônia de levedura. Fosfolipase negativo: Ausência de formação de zona opaca ao redor da colônia de levedura.



5.7 PRODUÇÃO DE PROTEINASE

A produção de proteinase esteve presente somente na espécie *C. albicans*, com 04 cepas apresentando $Pz \leq 0,63$ (atividade enzimática fortemente positiva), com positividade de 50% nas espécies *C. albicans* (Tabela 04 e figura 10). Quarenta e duas cepas do gênero *Candida*, foram submetidas à prova de detecção de enzima proteinase.

Figura 10- Atividade enzimática para proteinase. Proteinase positivo: formação de zona opaca ao redor da colônia de levedura. Proteinase negativo: Ausência de formação de zona opaca ao redor da colônia de levedura.

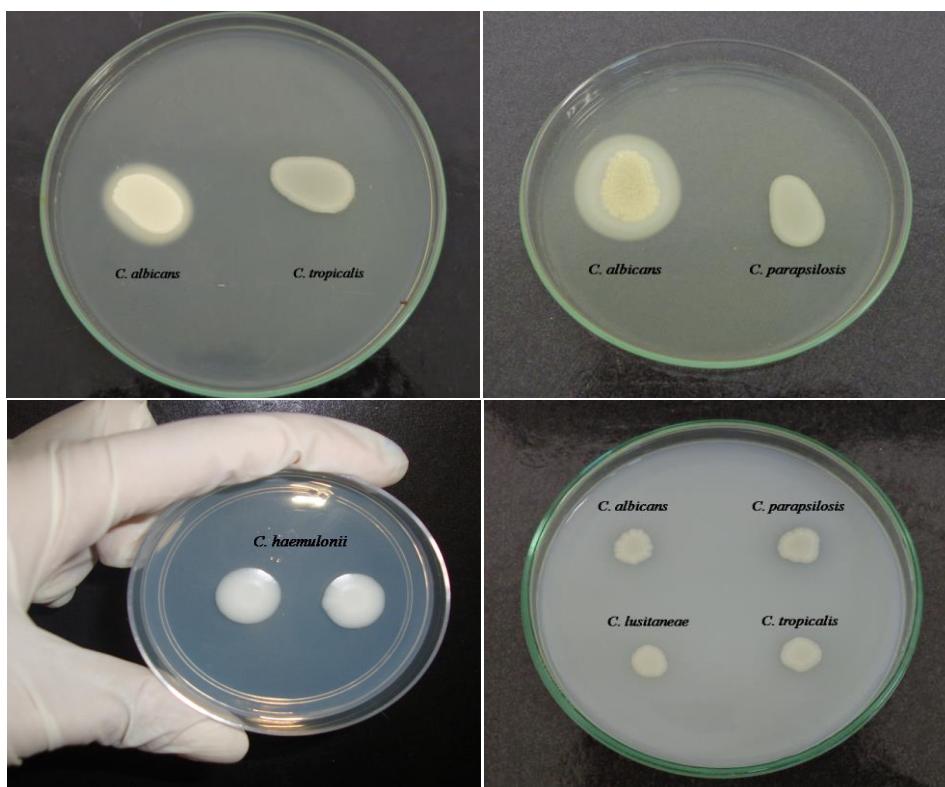


Tabela 04 - Perfil de atividade enzimática de leveduras isoladas de acordo com PRICE *et al.* (1982).

Espécies (Nº de isolados)	Atividade Fosfolipase			Atividade Proteinase		
	Negativo	Positivo	Altamente Positivo	Negativo	Positivo	Altamente Positivo
<i>C. parapsilosis</i> (29)	29 (100%)			29 (100%)		
<i>C. albicans</i> (8)	1 (12,5%)	3 (37,5%)	4 (50%)	4 (50%)		4 (50%)
<i>C. haemulonii</i> (3)	3 (100%)			3 (100%)		
<i>C. lusitanae</i> (1)	1 (100%)			1 (100%)		
<i>C. tropicalis</i> (1)	1 (100%)			1 (100%)		

A análise do perfil de suscetibilidade antifúngica e da atividade enzimática das espécies isoladas segundo a idade e gênero, aponta o gênero feminino no intervalo de 51- 60 anos, com o maior número de cepas resistentes e produtoras de enzimas proteinase e fosfolipase (Figura 11).

Figura 11 - Espécies isoladas segundo a idade e gênero.

Espécies isoladas	Sexo	Idade					
		15-20	30-40	41-50	51-60	61-70	71-80
<i>C. parapsilosis</i>	Masculino		1	1		2	1*
	Feminino	1	1	3	14**	4	2*
<i>C. albicans</i>	Masculino					1*F	
	Feminino				6 *P /**F		1*F
<i>C. haemulonii</i>	Masculino					1*	
	Feminino				1*	1*	
<i>C. lusitanae</i>	Masculino				1		
<i>C. tropicalis</i>	Feminino					1	

*: 1 cepa resistente; **: 4 cepas resistentes; *P: 4 cepas produtoras de proteinase; *F: 1 cepa produtora de fosfolipase; **F: 5 cepas produtoras de proteinase.

6. DISCUSSÃO

Em nossa região são escassos os relatos, especificamente, sobre identificação e testes de suscetibilidade a antifúngicos em onicomicoses, assim como estudos que caracterizem os fatores de virulência presentes em leveduras causadoras deste tipo de infecção, o que torna este trabalho importante para o conhecimento das principais espécies fúngicas envolvidas em onicomicose e suas respectivas respostas à drogas.

No Laboratório Central do estado do Pará no período de Novembro de 2011 a Novembro de 2012 foram avaliados 100 casos com suspeita clínica de onicomicose. O diagnóstico laboratorial (micológico direto e/ou cultura positiva) foi confirmado em 68% (68/100) das amostras clínicas analisadas, semelhante a Rubeena *et al.* em 2013, que obteve em 150 clínicas com suspeita de onicomicose a confirmação diagnóstica de 60% (90/150). No entanto, Mikaeili *et al.* em 2013, ao analisar um número maior de 2.402 amostras suspeitas de onicomicose, conseguiu confirmar a doença em 45,2% (1.086/2.402) dos pacientes através de exames laboratoriais.

Das 100 amostras clínicas com exame micológico direto e/ou cultura positiva analisadas em nosso estudo, foi possível observar o exame micológico direto positivo em 57% (57/100) das amostras coletadas, enquanto a cultura foi positiva em 42% (42/100) do total das amostras estudadas, mostrando maior positividade obtida através do exame micológico direto, o que pode ser explicado por diferentes situações como: distribuição irregular dos fungos nas lesões; dificuldade na coleta do material, especialmente na região subungueal; facilidade com que ocorre a contaminação das culturas por fungos anemófilos e microbiota bacteriana, dificultando assim a identificação do verdadeiro agente etiológico; limitações inerentes ao exame, como a intensa queratinização das unhas, que dificulta a observação microscópica dos microorganismos e; viabilidade fúngica, que pode resultar em culturas falso negativo e pelo uso prévio de medicações antifúngicas pelo paciente antes da coleta (Martelozzo *et al.*, 2005; Brilhante *et al.*, 2005).

Como observamos em nosso estudo, para se obter resultados mais consistentes, é fundamental a associação do exame micológico direto e da cultura, concordando com os resultados obtidos por Rubeena *et al.* em 2013; Vasconcelos *et al.*, 2013, que demonstraram maior sensibilidade dos resultados com a combinação dos dois exames.

Atualmente, é crescente o número de casos de onicomicose causada por leveduras e o gênero *Candida* é o principal patógeno isolado (Gelotar *et al.*, 2013). Um estudo recente com

124 amostras, das quais 42% (52/124) foram positivas para onicomicose, demonstra envolvimento de *Candida* em 30,76% (16/52) nos casos clínicos avaliados (Ahmed *et al.*, 2013). Do mesmo modo, houve um predomínio de leveduras em nosso estudo, porém com uma frequência bem maior (80,8%; 55/68) das amostras positivas para leveduras, exclusivamente do gênero *Candida*, principalmente *C. parapsilosis* (69%; 29/42).

A presença de outras espécies de *Candida* como agente de infecção reafirma relatos anteriores de espécies não *albicans* como agentes de onicomicose. O predomínio da espécie *C. parapsilosis* (69%) neste trabalho como agente de onicomicose está de acordo com pesquisas realizadas por outros autores (Nazar *et al.*, 2012; Manzano-Gayosso *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2007; Mujica *et al.*, 2004; López- Jodra *et al.*, 1999). No entanto, há descrição da presença de *C. parapsilosis* (51.3%) como componente da microbiota normal em amostras subungueais (McGinley *et al.*, 1988), o que indica que este patógeno pode ser mais um saprófita presente na pele humana com possibilidade de causar doença, especialmente no aparelho ungueal.

A maior frequência de isolamento de *C. parapsilosis* em comparação com *C. albicans* em onicomicose pode ter implicações terapêuticas importantes (Segal *et al.*, 2000), pois estudos demonstram que muitas espécies não *albicans* são menos suscetíveis às drogas, dificultando o tratamento da candidíase (Villar *et al.*, 2004).

Diferentes trabalhos com o isolamento de *C. parapsilosis* a partir de casos de onicomicose em Minas Gerais (Silva *et al.*, 2013; Ataidés *et al.*, 2012) não encontraram cepas resistentes aos antifúngicos voriconazol, cetoconazol e itraconazol. Em nosso trabalho, a presença de cepas resistentes variou de 10,34% para o voriconazol, a 20,68% para o fluconazol e a flucitosina, indicando a possível emergência de cepas resistentes, mesmo a antifúngicos mais modernos como o voriconazol.

Essa tendência à resistência pode ser devida ao uso indiscriminado de drogas como o fluconazol, e à não aderência ao esquema terapêutico pelo paciente, o que poderia justificar eventual falha terapêutica, ou pode ainda estar relacionada a tratamentos irregulares. O fato dos pacientes imunodeprimidos previamente tratados com fluconazol possuírem grande possibilidade de desenvolver infecções por espécies de *Candida* resistentes aos azólicos, indica a importância da identificação do agente etiológico em nível de espécie neste grupo de pacientes e a necessidade da determinação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos para evitar a disseminação da infecção (Lima *et al.*, 2008).

Dado o número limitado de drogas antifúngicas adequadas e eficazes, ao aumento contínuo na incidência de infecções por *Candida*, juntamente com crescente resistência, destaca-se a necessidade de conhecer melhor a patogenicidade das espécies envolvidas nas infecções de unha (Pappas *et al.*, 2004) e a fisiopatologia do processo. Adesão, filamentação, secreção de enzimas extracelulares e desenvolvimento de resistência antifúngica são alguns dos mecanismos de virulência de espécies de *Candida* associados com onicomicose.

A espécie *Candida albicans* possui maior capacidade de aderência às células epiteliais e a outras superfícies, o que pode estar relacionado com sua maior patogenicidade, quando comparada às outras espécies de *Candida*. A invasão fúngica também é facilitada pelo dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa e a produção das enzimas proteinases e fosfolipases – como observadas em nossas amostras – que auxiliam na aderência da levedura à mucosa do hospedeiro (Costa, *et al.*, 2010).

Semelhante a *C. albicans*, os fatores que influenciam a virulência em *C. parapsilosis* incluem adesão, formação de biofilme, o metabolismo lipídico, e secreção de enzimas hidrolíticas tais como lipases, fosfolipases e proteinases (Singaravelu, *et al.*, 2013).

As enzimas fosfolipase e proteinase foram detectadas somente nas espécies de *C. albicans*, concordando com trabalhos que mostram que a produção destas enzimas é realizada principalmente por esta espécie (Candido, *et al.*, 2000; Schaller, *et al.*, 2005 Kumar, *et al.* 2006; Gokce, *et al.* 2007).

Há vários estudos relacionados a fatores de virulência de *C. albicans* e *C. não albicans*, mas somente poucos relatos na literatura investigam a virulência em espécies de *Candida* relacionados à localização em um sítio específico no hospedeiro. Em nosso estudo, a atividade proteolítica foi identificada em 50% (4/8) das espécies de *Candida albicans* isoladas de amostras de unhas, o que pode contribuir para o aumento da capacidade deste microrganismo em colonizar e penetrar nos tecidos do hospedeiro e evadir-se da resposta imune (Naglik *et al.*, 2004). Em adição a presença de proteinases, a produção de fosfolipases foi detectada em um número ainda maior das cepas isoladas de *C. albicans*. Oitenta e sete por cento (7/8) das espécies de *C. albicans* isoladas apresentaram fosfolipases. A presença destas enzimas na superfície desta levedura e na extremidade do pseudomicélio propicia a lesão tecidual por danificação dos constituintes lipídicos da membrana celular do hospedeiro (Niewerth, *et al.*, 2001). A atividade enzimática apresentada por *C. albicans* pode indicar maior virulência quando comparada com espécies não *albicans*.

Um dado interessante foi a presença de proteinases e fosfolipases apenas em cepas sensíveis aos antifúngicos testados. Enquanto a maioria das cepas de *C. parapsilosis* apresentaram resistência aos antifúngicos, sem a presença de proteinases ou fosfolipases, a maioria das cepas de *C. albicans* isoladas foram sensíveis às drogas, porém apresentaram atividade enzimática. Enquanto a *C. parapsilosis* vem sendo encontrada em um número cada vez maior de amostras de onicomicose (Segal *et al.*, 2000), as cepas de *C. albicans* continuam predominando em amostras sistêmicas, como aquelas coletadas do sangue periférico (Mohan *et al.*, 2008). A habilidade das cepas de *C. albicans* em secretar fosfolipases e/ou proteinases poderia favorecer a invasão do organismo, enquanto que as cepas de *C. parapsilosis* ficariam mais confinadas ao leito ungueal, sendo inclusive encontradas em unhas aparentemente saudáveis (McGinley *et al.*, 1988). Novos estudos *in vitro* e trabalhos com um número maior de pacientes são necessários para avaliar estas possibilidades.

7. CONCLUSÕES

As leveduras, particularmente *Candida parapsilosis*, desempenham um papel importante como agentes causadores de onicomicose em nossa região, apresentando perfil de resistência aos antifúngicos testados, porém com ausência da atividade de fosfolipase e proteinase.

As cepas de *C. albicans* foram isoladas em menor número, porém com atividade enzimática de fosfolipases e proteinases, e foram sensíveis aos antifúngicos testados.

Foram isoladas cepas de *C. haemulonii* de onicomicoses, apresentando o mesmo perfil da *C. parapsilosis*, com ausência de atividade enzimática e presença de resistência medicamentosa, indicando a possível emergência de um novo patógeno de doenças fúngicas ungueais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aghamirian, M. R.; Ghiasian, S. A. Onychomycosis in Iran: Epidemiology, Causative Agents and Clinical Features. **J. Med. Mycol.**, Japão, v. 51, n. 1, 2010.
2. Ahmed, R.; Kharal, S.A.; Durrani, M.A.; Sabir, M.; Chang, A.H.; Fakharuddin. Frequency of Candida in onychomycosis. **J Pak Med Assoc.** Mar, v. 63, n. 3, p. 350-353, 2013.
3. Akçaglar, S.; Ener, B.; Tore, O. Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains: a comparison of spectrophotometry and plate methods. **Turk J. Biol.** Turkey, v. 35 p. 559-567, 2011.
4. Almeida, L. M. M.; Souza, E. A. F.; Bianchin, D.B.; Svidzinski T.I.E. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **An Bras Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 249-255, 2009.
5. ANVISA. **Detecção e identificação de fungos de importância médica.** Módulo VII, 2004.
6. Araújo, A. J. G.; Bastos, O. M. P.; Souza, M. A. J.; Oliveira, J. C. Onychomycosis caused by emergent fungi: clinical analysis, diagnosis and revision. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 78, n.4, p. 445-455, jul./ago. 2003.
7. Arenas, R.; Ruiz-Esmenjaud, J. Onicomomicose na infância: uma perspectiva atual com ênfase na revisão do tratamento. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.79, n.2, p. 225-232, mar./abr. 2004.
8. Ataides, F.S.; Chaul, M.H.; El Essal, F.E.; Costa, C.R.; Souza, L.K.; Fernandes, O.F.; Silva, M.R. Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** Dec, v. 26, n. 12, p. 1479-1485, 2012.

9. Barrett-Bee, K.; Hayes, Y.; Wilson, R. G.; Ryley, J. F. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 131, n. 5, p. 1217-1221, may, 1985.
10. Belyayeva, E.; Gregoriou, S.; Chalikias, J.; Kontochristopoulos, G.; Koumantaki, E.; Makris, M.; Koti, L.; Katoulis, A.; Katsambas, A.; Rigopoulos, D. The impact of nail disorders on quality of life. **Eur J Dermatol.** Jun, n. 28, 2013.
11. Borghi, E.; Latta, R.; Sciota, R.; Biassoni, C.; Cuna, T.; Montagna, M. T.; Morace, G. Comparative Evaluation of the Vitek 2 Yeast Susceptibility Test and CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Antifungal Susceptibility of Invasive Fungal Isolates in Italy: the GISIA3 Study. **J Clin Microbiol.**, v. 48, n. 9, p. 3153–3157; September, 2010.
12. Brilhante, R. S. N.; Cordeiro, R. A.; Medrano, D. J. A.; Rocha, M. F. G.; Monteiro, A. J.; Cavalcante, C. S. P.; Meirelles, T. E. F.; Sidrim, J. J. C. Onychomycosis in ceará: epidemiological and laboratory aspects. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100. n. 2, abr., 2005.
13. Brito, A. Incidência de onicomicoses no Pará entre 1980-1990. **Anais brasileiros de dermatologia.** v. 67, n.4, p.182-183, 1992.
14. Bossche, H. V. Mechanisms of antifungal resistance. **Rev Iberoam Micol.**, v. 14, p. 44-49. 1997.
15. Candido, R. C.; Azevedo, R. V. P.; Komesu, M.C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 33, n. 5, Sept./Oct. 2000.
16. Carrillo-Muñoz, A. J.; Tur-Tur, C.; Hernández-Molina, J.M.; Santos, P.; Cárdenes, D.; Giusiano, G. Revisión-Antifúngicos disponibles para el tratamiento delas micosis ungueales. **Rev Iberoam Micol.**,; v. 27, n. 2, p. 49–56, 2010.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute (2002). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, approved standard M38-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.**
18. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2008). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27-A3, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.**
19. Costa, G. V.; Rende, J. C.; Okura, M. H. Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. **NewsLab**, v. 101, p. 202-222, 2010.
20. Cuenca-Estrella, M.; Gomez-Lopez, A.; Alastruey-Izquierdo, A.; Bernal-Martinez, L.; Cuesta, I.; Buitrago, M. J.; Rodriguez-Tudela, J. L. Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest Techniques for *In Vitro* Detection of Antifungal Resistance in Yeast Isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 48, n. 5, p. 1782–1786, May, 2010.
21. D’Eça, Jr. A.; Silva, A.; Rosa, F.; Monteiro, S.; Figueiredo, P.; Monteiro, C. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 44, p.334-338, 2011.
22. Dostál, J.; Hamal, P.; Pavlíčková, L.; Soucek, M.; Ruml, T.; Pichová, I.; Hrusková-Heidingsfeldová, O. Simple Method for Screening *Candida* Species Isolates for the Presence of Secreted Proteinases: a Tool for the Prediction of Successful Inhibitory Treatment. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 2, p. 712–716, Feb. 2003.
23. Elewski, B. E.; Charif, M. A. Prevalence of onychomycosis in patients attending a dermatology clinic in northeastern Ohio for other conditions. **Arch Dermatol.**v. 133, p. 1172-1173, 1997.
24. Elewski, B. E. Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 415–429, July, 1998.

25. Farina, C.; Manso, E.; Andreoni, S.; Conte, M.; Fazii, P.; Lombardi, G.; Sanna, S.; Russello, G. Interlaboratory evaluation of VITEK2 system and Sensititre YeastOne© for antifungal susceptibility testing of yeasts isolated from blood cultures against four antifungal agents. **New Microbiologica**, v. 34, p. 195-201, 2011.
26. Fernández, R. S.; Lázaro, P. Ochaita Anatomía quirúrgica de la unidad ungueal. **Piel**, v. 17, n. 8, p. 383-385, 2002.
27. Figueiredo, V. T.; de Assis Santos, D.; Resende, M. A.; Hamdan, J. S. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. **Mycopathologia**. Jul, v. 164, n. 1, p. 27-33, 2007.
28. Gelotar, P.; Vachhani, S.; Patel, B.; Makwana, N. Prevalence of Fungi in Fingernail Onychomycosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 2, p. 250-252, feb, 2013.
29. Gokce, G.; Cerikcioglu, N.; Yagei, A. Acid proteinase, phospholipase and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, p. 265-269, 2007.
30. Grover, C.; Khurana, A. Onychomycosis: Newer insights in pathogenesis and diagnosis **Indian J Dermatol Venereol Leprol.**, v.78, n. 3, p. 263-270, 2012.
31. Gualco L.; Debbia E. A.; Bandettini R.; Pescetto L.; Cavallero A.; Ossi M. C.; Schito A. M.; Marchese A. Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 2, p. 179-184, February, 2007.
32. Yadav, S.; Saxena, A.K.; Capoor, M.R.; Ramesh, V. Comparison of direct microscopic methods using potassium hydroxide, periodic acid Schiff, and calcofluor white with culture in the diagnosis of onychomycosis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 79, p. 242-243, 2013.

33. Koga-Ito, C. Y. et al.; Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. **Mycopathologia**, v. 161, p. 219-223, 2006.
34. Komiyama, E. Y.; Santos S. S. F.; Jorge A. O. C.; Martins, C. A. P; Koga-ito, C. Y. Produção de exoenzimas Por amostras de *Candida albicans* isoladas de Pacientes com Periodontite crônica e indivíduos-controle. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 19, n. 3, p. 288-292, set-dez, 2007.
35. Kumar, C.P.G.; Kumar, S. S. J., Menon, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, v. 161, p. 213-218, 2006.
36. Leelavathi, M.; Tzar, M. N.; Adawiah, J. Common Microorganisms causing onychomycosis in tropical climate. **Sains Malaysiana**, v. 41, n. 6, p. 697-700, 2012.
37. Lima, K. M.; Delgado, M.; Rego, R. S. M.; Castro, C. M. M. B. *Candida albicans* e *Candida tropicalis* Isoladas de onicomicose em pacientes HIV-positivo: co-resistência in vitro aos azólicos. **Rev. Patologia tropical**, v. 37, n. 1, p. 57-64, jan-abr, 2008.
38. Llambrich, A.; Lecha, M. Tratamiento actual de las onicomicosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 19, p. 127-129, 2002.
39. Lopes, J.O.; Alves, S.H.; Mari, C.R.D.; Oliveira, L.T.O.; Brum, L.M.; Westphalen, J.B. A tenyear survey of onychomycosis in the Central Region of the Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop**. v.41, p.147-149, 1999.
40. López-Jodra, O.; Torres-Rodríguez, J. M. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomicosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 16, p.11-15, 1999.

41. Macêdo, D. P. C.; Farias, A. M. A.; Neto, R. G. L.; Silva, V. K. A.; Leal, A. F. G.; Neves, R. P. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.42, n.2, p. 188-191, mar/abr, 2009.
42. Martelozzo IC, Guilhermetti E, Svidzinski TIE. Ocorrência de onicomicose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum: Health Science**, v. 27, p. 177-182, 2005.
43. Martins, E. A.; Guerrer, L. V.; Cunha, K. C.; Soares, M. M. C. N.; Almeida, M. T. G. Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do rio Preto. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 5, p. 596-598, set-out, 2007.
44. Meurman, O.; Koskensalo, A.; Rantakokko-Jalava, K. Evaluation of Vitek 2 for identification of yeasts in the clinical laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n.6, p. 591–593, June, 2006.
45. Midgley, G.; Moore, M. K. Onychomycosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 15, p. 113-117, 1998.
46. Milobratović, D.; Janković, S.; Vukičević, J.; Marinković, J.; Janković, J.; Railić, Z. Quality of life in patients with toenail onychomycosis. **Mycoses**. Sep, v. 56, n. 5, p. 543-551, 2013.
47. Mujica, M.T.; Finquelievich, J.L.; Jewtuchowicz, V.; Iovannitti, C. A. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999-2001. **Rev Argent Microbiol**. Jul-Sep, v. 36, n. 3, p. 107-112, 2004.
48. Mikaeili, A.; Karimi, I. The Incidence of Onychomycosis Infection among Patients Referred to Hospitals in Kermanshah Province, Western Iran. **Iran J Public Health**. v. 42, n.3, p. 320–325, 2013.
49. Mohan, V.; Ballal, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, p. 208-210, 2008.

50. Mukherjee, P. K.; Leidich, S. D.; Isham, N.; Leitner, I.; Ryder, N. S.; Ghannoum, M. A. Clinical *Trichophyton rubrum* Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. **Antimicrob agents and chemother**, v. 47, n. 1, p. 82–86, Jan. 2003.
51. Naglik, J.; Albrecht, A.; Bader, O.; Hube, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 915–926, October, 2004.
52. Nazar, J. R.; Gerosa, P. E.; Díaz, O. A. Onicomicosis: epidemiologia, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio. **Rev. Argentina de Microbiol**, v. 44, p. 21-25, 2012.
53. Niewerth, M.; Korting, H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 44, p. 361-367, 2001.
54. Oliveira, E. E.; Silva, S. C.; Soares, A. J.; Attux, C.; Cruvinel, B.; Silva, M. R. R. Toxinas *killer* e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.31, n.6, nov-dec, 1998.
55. Ombrella, A.; Racca, L.; Ramos, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Rev Iberoam Micol.* v. 25, p.12-16, 2008.
56. Pappas, P.G.; Rex, J.H.; Sobel, J.D.; Filler, S.G.; Dismukes, W.E.; Walsh, T.J.; Edward, J.E. Diretrizes para o Tratamento de Candidíase. **Clinical Infections Disease**, n. 38, p. 161-189, 2004.
57. Peres, N. T. A.; Maranhão, F. C. A.; Rossi, A.; Martinez-Rossi, N. M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngica. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 5, p. 657-667, set-out, 2010.

58. Pinheiro A. Q., Moreira J. L. B.; Sidrim, J. J. C. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 287-294, julho, 1997.
59. Posteraro, B.; Martucci, R.; La Sorda, M.; Fiori, B.; Sanglard, D.; Carolis, E.; Florio, A. R.; Fadda, G.; Sanguinetti, M. Reliability of the Vitek 2 Yeast Susceptibility Test for Detection of In Vitro Resistance to Fluconazole and Voriconazole in Clinical Isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **J Clin Microbiol.**, v. 47, n. 6, p. 1927–1930, june, 2009.
60. Reich, A.;Szepietowski, J.C.; Health-related quality of life in patients with nail disorders. **Am J Clin Dermatol.** Oct, v. 12, n. 5, p.313-320, 2011.
61. Rizzeto, L.; Giovannini, G.; Bromley, M.; Bowyer, P.; Romani, L.; Cavalieri, D. Strain Dependent Variation of Immune Responses to *A. fumigatus*: Definition of Pathogenic Species. **PLoS One.** v. 8; n. 2, 2013.
62. Roberts, D. T. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: results of na omnibus survey. **Br J Dermatol.** Feb; 126 Suppl. 39: 23-7, 1992.
63. Rörig, K. C. O.; Colacite, J.; Abegg, M. A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 42, n. 2, mar-abr, 2009.
64. Ruchel, R.; Boning, B.; Borg, M. Characterization of a Secretory Proteinase of *Candida parapsilosis* and Evidence for the Absence of the Enzyme during Infection In Vitro. **Infect. Immun.**, v. 53, n. 2, p. 411-419, Aug, 1986.
65. Rubeena, L.; Deeba, B.; Shabir, A.; Arshi, S.; Syed, K. A Study on Clinico-Mycolological Profile, Aetiological Agents and Diagnosis of Onychomycosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research.**, v. 7, n.9, p. 1983-1985, Sept, 2013.
66. Rubio, M. C.; Rezusta, A.; Tomás, J. G.; Ruesca, R. B. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. **Rev Iberoam Micol**, v. 16, p. 16-22, 1999.

67. Segal, R.; Kimchi, A.; Kritzman, A.; Inbar, R.; Segal, Z. The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. **Mycoses**. Oct, v. 43, n. 9-10, p.349-353, 2000.
68. Schaller, M.; Borelli, C.; Korting, H.C.; Hube, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**. Nov, v. 48, n. 6, 365-377, 2005.
69. Schulze J, Sonnenborn U. Yeasts in the Gut: From Commensals to Infectious Agents. *Dtsch Arztebl Int*, v. 106, p. 837-842, 2009.
70. Shenoy, M. M.; Teerthanath S.; Karnaker V. K.; Girisha B. S.; Krishna P. M. S.; Pinto J. 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**, v. 74, n. 3, p. 226-229. May-Jun, 2008.
71. Silva, L. B.; de Oliveira, D. B.; da Silva, B. V., de Souza, R. A.; da Silva, P. R.; Ferreira-Paim, K.; Andrade-Silva, L.E.; Silva-Vergara, M. L.; Andrade, A. A. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. Apr, 2013.
72. Singaravelu, K.; Gácsér, A.; Nosanchuk, J.D. Genetic determinants of virulence *Candida parapsilosis*. **Rev Iberoam Micol**. Nov, 2013.
73. Siqueira, E. R.; Ferreira, J. C.; Maffei, C. M. L.; Candido, R. C. Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 3, p. 269-271, mai-jun, 2006.
74. Souza, L.K.H; Fernandes, O.F.L.;Passos, X.S.;Costa, M.;Souza, A.H.;Silva, M.R.R. Comparação dos métodos de identificação de leveduras por técnicas manuais com o método automatizado microscan rapid yeast identification panel. **Rev. Patologia trop.** v. 30, n. 1, p. 23-29, jan.-jun. 2001.

75. Souza, E.A.F.; Almeida, L.M.; Guilhermetti, E.; Mota, V.A.; Rossi, R.M., Svidzinski, T.I.E. Frecuencia de onicomicoses por leveduras em Maringa, Parana, Brasil. **An Bras Dermatol.** v. 82, n. 2, p. 151-156, 2007.
76. Staniszewska, M.; Bondaryk, M.; Piłat, J.; Siennicka, K.; Magda, U.; Kurzatkowski, W. Virulence factors of *Candida albicans*. **Przegl Epidemiol.**v. 66, n. 4, 629-633, 2012.
77. Tamura, N.K.; Negri, M.F.N.; Bonassoli, L.A.; Svidzinski, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, jan-fev, 2007.
78. Tang, W. Nail and Nail Disorders. **Medical Bulletin.** v.15, n.11, nov., 2010.
79. Vasconcellos C.; Pereira C.Q.M.; Souza, M.C.; Pelegri, A.; Freitas, R.S.; Takahashi, J.P. Identification of fungi species in the onychomycosis of institutionalized elderly. **An Bras Dermatol.** v. 88, n. 3, p. 377-380, 2013.
80. Van de Veerdonk, F.L.; Kullberg, B.J.; van der Meer, J.W.; Gow, N.A.; Netea, M.G. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Curr Opin Microbiol.** v. 11, n. 4, p. 305-312, 2008.
81. Vélez A, Linares MJ, Fenández-Roldán JC, Casal M. Study of onychomycosis in Cordoba, Spain: prevailing fungi and pattern of infection. **Mycopathologia.** v.137, n.1, p.1-8, 1997.
82. Villar, L.A.C.; Díaz, F.A.Q.; Céspedes, J.I.; Alix, T.; De Bedout, C. Prevalencia de patrones de sensibilidad al Fluconazol de las especies de *Candida* aisladas en pacientes de Unidades de Cuidado Intensivo de Bucaramanga, Colombia. **Infectio.** v. 8, n. 3, p. 191-193, 2004.

83. Wagner, D. K.; Sohnle, P. G. Cutaneous Defenses against Dermatophytes and Yeasts. **Clinic Microbiol Rev**, v. 8, n. 3, p. 317–335, July, 1995.

84. Weinberg, J.M.; Koestenblatt, E.K.; Tutrone W.D.; Tishler, H.R.; Najarian, L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. **J Am Acad Dermatol**, v. 49, p.193-7, 2003.

85. Weitzman, I.; Summerbell, R. C. The Dermatophytes. **Clinic Microbiol Rev**, v. 8, n. 2, p. 240–259, April, 1995.