

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**PREVALÊNCIA DE DERMATOMICOSSES NOS
MEMBROS INFERIORES EM DOENTES
DIABÉTICOS. AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS
FACTORES PREDISPOONENTES PARA A INFECCÃO.**

Helena Luísa Fernandes Reis Simões Parada

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**PREVALÊNCIA DE DERMATOMICOSSES NOS
MEMBROS INFERIORES EM DOENTES
DIABÉTICOS. AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS
FACTORES PREDISPOANTES PARA A INFECCÃO.**

Helena Luísa Fernandes Reis Simões Parada

Dissertação orientada por:

Orientadora externa

Doutora Maria Laura Martins Rosado de Sousa
Unidade de Micologia
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P.

Orientadora interna

Professora Doutora Deodália Dias
Departamento de Biologia Animal/Centro de Biologia Ambiental
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2007

Mucho aprenderemos en los libros, pero más aprenderemos en la contemplación de la Naturaleza, causa y ocasión de todos los libros. Toda descripción por objetiva e ingenua que parezca, constituye interpretación personal, punto de vista propio del autor. Sabido es que el hombre mezcla en todo su personalidad, y cuando cree fotografiar el mundo exterior, a menudo se contempla y se retrata a sí mismo.

SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Deodália Dias, Professora Catedrática e Coordenadora do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), desejo expressar o meu sincero reconhecimento por ter aceite ser orientadora interna desta dissertação. Agradeço, também, a solicitude que demonstrou quando lhe pedi esclarecimentos, a leitura e a revisão cuidada do presente trabalho bem como as sugestões feitas. Desejo, ainda, exprimir, uma palavra de gratidão pela sua disponibilidade, simpatia e afabilidade.

À Doutora Maria Laura Martins Rosado de Sousa, Coordenadora da Unidade de Micologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P. (INSA, I.P.), agradeço reconhecidamente o facto de ter aceite ser orientadora científica externa desta dissertação, os contactos que estabeleceu durante o período de organização do projecto científico, o tempo que dedicou à orientação do trabalho experimental e os preciosos ensinamentos e conhecimentos que me transmitiu ao longo de todo o trabalho prático, fruto dos seus longos anos de experiência, formação e permanente actualização na área da Micologia Clínica e Ambiental. O meu sincero obrigado pela sua disponibilidade permanente, pela atenta revisão crítica do presente trabalho, bem como pelas sugestões efectuadas. Em especial, desejo agradecer profundamente a confiança depositada no meu desempenho, as palavras de encorajamento, os conselhos, a afabilidade e, sobretudo, o carinho com que me acolheu quando iniciei funções no laboratório, proporcionando a minha integração.

À Dra. Cristina Veríssimo, Técnica Superior de Saúde do Ramo de Laboratório na Unidade de Micologia do INSA, I.P., agradeço reconhecidamente o tempo que dedicou à orientação e organização do trabalho experimental, a preciosa colaboração na preparação do projecto e das comunicações científicas, a sua disponibilidade e apoio permanente, bem como as críticas e sugestões efectuadas. O meu sincero obrigado pelas suas palavras de encorajamento e os seus conselhos e, sobretudo, pela sua simpatia e lealdade.

Ao Dr. José Boavida, Director Clínico da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (APDP), ao Dr. Rui Duarte, médico de Clínica Geral na mesma Associação, à Dra. Zulmira Peerally, responsável pelo Laboratório da APDP, ao Enf. Rui Oliveira e a toda a equipa da Consulta de Podologia da APDP, apresento o meu agradecimento pelo interesse manifestado pelo projecto científico e pela preciosa colaboração prestada durante o período de obtenção das amostras, indispensáveis à realização do presente estudo.

À Dra. Raquel Sabino desejo agradecer toda a disponibilidade, colaboração laboratorial, apoio técnico prestado e os conhecimentos que me transmitiu ao longo do trabalho experimental. O meu sincero obrigado pelos seus conselhos, estímulo e, sobretudo, pela sua amizade.

À Dra. Célia Alves desejo manifestar o meu agradecimento pelas suas palavras de apoio e incentivo, disponibilidade, colaboração laboratorial e apoio técnico prestado. O meu especial obrigado pela sua simpatia, optimismo e, sobretudo, pela sua amizade.

Ao Dr. João Brandão desejo agradecer a sua disponibilidade, sugestões efectuadas durante a elaboração do projecto científico e ajuda na tradução do texto para a elaboração de *poster* científico, no âmbito do presente trabalho, apresentado em congresso nacional.

À Mestre Paula Alves o meu agradecimento pelo apoio prestado no decurso da preparação das comunicações científicas, colaboração laboratorial e, sobretudo, pelas suas palavras de incentivo.

À D. Nazaré Ventura o meu sincero obrigado pela colaboração laboratorial e pela sua disponibilidade e simpatia.

Ao Dr. Baltazar Nunes agradeço a sua disponibilidade e ajuda na análise dos dados obtidos e no tratamento estatístico dos resultados.

À D. Mira Benedito o meu obrigado pela sua disponibilidade e ajuda na tradução do resumo do presente trabalho.

A todos os que, de algum modo, contribuíram para a realização do presente trabalho o meu agradecimento por todo o apoio prestado.

Por fim, à minha Família, desejo expressar o meu reconhecimento pela presença, apoio, encorajamento e conselhos prestados no decurso de mais uma etapa importante da minha e das suas vidas. Em particular ao meu marido, o meu agradecimento pela ajuda efectuada no decurso da preparação das comunicações científicas e durante o processamento de texto do presente trabalho. À minha filha Mariana, em especial, desejo expressar todo o meu amor e pedir desculpa por todos os segundos, minutos e horas em que não lhe pude dispensar toda a atenção que desejava poder ter dado.

RESUMO

INTRODUÇÃO – Os doentes imunocomprometidos, entre os quais o grupo de doentes diabéticos, são particularmente susceptíveis às infecções fúngicas uma vez que a alteração do seu sistema imunológico compromete as suas defesas naturais, por exemplo ao nível da pele e das unhas. Neste enquadramento, e uma vez que são escassos os dados referentes a infecções fúngicas superficiais em doentes diabéticos no nosso país, será importante a realização de um estudo prospectivo que permita determinar a sua prevalência e os eventuais factores predisponentes para a infecção.

OBJECTIVOS – Avaliar a presença de dermatomicoses nos membros inferiores em doentes diabéticos e comparar os resultados obtidos com uma população controlo; Averiguar quais as espécies fúngicas prevalentes nas duas populações; Correlacionar os factores predisponentes com a positividade das amostras na população diabética; Contribuir para a implementação na rotina laboratorial do método de difusão em agar para determinação da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de dermatófitos aos antifúngicos.

MATERIAL DE ESTUDO – Entre Março e Agosto de 2007, efectuaram-se colheitas de pele e/ou de unhas dos membros inferiores em 163 doentes diabéticos seguidos na Consulta de Podologia da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal, em Lisboa, e em 141 pacientes não diabéticos, com suspeita clínica de dermatomicose, que efectuaram análises micológicas no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P., em Lisboa.

RESULTADOS – A prevalência de dermatomicoses nos membros inferiores na população diabética foi de 43,6%. Em ambas as populações, as infecções mais frequentes foram as onicomicoses seguidas de *tinea pedis*. Os agentes etiológicos isolados em doentes diabéticos com culturas positivas foram: leveduras 45,5%; dermatófitos 31,3%; outros fungos filamentosos queratinofílicos 23,2%. *Trichophyton rubrum* foi o dermatófito mais frequentemente isolado em pacientes diabéticos e não diabéticos. Os resultados do nosso estudo demonstram a existência de associação entre a diabetes tipo 2 e a presença de dermatomicoses na população diabética.

Palavras-chave: agentes etiológicos; dermatomicoses; diabetes; factores predisponentes; susceptibilidade *in vitro*

ABSTRACT

INTRODUCTION – The immunosuppressed patients, including the diabetic group of patients, are particularly susceptible to fungal infections because the modifications that occur in their immunologic system compromise their natural defences, for instance at skin and nail levels. Given that superficial fungal infections data in diabetic patients are scarce in our country, it is important to carry out a prospective study to determine the prevalence and predisposing factors for the infection.

OBJECTIVES – Evaluate the presence of dermatomycosis in lower limbs in diabetic patients and compare the results obtained with those in the control population; Determine the prevalence of fungal species in both populations; Correlate the predisposing factors with the positivity of samples in the diabetic population; Contribute to the implementation of the agar diffusion method in laboratorial routine to determine the *in vitro* susceptibility of dermatophyte strains to antifungals.

STUDY MATERIAL – Between March and August 2007, we collected biologic samples of the skin and/or nails in lower limbs from 163 diabetic patients followed on Podiatry consultation at the Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal, in Lisbon, and from 141 non diabetic patients clinically monitored for dermatomycosis at the Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P., in Lisbon.

RESULTS – The prevalence of dermatomycosis in lower limbs in the diabetic population was 43,6%. In both populations, the most frequent infections were onychomycosis, followed by *tinea pedis*. The isolated etiological agents in diabetic patients who presented positive cultures were: yeasts 45,5%; dermatophytes 31,3%; other filamentous keratinophilic fungi 23,2%. *Trichophyton rubrum* was the most frequently isolated dermatophyte fungi in diabetic and non diabetic patients. Based on our data we have evidenced that type 2 diabetes is associated with the presence of dermatomycosis in the diabetic population.

Key words: etiological agents; dermatomycosis; diabetes; predisposing factors; *in vitro* susceptibility

ÍNDICES

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
ÍNDICES.....	8
ÍNDICE GERAL.....	8
ÍNDICE DE QUADROS.....	13
ÍNDICE DE FIGURAS.....	16
ABREVIATURAS.....	20
PREFÁCIO.....	23
I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....	27
1. DERMATOMICOSSES.....	27
1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS DERMATOMICOSSES.....	29
1.1.1. DERMATOMICOSSES SEM INVASÃO DO TECIDO VIVO.....	31
1.1.2. DERMATOMICOSSES COM INVASÃO DO TECIDO VIVO.....	32
1.1.2.1. DERMATOMICOSSES DA PELE.....	32
1.1.2.2. DERMATOMICOSSES DAS UNHAS.....	34
1.1.2.3. DERMATOMICOSSES DOS CABELOS E PÊLOS.....	34
1.2. FACTORES PREDISONENTES DE DERMATOMICOSSES.....	36
1.2.1. FACTORES EXTRÍNSECOS.....	36

1.2.2. FACTORES INTRÍNSECOS.....	37
2. FUNGOS DERMATÓFITOS.....	38
2.1. TAXONOMIA.....	38
2.2. MORFOLOGIA.....	41
2.2.1. MORFOLOGIA MACROSCÓPICA.....	41
2.2.2. MORFOLOGIA MICROSCÓPICA.....	41
2.2.2.1. ESPOROS.....	42
2.2.2.2. FORMAÇÕES ORNAMENTAIS.....	43
2.3. REPRODUÇÃO.....	45
2.4. PATOGENIA DOS FUNGOS DERMATÓFITOS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO.....	45
2.5. EPIDEMIOLOGIA.....	46
3. OUTROS FUNGOS FILAMENTOSOS POTENCIALMENTE QUERATINOFÍLICOS.....	49
4. FUNGOS LEVEDURIFORMES.....	52
4.1. MORFOLOGIA, REPRODUÇÃO, POSIÇÃO TAXONÓMICA E ECOLOGIA.....	52
4.2. GÉNERO <i>CANDIDA</i>	53
4.2.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ECOLOGIA.....	53
4.2.2. POSIÇÃO TAXONÓMICA.....	54
4.2.3. CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO.....	54
4.2.4. MORFOLOGIA.....	54
4.2.5. REPRODUÇÃO.....	55
4.2.6. FISIOLOGIA.....	56
4.2.7. CANDIDÍASE.....	56
4.2.7.1. QUADROS CLÍNICOS.....	57
4.2.7.2. PATOGENIA E SUSCEPTIBILIDADE PARA A INFECCÃO.....	57
4.2.7.3. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO.....	58
5. TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA.....	60
6. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i>.....	64
7. DERMATOMICOSSES E DOENTES DIABÉTICOS.....	68

II – PROJECTO CIENTÍFICO.....	72
1. OBJECTIVOS.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1. MATERIAL DE ESTUDO.....	73
2.2. POPULAÇÕES ESTUDADAS.....	73
2.3. PROTOCOLO CLÍNICO.....	74
2.4. COLHEITAS.....	76
2.5. ESTUDO MICOLÓGICO.....	78
2.5.1. PESQUISA DIRECTA.....	82
2.5.1.1. EXAME DIRECTO.....	82
2.5.2. MÉTODO CLÁSSICO DE ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E DE FUNGOS LEVEDURIFORMES.....	84
2.5.2.1. CULTURAS.....	84
2.5.3. MÉTODO CLÁSSICO DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	88
2.5.3.1. MÉTODO DE REPICAGEM.....	89
2.5.3.2. EXAME MICROSCÓPICO.....	90
2.5.3.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS.....	92
2.5.3.3.1. ACTIVIDADE UREÁSICA.....	92
2.5.4. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS LEVEDURIFORMES.....	93
2.5.4.1. OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS.....	93
2.5.4.2. MEIO CROMOGÉNICO DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	94
2.5.4.3. MICROMÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS LEVEDURIFORMES.....	95
2.5.5. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> AOS ANTIFÚNGICOS.....	98
2.5.5.1. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE FUNGOS LEVEDURIFORMES AOS ANTIFÚNGICOS.....	98
2.5.5.2. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE ESTIRPES DE DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS.....	100
2.6. PROGRAMAS DE TRATAMENTO ESTATÍSTICO E DE ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS.....	103

3. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS.....	104
3.1. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DERMATOMICOSSES NA POPULAÇÃO DIABÉTICA.....	104
3.2. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DERMATOMICOSSES NA POPULAÇÃO CONTROLO.....	106
3.3. AGENTES ETIOLÓGICOS ISOLADOS NA POPULAÇÃO DIABÉTICA.....	108
3.4. AGENTES ETIOLÓGICOS ISOLADOS NA POPULAÇÃO CONTROLO.....	122
3.5. CORRELAÇÃO DOS FACTORES PREDISPOONENTES COM A POSITIVIDADE DAS AMOSTRAS NA POPULAÇÃO DIABÉTICA.....	138
3.6. CORRELAÇÃO DOS FACTORES PREDISPOONENTES COM A POSITIVIDADE DAS AMOSTRAS NA POPULAÇÃO CONTROLO.....	144
3.7. SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE FUNGOS LEVEDURIFORMES ISOLADOS NA POPULAÇÃO DIABÉTICA AOS ANTIFÚNGICOS.....	145
3.8. SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE ESTIRPES DE FUNGOS DERMATÓFITOS ISOLADOS NA POPULAÇÃO DIABÉTICA AOS ANTIFÚNGICOS.....	150
4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	158
5. CONCLUSÕES.....	181
BIBLIOGRAFIA.....	183
ANEXOS.....	191
ANEXO I.....	191
CONSENTIMENTO INFORMADO.....	191
PROTOCOLO CLÍNICO.....	193
PROTOCOLO LABORATORIAL.....	194
ANEXO II.....	196
COMPOSIÇÃO DOS LÍQUIDOS DE MONTAGEM.....	196
ANEXO III.....	198

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.....	198
ANEXO IV	204
DISCOS PARA SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	204
TIRAS DE E-TEST PARA SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	204
ANEXO V	205
BASES DE DADOS DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS (em suporte informático).....	205

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO I – Cronograma proposto para a realização do projecto científico.....	25
QUADRO II – Agentes etiológicos a valorizar, entre outros descritos na literatura, no estudo micológico de produtos biológicos queratinizados.....	81
QUADRO III – Susceptibilidade <i>in vitro</i> a diversos antifúngicos. Interpretação de resultados.....	99
QUADRO IV – Amostras de produtos biológicos colhidas na população diabética.....	104
QUADRO V – Avaliação da presença de dermatomicoses na população diabética.....	105
QUADRO VI – Frequência de dermatomicoses na população diabética de acordo com a localização da lesão.....	105
QUADRO VII – Amostras de produtos biológicos colhidas na população controlo.....	106
QUADRO VIII – Avaliação da presença de dermatomicoses na população controlo....	107
QUADRO IX – Frequência de dermatomicoses na população controlo de acordo com a localização da lesão.....	107
QUADRO X – Grupos de fungos e respectivas espécies fúngicas isoladas em doentes diabéticos com culturas positivas.....	109
QUADRO XI – Frequência das espécies fúngicas isoladas na população diabética de acordo com a localização da lesão.....	112

QUADRO XII – Infecções mistas encontradas em doentes diabéticos (n = 13), a partir de amostras de pele e/ou de unhas dos pés.....	120
QUADRO XIII – Diferentes agentes etiológicos isolados em doentes diabéticos (n = 7) responsáveis por <i>tinea pedis</i> e onicomicose.....	121
QUADRO XIV – Grupos de fungos e respectivas espécies fúngicas isoladas em pacientes não diabéticos com culturas positivas.....	123
QUADRO XV – Frequência das espécies fúngicas isoladas na população controlo de acordo com a localização da lesão.....	126
QUADRO XVI – Infecções mistas encontradas em pacientes não diabéticos (n = 9), a partir de amostras de pele e/ou de unhas dos pés.....	136
QUADRO XVII – Diferentes agentes etiológicos isolados em pacientes não diabéticos (n = 5) responsáveis por <i>tinea pedis</i> ou onicomicose.....	137
QUADRO XVIII – Possíveis factores predisponentes associados com dermatomicoses na população diabética, por análise de protocolo clínico previamente elaborado.....	138
QUADRO XIX – Possíveis factores predisponentes associados com dermatomicoses na população controlo, por análise de ficha de identificação do utente.....	144
QUADRO XX – Susceptibilidade <i>in vitro</i> de estirpes de leveduras isoladas na população diabética (n = 17), nos meios de cultura sólidos, a diversos antifúngicos (Método dos discos). Total de estirpes sensíveis, intermédias e resistentes.....	146

QUADRO XXI – Estirpes de leveduras, isoladas na população diabética (n = 17), sensíveis <i>in vitro</i> aos vários antifúngicos (Método dos discos).....	148
QUADRO XXII – Susceptibilidade <i>in vitro</i> de estirpes de dermatófitos isoladas na população diabética (n = 31) a diversos antifúngicos (Método dos discos). Total de estirpes presumivelmente sensíveis, intermédias e resistentes.....	151
QUADRO XXIII – Estirpes de dermatófitos, isoladas na população diabética, presumivelmente sensíveis <i>in vitro</i> aos vários antifúngicos (Método dos discos).....	154
QUADRO XXIV – Susceptibilidade <i>in vitro</i> de estirpes de dermatófitos isoladas na população diabética (n = 31) ao antifúngico Posaconazol (Método E-test).....	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Aspecto microscópico dos dermatófitos em cultura: a) micélio septado; b) artrosporos; c) clamidósporos; d) microconídios em acládio; e) microconídios em cruz de Lorraine; f) macroconídio do género <i>Microsporum</i> ; g) macroconídio do género <i>Trichophyton</i> ; h) macroconídios do género <i>Epidermophyton</i> ; i) hifas em espiral; j) micélio em raquete; k) micélio pectinado; l) e m) candelabros fávicos; n) corpos nodulares (Extraído de Martins, 1993).....	44
Figura 2 – Aspecto clínico de dermatomicose da pele.....	77
Figura 3 – Colheita de pele.....	77
Figura 4 – Aspecto clínico de dermatomicose das unhas.....	77
Figura 5 – Colheita de unhas.....	77
Figura 6 – Amostra biológica de unha proveniente da população controlo. Placa de petri com fragmentos de unha e zaragatoa da respectiva lesão ungueal.....	78
Figura 7 – Fungo dermatófito.....	80
Figura 8 – Fungo filamentoso não dermatófito.....	80
Figura 9 – Fungo leveduriforme.....	80
Figura 10 – Preparação de exame directo de unha em KOH 30%.....	83
Figura 11 – Exame directo de unha em KOH 30%. Observação de hifas (H = hifas). 400 x.....	83

Figura 12 – Sementeira de pele ou de unha em meios de cultura sólidos: <i>Agar Micobiótico</i> (Difco) e <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Difco) com cloranfenicol.....	85
Figura 13 – Colocação de zaragatoa de lesão de pele ou de unha em meio de cultura líquido: <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Difco) com cloranfenicol.....	85
Figura 14 – Colónias de <i>Trichophyton rubrum</i> em <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Difco) com cloranfenicol. Fungo filamentosos em <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Difco) com cloranfenicol. Primoculturas em <i>Agar Micobiótico</i> (Difco), <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Difco) com cloranfenicol e <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Difco) com cloranfenicol.....	86
Figura 15 – Colónias de <i>Aspergillus flavus</i> em <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Difco) com cloranfenicol. Fungo filamentosos em <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Difco) com cloranfenicol. Primoculturas em <i>Agar Micobiótico</i> (Difco), <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Difco) com cloranfenicol e <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Difco) com cloranfenicol.....	86
Figura 16 – Colónias de <i>Candida parapsilosis</i> em <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Difco) com cloranfenicol. Depósito de leveduras em <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Difco) com cloranfenicol. Primoculturas em <i>Agar Micobiótico</i> (Difco), <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Difco) com cloranfenicol e <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Difco) com cloranfenicol.....	87
Figura 17 – <i>Trichophyton rubrum</i> . Reisolamento em <i>Malte Agar</i> (Difco) com cloranfenicol.....	89
Figura 18 – <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> . Reisolamento em <i>Malte Agar</i> (Difco) com cloranfenicol.....	89
Figura 19 – Colónia de fungo filamentosos (<i>Alternaria spp.</i>) em <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Difco) com cloranfenicol e respectiva subcultura em <i>Malte Agar</i> (Difco) com cloranfenicol.....	90

Figura 20 – Corte de colónia de fungo filamentosos.....	90
Figura 21 – Preparação de exame microscópico de fungo filamentosos em azul de lactofenol.....	90
Figura 22 – <i>Epidermophyton floccosum</i> . Exame microscópico de fragmento de colónia. 400 x.....	91
Figura 23 – <i>Scedosporium spp.</i> . Exame microscópico de fragmento de colónia. 400 x..	91
Figura 24 – Esquema prático de orientação para a identificação dos géneros de fungos filamentosos de interesse clínico (Adaptado de Grillot, 1996).....	92
Figura 25 – Depósito de leveduras em <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> (Difco) com cloranfenicol e respectiva subcultura em <i>Candida ID</i> ® (bioMérieux).....	94
Figura 26 – Flora leveduriforme mista: <i>Candida albicans</i> e <i>Candida spp.</i> . Subcultura em <i>Candida ID</i> ® (bioMérieux).....	95
Figura 27 – <i>Candida parapsilosis</i> . Subcultura em <i>Candida ID</i> ® (bioMérieux).....	95
Figura 28 - Galeria de identificação de leveduras <i>ID 32 C</i> ® (bioMérieux).....	96
Figura 29 – Procedimento experimental do micrométodo de identificação de leveduras: <i>ID 32 C</i> ® (bioMérieux) (Extraído da bula do kit <i>ID 32 C</i> ® (bioMérieux))..	97
Figura 30 – Susceptibilidade <i>in vitro</i> de estirpe de <i>Candida parapsilosis</i> a vários antifúngicos pelo método dos discos. Visualização dos halos ou zonas de inibição formadas.....	99

Figura 31 – Susceptibilidade <i>in vitro</i> de estirpe de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (A) e de estirpe de <i>Trichophyton soudanense</i> (B) a vários antifúngicos pelo método dos discos. Visualização dos halos ou zonas de inibição formadas.....	102
Figura 32 – Susceptibilidade <i>in vitro</i> de estirpe de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (A) e de estirpe de <i>Epidermophyton floccosum</i> (B) ao Posaconazol pela técnica de E-test. Visualização das elipses formadas.....	103
Figura 33 – Distribuição dos diferentes grupos de fungos e respectivas espécies fúngicas isoladas em doentes diabéticos com culturas positivas.....	111
Figura 34 – Agentes etiológicos responsáveis pelas dermatomicoses na população diabética.....	119
Figura 35 – Distribuição dos diferentes grupos de fungos e respectivas espécies fúngicas isoladas em pacientes não diabéticos com culturas positivas.....	125
Figura 36 – Agentes etiológicos responsáveis pelas dermatomicoses na população controlo.....	135
Figura 37 – Sensibilidade <i>in vitro</i> de estirpes de leveduras isoladas na população diabética (n = 17) aos vários antifúngicos testados (Método dos discos).....	149
Figura 38 – Sensibilidade <i>in vitro</i> de estirpes de dermatófitos isoladas na população diabética (n = 31) aos vários antifúngicos testados (Método dos discos).....	155

ABREVIATURAS

-; →	a
ATCC	“American Type Culture Collection”
Ac	Anticorpos
AO	Antidiabéticos orais
Ag	Antígenos
APDP	Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal
β	Beta
CLSI	“Clinical and Laboratory Standard Institute”
pH	Coeficiente que caracteriza a acidez ou basicidade de um meio (p = potencial; H = hidrogénio)
CMI	Concentração mínima inibitória
Ø	Diâmetro
etc.	E outras coisas mais
Enf.	Enfermeiro
Controlo A1c	É uma análise fundamental na monitorização do doente diabético, idealmente doseada de 3 em 3 meses, que permite dosear a glucose que está ligada à hemoglobina no interior dos glóbulos vermelhos. Como a vida média destes em circulação é de 3 meses, esta análise permite avaliar o comportamento dos últimos 2 a 3 meses. Portanto, pode saber-se se a compensação da diabetes, necessita de uma correcção no seu tratamento.
ARN ribossomal (<i>rRNA</i>)	É um ARN, que, quando associado a certas proteínas semelhantes às histonas, é o principal constituinte dos ribossomas da célula
EUCAST	“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
ECMM	“European Confederation of Medical Mycology”
ex.	Exemplo
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
IDF	Federação Internacional de Diabetes
FD	Fungo dermatófito

FFND	Fungo filamentoso não dermatófito
FL	Fungo leveduriforme
g	Gramma
° C	Graus <i>Celsius</i> (centígrados)
HbA1c	Hemoglobina A1c (HbA1c) ou hemoglobina glicosilada ou glicohemoglobina
KOH	Hidróxido de potássio
h	Hora
=	Igual a
I	Intermédia
IC	Intervalo de Confiança
INSA, I.P.	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P.
i.e.	Isto é
LCR	Líquido cefalo-raquidiano
L	Litro
ARN	Macromolécula formada por nucleótidos de adenina, guanina, citosina e uracilo. O número de nucleótidos varia entre 75 e vários milhares. A cadeia molecular do ARN é simples, ou seja, é formada por uma única sequência de nucleótidos
>	Maior
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos
<	Menor
≤	Menor ou igual
µm	Micra; micro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
min.	Minuto
NCCLS	“National Committee for Clinical Laboratory Standards”
KNO ₃	Nitrato de potássio

Nº; n	Número
/	Ou; por
®	Patente registada
%	Percentagem
PNAEQ	Plano Nacional de Avaliação Externa da Qualidade
Ref. ^a .	Referência
R	Resistente
S	Sensível
Mg ²⁺	Símbolo químico do magnésio
K ⁺	Símbolo químico do potássio
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
NEQAS	“UK National External Quality Assessment Service for Microbiology”

PREFÁCIO

Em 28 de Fevereiro de 2005 iniciou a sua actividade profissional na Unidade de Micologia do Centro de Bacteriologia e Micologia Professor Doutor Arnaldo Sampaio do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P. (INSA, I.P.) ⁽¹⁾ (Coordenadora: Doutora Maria Laura Martins Rosado de Sousa), em Lisboa, como Assistente da Carreira dos Técnicos Superiores de Saúde – Ramo de Laboratório.

Durante o período de formação e treino laboratorial geral nas áreas de Micologia Clínica, Ambiental e Alimentar, tomou conhecimento e executou diversas técnicas utilizadas na rotina laboratorial, nomeadamente:

- Técnicas de colheita, em que lhe foi transmitida, com especial relevo, a importância das normas a seguir durante a colheita de material a examinar para obtenção de resultados correctos;
- Técnicas de sementeira para obtenção de primoculturas e subculturas a partir de variados produtos biológicos e inertes, como areias, águas e alimentos;
- Técnicas de montagem de exames directos.

Quando se lhe tornou fácil a execução destas técnicas, iniciou a sua formação de microscopia, em especial dos exames directos dos produtos biológicos. A execução de provas fisiológicas necessárias à identificação de fungos leveduriformes com importância em patologia humana e a determinação da susceptibilidade *in vitro* de fungos leveduriformes e filamentosos a diversos antifúngicos constituiu o passo seguinte na sua preparação. Acompanhou e efectuou pesquisa de antígenos e de anticorpos de diversos agentes micológicos em doentes em imunossupressão. Ulteriormente, iniciou a observação macro e microscópica de primo e subculturas para identificação de fungos filamentosos em produtos biológicos e inertes.

⁽¹⁾ Esta Unidade tem como objectivos dar apoio à comunidade em Micologia Clínica, Ambiental e Alimentar; actuar como laboratório de referência, recebendo estirpes de vários laboratórios para identificações e confirmações; realizar estudos epidemiológicos e investigar situações de infecções nosocomiais; realizar estudos ambientais em areias, águas, ar, habitações, fábricas, hospitais, etc.; desenvolver métodos moleculares aplicados à epidemiologia de fungos leveduriformes.

As funções que exerce na Unidade de Micologia do INSA, I.P., correspondem às funções legalmente fixadas para o Ramo de Laboratório da Carreira dos Técnicos Superiores de Saúde, compreendendo:

- Participação na prestação de serviços em Micologia Clínica: sementeira de produtos biológicos, isolamento e identificação de fungos leveduriformes e filamentosos, determinação da susceptibilidade *in vitro* de fungos leveduriformes e filamentosos a diversos antifúngicos, testes serológicos para pesquisa de Ag e Ac;
- Participação na prestação de serviços em Micologia Ambiental e Alimentar: sementeira de areias, águas e alimentos, isolamento e identificação de fungos leveduriformes e filamentosos;
- Controlo global da qualidade, interpretação de resultados e respectiva validação;
- Participação em protocolos de estudo e em projectos de investigação e desenvolvimento: Projecto Pfizer: Antifungigramas de fungos leveduriformes e isolamento de fungos provenientes de micoses profundas, “Monitorização da Qualidade das Areias em Zonas Balneares”;
- Colaboração no processo de acreditação do Laboratório: elaboração/revisão de procedimentos de ensaio ou instruções de trabalho para aprovação, responsável pela Segurança do Laboratório;
- Participação na formação externa: formação de estagiários de licenciaturas em ciências biológicas e afins, de internos de especialidade (Medicina), de estudantes de mestrado, de estagiários da Carreira dos Técnicos Superiores de Saúde – Ramo de Laboratório e de licenciados em várias áreas científicas, formador em curso de Micologia Clínica Laboratorial e colaboração na docência de curso de mestrado.

Em Novembro de 2006 iniciou o curso de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL). Posteriormente, e sem descurar as suas funções na Unidade de Micologia e respectiva rotina laboratorial, foi-lhe proposto programa de preparação teórica que compreendeu pesquisa bibliográfica na Internet, em livros, revistas de especialidade e outras publicações da área da Micologia Médica, versando o estudo de dermatomicoses em doentes diabéticos, que constituiu o seu tema de dissertação de mestrado.

Durante o período de organização do projecto científico estabeleceram-se contactos com a Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (APDP) ⁽¹⁾, tendo-se celebrado um Protocolo de Colaboração entre o INSA, I.P. e a referida Instituição. O presente estudo foi desenvolvido na Unidade de Micologia do Centro de Bacteriologia e Micologia Professor Doutor Arnaldo Sampaio do INSA, I.P., em estreita colaboração com a APDP e consistiu das seguintes tarefas:

1. Pesquisa bibliográfica (mês 1 ao mês 6);
2. Colheita de amostras na população de doentes diabéticos e na população controlo (mês 1 ao mês 6);
3. Isolamento e identificação de fungos presentes nas amostras da população de doentes diabéticos e na população controlo (mês 1 ao mês 7) ;
4. Determinação da susceptibilidade *in vitro* dos fungos leveduriformes isolados na população diabética a diversos antifúngicos. Contribuir para a implementação na rotina laboratorial do método de difusão em *agar* para determinação da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de dermatófitos a agentes antifúngicos (mês 1 ao mês 7);
5. Tratamento estatístico dos resultados e análise dos dados obtidos (mês 8);
6. Redacção da dissertação de mestrado (mês 8 ao mês 10).

QUADRO I – Cronograma proposto para a realização do projecto científico.

Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tarefa 1										
Tarefa 2										
Tarefa 3										
Tarefa 4										
Tarefa 5										
Tarefa 6										

⁽¹⁾ Esta Associação é uma instituição particular de solidariedade social, reconhecida como a mais antiga Associação de Diabéticos do mundo e é decana da Federação Internacional de Diabetes (IDF), bem como uma Associação com fins essencialmente caritativos e filantrópicos. A APDP é uma instituição de saúde moderna, de referência, que além de servir de apoio às estruturas do Serviço Nacional de Saúde Pública é, simultaneamente, uma Associação vocacionada para defesa dos direitos dos diabéticos e para uma correcta integração das pessoas diabéticas na sociedade, possuindo e operando uma clínica prestadora de cuidados médicos integrados e diferenciados do doente diabético, sem descuidar os aspectos formativos e de investigação inerentes à excelência dos serviços prestados.

No decorrer da última tarefa do projecto científico, teve lugar em Lisboa, de 30 de Novembro a 2 de Dezembro de 2007, o “Congresso Nacional MICRO BIOTEC XXXIII JPG 2007” organizado pela Sociedade Portuguesa de Microbiologia, pela Sociedade Portuguesa de Biotecnologia e pela Sociedade Portuguesa de Genética. O objectivo destas três Sociedades é o de reunir, de dois em dois anos, a fim de promover a divulgação e a discussão dos mais recentes avanços de investigação e de desenvolvimento nas áreas da Microbiologia, da Biotecnologia e da Genética.

Neste congresso, teve oportunidade de apresentar um trabalho, sob a forma de *poster*, no âmbito do seu tema de dissertação de mestrado: “Prevalence of dermatomycosis in diabetic patients: preliminary results.”. A sua participação revestiu-se de grande interesse pessoal e profissional, pela formação obtida, pela tomada de conhecimento com projectos de investigação desenvolvidos e/ou em curso, pelo contacto com novas tecnologias e pelos proveitosos ensinamentos que pôde retirar dos diversos temas e áreas abordadas.

I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. DERMATOMICOSSES

As infecções fúngicas superficiais, também denominadas de dermatomicoses, encontram-se confinadas às camadas mais exteriores da pele (epiderme, estrato espinhoso e estrato córneo), seus anexos queratinizados, como as unhas ou o cabelo, e à superfície epitelial das mucosas, raramente invadindo tecidos mais profundos ou órgãos viscerais (Esteves *et al.*, 1990; Martins, 1993).

O aspecto clínico das lesões traduz-se por erupções pápulo-vesiculosas com descamação superficial em pequenas áreas, destruição de cabelos ou deformação de unhas. Na pele, as lesões pápulo-vesiculosas iniciais tendem a agrupar-se e a adquirir um aspecto anelar ou circinado que constitui a impingem. Em regra, encontram-se limitadas a uma determinada área da superfície cutânea e raramente se generalizam no organismo. Em determinadas circunstâncias, embora pouco frequentes, surgem na evolução, daquelas lesões, fenómenos inflamatórios, mais ou menos intensos, particularmente nas áreas pilosas, com aparecimento de tumefacções ou de nódulos e frequente supuração. Em casos raros, a doença a partir da superfície invade os tecidos profundos e os órgãos viscerais (Esteves *et al.*, 1990; Martins, 1993).

Sob a designação de micoses superficiais, agrupam-se as dermatoses provocadas por fungos geralmente bem adaptados ao homem, e aos animais, com carácter clínico suave, superficial e restrito, cujo período de incubação é, em regra, relativamente curto. O início é rápido, os sintomas, então mais acentuados, tendem posteriormente para se atenuar e a doença para autolimitar-se. O carácter geral é benigno. Surgem mais frequentemente, conforme o tipo clínico, em crianças, jovens ou adultos, não se relacionam obrigatoriamente com qualquer ocupação ou actividade e têm distribuição geográfica mundial. Consideram-se correntemente como micoses superficiais as seguintes entidades descritivas: dermatofitias (sinónimo de tinha); candidíase (certas formas); pitiríase versicolor; tinha negra; pedras; casos mais raros

por espécies oportunistas de: *Aspergillus*; *Alternaria*; *Scopulariopsis*; *Hendersonula*, entre outras (Esteves *et al.*, 1990).

De acordo com Beare *et al.* (1968), citados por Esteves *et al.* (1992), as dermatomicoses constituem uma das grandes endemias micóticas. Admite-se que existam no mundo mais de 15 milhões de casos de tinea do couro cabeludo e não parece haver tendência para a regressão da endemia. Por outro lado, aumenta por toda a parte a prevalência de localizações na pele glabra.

As dermatomicoses provocadas por fungos dermatófitos (também denominadas de dermatofitias, dermatofitoses ou *tinhas*) e as formas superficiais de candidíase têm sido consideradas as mais importantes do ponto de vista patogénico, clínico e epidemiológico, tendo exercido uma influência considerável na saúde europeia até meados do século XX (Esteves *et al.*, 1990; Torres-Rodriguez e López-Jodra, 2000).

Actualmente, as infecções causadas por dermatófitos continuam a afectar uma grande parte da população mundial, aproximadamente 40%, e representam 30% de todas as infecções fúngicas superficiais, sendo as mais comuns as que afectam a pele e as mucosas (Kaszuba *et al.*, 1998, Evans, 1998 citados por Araújo *et al.*, 2003). As onicomicoses são as mais frequentes das doenças das unhas e representam entre 18 a 40 % de todas as onicopatias (Gupta *et al.*, 1998).

As dermatomicoses são infecções que devem ser consideradas bastante importantes a nível da saúde pública pelos prejuízos que acarretam e pelo impacto sócio-económico que provocam (Araújo *et al.*, 2003). Em determinadas profissões (agricultores, empregados de limpeza, jardineiros, metalúrgicos, trabalhadores da construção civil, entre outras) a infecção fúngica a nível cutâneo pode ser extremamente dolorosa e causar um desconforto tal que impeça o trabalho. Quando ocorrem dermatomicoses em pessoas empregadas em bares ou em restaurantes, no atendimento ao público ou na prestação de cuidados de saúde, é necessária e urgente a sua saída dos postos de trabalho, podendo a recuperação demorar meses. O tratamento, por sua vez, pode recorrer à administração de fármacos bastante dispendiosos.

A qualidade de vida dos doentes é prejudicada, a sua auto-estima pode ser reduzida e a sua capacidade funcional é, por vezes, afectada de forma a interferir nas actividades de rotina

diária. As onicomicoses, em particular, podem agravar outras afecções clínicas, especialmente no indivíduo idoso; tal como as amputações de membros inferiores nos portadores de Diabetes *Melittus* correlacionadas às onicomicoses (Gupta *et al.*, 1998). As onicomicoses crónicas podem, portanto, aumentar os custos dos cuidados com a saúde (Araújo *et al.*, 2003). O intertrigo interdigital, por sua vez, mostra forte associação com erisipela ou celulite da perna (Dupuy *et al.*, 1999 citados por Araújo *et al.*, 2003).

Outras causas que contribuem para o aumento do número de infectados por dermatófitos são: a grande expansão do vírus da SIDA, o aumento da utilização de corticosteróides e de antibióticos, e a administração de drogas imunossupressoras em pacientes transplantados (Levy, 1997 citado por Araújo *et al.*, 2003; Torres-Rodriguez e López-Jodra, 2000). Outro factor que fomenta as dermatofitias é o aumento da sua frequência em espaços para a prática de exercício físico e a maior participação da população urbana em actividades desportivas comunitárias (Evans e Sigurgeirsson, 1999 citados por Araújo *et al.*, 2003).

Em Portugal, tal como em vários países do continente americano, tem sido apenas através de estudos individuais que se vai tomando conhecimento da prevalência das dermatomicoses, visto estas não serem de declaração obrigatória, não levarem a internamento hospitalar e serem, normalmente, tratadas por automedicação. Pela sua elevada prevalência e prejuízos causados à população, as infecções fúngicas superficiais têm significado médico-social e importância em saúde pública no nosso país e as informações e sondagens complementares indicam que a sua frequência aumenta e constitui apreciável volume clínico na prática diária (Rosado e Teles, 1989).

Existem ainda dificuldades apreciáveis no conhecimento epidemiológico e na vigilância sanitária, tanto no âmbito mundial como no nosso país, o que torna particularmente relevantes os estudos efectuados nesta área.

1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS DERMATOMICOSSES

Tradicionalmente, do ponto de vista clínico, classificam-se as micoses ou infecções fúngicas em quatro categorias principais, de acordo com a sua localização e estruturas afectadas: micoses superficiais ou cutâneas; micoses subcutâneas; micoses sistémicas; micoses oportunistas.

As **micoses superficiais** encontram-se confinadas à epiderme e seus anexos, afectando, por vezes, a derme e, mais raramente, os órgãos internos. Caracterizam-se por não apresentarem anticorpos séricos, provocarem inflamação local banal e, com frequência, serem transmitidas por contacto directo. Esta categoria compreende todas as doenças provocadas por fungos sobre as camadas mais exteriores da pele (epiderme, estrato espinhoso e estrato córneo), as membranas muco-cutâneas, os órgãos genitais, o ouvido externo, podendo também envolver o cabelo/pêlos e o couro cabeludo.

As **micoses subcutâneas** localizam-se no tecido subcutâneo, tendem para a cronicidade e raramente têm uma disseminação sistémica. Os agentes etiológicos responsáveis por este tipo de micoses são, em regra, fungos saprófitas existentes no solo que se implantam, sobretudo, ao nível dos membros inferiores após uma situação traumática. Normalmente, ocorrem lesões profundas e ulceradas ou verifica-se formação de massas fúngicas, mais comuns nos membros inferiores. Provocam, geralmente, uma resposta leucocítica ou eosinofílica por parte do organismo humano, podendo conduzir à formação de quistos ou granulomas.

As **micoses sistémicas** podem envolver os tecidos e os órgãos internos, permanecer localizadas ou tornar-se disseminadas por todo o organismo. Neste caso, cada espécie de fungo apresenta especificidade para infectar um determinado órgão. Caracterizam-se por apresentar anticorpos séricos, provocar reacção inflamatória granulomatosa, sendo desconhecido o seu contágio indivíduo a indivíduo.

As **micoses oportunistas** são infecções causadas por fungos com baixa virulência existentes no meio ambiente. O que acontece nesta situação é que determinado indivíduo que já se encontre com o seu sistema imunitário debilitado devido a outra(s) doença(s) pode sofrer uma infecção secundária que se pode tornar bastante grave, ainda que causada por um fungo, normalmente, não patogénico.

No grupo de fungos que causam micoses superficiais ou cutâneas, pode fazer-se uma subdivisão entre os fungos que vivem de compostos existentes na superfície da nossa pele, não invadindo o tecido vivo e os fungos que têm capacidade de invadir o tecido vivo.

1.1.1. DERMATOMICOSES SEM INVASÃO DO TECIDO VIVO

- **Piedra ou Tricomiose nodosa**

A piedra, também designada de tricomiose nodosa, exterioriza-se por pequenos nódulos superficiais aderentes aos pêlos. Esta afecção pode afectar o couro cabeludo, as axilas e/ou a região pubiana. Existem dois tipos de piedra: a negra caracteriza-se por nódulos pretos e duros, sendo causada pela *Piedra hortae*, um fungo demácio; e a branca, que produz nódulos claros e menos duros, cujo agente etiológico é o *Trichosporon beigeli* (Hoog e Guarro, 1995; Ramos-e-Silva, 1995).

- **Tinea nigra**

A tinea nigra é causada por *Hortea werneckii*. É uma micose de relativa raridade das zonas tropicais ou subtropicais. Afecta predominantemente as meninas, provocando lesões superficiais na pele, de cor castanha ou negra, ocorrendo principalmente nas palmas das mãos ou, por vezes, nas solas dos pés (Hoog e Guarro, 1995; Ramos-e-Silva, 1995).

- ***Pityriasis versicolor***

A pitiríase versicolor é causada pela levedura *Malassezia furfur*, também conhecida como *Pityrosporum ovale*. É universal, afectando qualquer raça e sexo, sendo, no entanto, mais comum no adulto. Ocorre em especial em regiões de clima quente e húmido. A *Malassezia furfur* pode estar presente na pele ou no cabelo sem provocar lesões que, quando presentes, se caracterizam por manchas hipocrómicas, eritematosas ou acastanhadas, daí resultando o nome “versicolor”. Essas máculas são confluentes, têm contornos geográficos e apresentam escamas furfuráceas. Resultam em vermelhidão da pele, descamação e comichão causados por uma reacção de hipersensibilidade à referida levedura. A colonização do extracto córneo pode levar à formação de lesões no peito e nas costas e as recidivas são frequentes. O diagnóstico é feito pelo exame directo do raspado da lesão, com hidróxido de potássio, no qual são observados grupos de esporos entrelaçados por pequenas hifas septadas. Com lâmpada de Wood, as lesões revelam cor amarelo-ouro (Hoog e Guarro, 1995; Ramos-e-Silva, 1995).

- **Otite externa**

Resulta de uma colonização sobreabundante de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus niger* ou *Aspergillus fumigatus*, *Malassesia furfur* ou *Pseudallescheria boydii* no ouvido externo. Este tipo de infecção é promovido por uma desordem bacteriana ou pelo uso de um antibiótico de largo espectro (Hoog e Guarro, 1995).

1.1.2. DERMATOMICOSES COM INVASÃO DO TECIDO VIVO

1.1.2.1. DERMATOMICOSES DA PELE

A infecção da pele caracterizada por lesões circulares vermelhas, causadoras de comichão é designada por “**ringworm**”. As manifestações clínicas decorrentes das dermatomicoses resultam quer da colonização e da multiplicação dos fungos dermatófitos na camada córnea da pele, quer da consequente reacção do hospedeiro. Os fungos permanecem restritos ao estrato córneo e como resultado da actividade queratinofílica são produzidos metabolitos que provocam inflamação. Simultaneamente, a camada espinhosa torna-se escamosa (Hoog e Guarro, 1995).

Tradicionalmente, a classificação das lesões de “ringworm” depende da localização anatómica das mesmas no corpo humano. A denominação de cada tipo de dermatomicose que afecta a pele é efectuada adicionando-se um nome latino que designa o local do corpo humano afectado à palavra “tinha” (Hoog e Guarro, 1995; Pinheiro, 2007).

- ***Tinea pedis***

Infecção que se localiza nos pés e nos espaços interdigitais dos pés e que é, geralmente, conhecida por “pé-de-atleta”. Existem três quadros clínicos de dermatofitose dos pés: a) eczematóide: caracterizada por vesículas plantares e digitais; b) intertriginosa: afecta as pregas interdigitais, em especial, dos terceiros e quartos espaços, provocando fissuras e maceração, sendo frequente a sua associação com uma infecção bacteriana; e c) crónica: provoca lesões eritemato-descamativas em toda a região plantar, acompanhadas de inflamação discreta ou com ausência de inflamação. O agente etiológico causador mais comum é *Trichophyton rubrum* (Hoog e Guarro, 1995; Ramos-e-Silva, 1995; Pinheiro, 2007).

- ***Tinea manum***

Pequenas lesões entre os dedos das mãos, podendo estender-se por toda a mão. O agente etiológico causador é, na maior parte das vezes, *Trichophyton rubrum* (Hoog e Guarro, 1995).

- ***Tinea corporis***

Este tipo de dermatomicose tem localização preferencial nos braços, face, pescoço e tronco, e, em geral, é acompanhada de prurido. Causa lesões eritemato-descamativas, circinadas, isoladas ou confluentes, de crescimento centrífugo, podendo observar-se vesículas ou pústulas em sua borda. Os principais agentes etiológicos causadores são: *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton violaceum* (Hoog e Guarro, 1995; Ramos-e-Silva, 1995; Pinheiro, 2007).

- ***Tinea imbricata***

Trata-se de uma forma clínica especial de *tinea corporis*, causada por *Trichophyton concentricum*. As lesões caracterizam-se pela formação de círculos concêntricos de descamação que atingem grandes áreas do corpo. Ocorre principalmente em certas regiões da Polinésia e do Brasil (Hoog e Guarro, 1995; Ramos-e-Silva, 1995; Pinheiro, 2007).

- ***Tinea cruris* ou dermatofitose marginada**

Lesões em zonas pilosas rodeando os órgãos genitais, podendo também atingir os próprios órgãos genitais, as virilhas, as nádegas e as coxas. Os agentes etiológicos causadores destas lesões são, principalmente, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (Hoog e Guarro, 1995; Ramos-e-Silva, 1995; Pinheiro, 2007).

- ***Tinea barbae***

As lesões são localizadas na face, na zona com barba, e podem ser superficiais ou profundas. Um dos agentes etiológicos causadores destas lesões é *Trichophyton rubrum* (Hoog e Guarro, 1995; Pinheiro, 2007).

- **Tinea capitis**

Lesões na pele do couro cabeludo e nas sobrancelhas. Pode causar alopecia e pelada definitiva. É causada principalmente por *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton gourvilii*, *Trichophyton yaoundei*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum canis* e *Microsporum ferrugineum* (Hoog e Guarro, 1995; Ramos-e-Silva, 1995; Pinheiro, 2007).

1.1.2.2. DERMATOMICOSSES DAS UNHAS

- ***Tinea unguium* ou Onicomicose**

Infecção eminentemente crónica da unha e de todo o tecido envolvente. Ocorre na maior parte das vezes nas unhas dos pés. Expande-se da periferia para o centro, num processo pelo qual a unha pode cair. Pode ocorrer descolamento da unha, hiperqueratose subungueal e destruição parcial ou total da unha. O termo *tinea unguium* refere-se a onicomicose provocada por fungos dermatófitos, enquanto que o termo onicomicose designa qualquer micose nas unhas. Os dermatófitos reconhecidos como causadores de *tinea unguium* são, principalmente, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Alguns fungos não dermatófitos, *Candida spp.* e *Scopulariopsis brevicaulis*, são reconhecidos como causadores de onicomicoses, quer nas unhas das mãos como nas dos pés, com frequente inflamação no tecido em redor (*paroniquium*) (Hoog e Guarro, 1995; Ramos-e-Silva, 1995; Pinheiro, 2007).

1.1.2.3. DERMATOMICOSSES DOS CABELOS E PÊLOS

Segundo Badillet (1991), citado por Martins (1993), é possível distinguir cinco tipos de parasitismo capilar. Esta informação é muito útil para a identificação dos principais grupos de dermatófitos, através do exame directo de cabelos parasitados.

Em alguns casos, quando as hifas intrafoliculares atingem a zona queratogénea, emergem novamente à superfície da haste pilosa, fragmentando-se em artrosporos secundários que envolvem o pêlo e, através do crescimento deste, vão dar origem à formação de uma verdadeira bainha de esporos – **parasitismo do tipo endoectotrix** :

- **Tipo micróide**

Caracteriza-se pela existência de filamentos micelianos pouco numerosos no interior do cabelo. À superfície deste existem cadeias de pequenos esporos com cerca de 2 a 3 µm de diâmetro, envolvendo o cabelo. O agente etiológico causador deste tipo de parasitismo é *Trichophyton mentagrophytes* (Badillet, 1991 citado por Martins, 1993; Badillet, 1995);

- **Tipo megaspórico**

Muito semelhante ao anterior, caracteriza-se pela existência de filamentos micelianos pouco numerosos no interior do cabelo. À superfície deste existem cadeias de esporos grandes com cerca de 4 a 6 µm. Os agentes etiológicos causadores deste tipo de parasitismo são *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton megninii* e *Trichophyton equinum* (Badillet, 1991 citado por Martins, 1993; Badillet, 1995);

- **Tipo microspórico**

Caracteriza-se por apresentar filamentos micelianos no interior do cabelo muito difíceis de observar. Em redor do cabelo, existem muitos esporos pequenos com 2 µm de diâmetro, muito ligados uns aos outros, organizando-se em mosaico. Os agentes etiológicos causadores deste tipo de parasitismo são *Microsporum canis* e *Microsporum audouinii* (Badillet, 1991 citado por Martins, 1993; Badillet, 1995).

Noutros casos, as hifas intrafoliculares não emergem à superfície do pêlo ao atingirem a zona queratogénica. Fragmentam-se em artrosporos até preencher todo o lúmen do cabelo, fragilizando-o a tal ponto, que este se quebra logo acima da sua emergência – **parasitismo do tipo endotrix**:

- **Tipo endotrix**

Caracteriza-se pela existência de numerosos filamentos micelianos no interior do cabelo, podendo também existir grandes cadeias de artrosporos de 3 a 4 µm de diâmetro e que

ocupam a totalidade do cabelo. O cabelo fica repleto de escamas, completamente disforme e contorcido. Os agentes etiológicos causadores deste tipo de parasitismo são *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton violaceum* (Badillet, 1991 citado por Martins, 1993; Badillet, 1995);

- **Tipo fávico**

Caracteriza-se pela existência de muitos filamentos micelianos intrapilares. A acção do KOH liberta bolhas de ar que ficam aprisionadas no interior do cabelo. O agente etiológico causador deste tipo de parasitismo é *Trichophyton schoenleinii* (Badillet, 1991 citado por Martins, 1993; Badillet, 1995).

1.2. FACTORES PREDISPOENTES DE DERMATOMICOSSES

1.2.1. FACTORES EXTRÍNSECOS

A integridade da camada córnea da pele e das unhas é fundamental na prevenção da infecção fúngica. Qualquer processo que leve à quebra desta barreira facilita a penetração da mesma por diferentes espécies fúngicas. Estes factores tanto podem incluir agressões físicas como químicas. Em muitos dos casos, a exposição ao microrganismo é também condicionada pela profissão e hábitos do indivíduo. A propagação da infecção pode ocorrer devido à existência de macroconídios, microconídios, artrósporos, escamas de pele ou cabelos infectados que são disseminados para outros locais ou retidos em objectos partilhados por diferentes pessoas, conduzindo à infecção (Torres-Rodríguez e López-Jodra, 2000).

Descrevem-se, correntemente, como **factores extrínsecos** (ou locais) que predis põem ao aparecimento de dermatomicoses:

- Profissões de risco (agricultores; jardineiros; trabalhadores da construção civil; metalúrgicos; pessoas que trabalham em bares ou em restaurantes e que estão constantemente sujeitos a microtraumas; empregados de limpeza que não usam luvas adequadas tendem a possuir as suas mãos expostas à água por longos períodos de tempo, causando maceração da pele e das unhas que pode ainda ser agravada pelo uso de

detergentes e outras substâncias que actuam quimicamente potenciando o efeito físico já obtido; pessoal de saúde; veterinários; trabalhadores de infantários; etc.);

- O uso de sapatos com sola de borracha que provoca abrasão e/ou oclusão do pé (considerando este factor, existem profissões de risco, como o caso dos pescadores ou dos mineiros, por ex.) ou o uso de calçado impróprio (sapatos de senhora demasiado bicudos, excessivamente fechados ou com o salto demasiado alto);
- O uso de meias de fibra sintéticas, as quais não permitem que o pé transpire;
- A exposição a grandes quantidades de inóculo (em piscinas e ginásios, por ex.);
- A partilha de roupas e toalhas (quer directamente ou por contaminação por lavagem em comum) e;
- O extremo cuidado com as unhas é também prejudicial, já que o corte das cutículas que envolvem as unhas as torna mais vulneráveis (Torres-Rodríguez e López-Jodra, 2000).

1.2.2. FACTORES INTRÍNSECOS

Descrevem-se, também, como *factores de realização da doença* determinados **factores intrínsecos** (ou gerais) de grande importância ao considerar o nível de resistência que o indivíduo possui em relação a determinada infecção fúngica superficial:

- Factores genéticos;
- Idade;
- Sexo;
- Estado endócrino (ex. *Diabetes Mellitus*) e nutricional do indivíduo;
- Terapias com corticosteróides, antibióticos e imunossuppressores e;
- Ocorrência de outras doenças (grande expansão do vírus da SIDA, por ex.) (Levy, 1997 citado por Araújo *et al.*, 2003; Torres-Rodríguez e López-Jodra, 2000).

2. FUNGOS DERMATÓFITOS

Os fungos dermatófitos, considerados agentes etiológicos de dermatomicoses, são fungos filamentosos que invadem os tecidos superficiais queratinizados do Homem e de outros animais vertebrados, como a pele, as unhas e o cabelo ou os pêlos.

Os fungos dermatófitos caracterizam-se por apresentar duas fases evolutivas, a assexuada, na qual pode ser parasita, e a sexuada, quando é saprófita do meio ambiente. Na fase parasitária, os dermatófitos compreendem três gêneros diferentes: *Microsporum spp.*, *Trichophyton spp.* e *Epidermophyton spp.* (Martins, 1993; Karaca e Koç, 2004).

Existem espécies antropofílicas que são parasitas obrigatórios do Homem, espécies zoofílicas que têm nos animais o seu principal reservatório e só ocasionalmente infectam o Homem e espécies geofílicas que vivem como saprófitas no solo, podendo infectar o Homem e outros animais, ainda que indirectamente (Martins, 1993). *Trichophyton rubrum* tem sido referido como o principal agente etiológico responsável por dermatofitias, no entanto outras espécies de dermatófitos têm sido também isoladas com frequência, como *Trichophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum*, o que sugere que as dermatofitias causadas por espécies antropofílicas têm vindo a aumentar nos últimos anos (Rosado e Teles, 1989; Onychomycosis, 2007).

2.1. TAXONOMIA

Os fungos dermatófitos incluem-se num grupo de fungos relacionados entre si quer morfológica quer fisiologicamente. Apesar da sua proximidade evolutiva, os três gêneros pertencentes a este grupo: *Microsporum spp.*, *Trichophyton spp.* e *Epidermophyton spp.*, foram reunidos desta forma por razões de ordem prática e relacionadas com os seus efeitos clínicos: todos provocavam lesões superficiais.

Apesar de serem conhecidas as formas sexuadas, teleomórficas ou perfeitas da maior parte dos fungos dermatófitos, em virtude das formas anamórficas serem a causa mais comum de infecção para o Homem, este grupo de fungos é, geralmente, designado pelas suas formas conidiais, assexuadas, imperfeitas ou anamórficas. A classificação dos fungos dermatófitos

em três géneros distintos: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, é a mais bem aceite e adoptada por muitos autores e investigadores (Martins, 1993).

- **Género *Microsporum*** Gruby, 1843

Macroscopicamente, as colónias são algodoadas ou pulverulentas, geralmente de tonalidades claras, entre o branco e o castanho (Esteves *et al.*, 1990).

Microscopicamente, é caracterizado por formar macroconídios fusiformes com paredes espessas (acima de 4 µm em *Microsporum canis*). Com raras exceções, a superfície externa da parede é rugosa ou espiculada, pelo menos na extremidade distal. Consoante as espécies, os macroconídios podem medir 7 a 20 µm de largura e 40 a 120 µm de comprimento. São, normalmente, sésseis ou suportados por esterigmatas curtos. Os microconídios são clavados ou em forma de maçã. Pode observar-se, também, micélio em raquete, corpos nodulares e clamidósporos (Martins, 1993).

As espécies do género *Microsporum* podem infectar a pele e o cabelo e são, na sua maioria, zoofilicas (Martins, 1993).

As espécies que se isolam mais frequentemente de casos de doença no Homem são: *Microsporum canis*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum gypseum* e *Microsporum ferrugineum* (Esteves *et al.*, 1990).

- **Género *Trichophyton*** Malmsten, 1845

Macroscopicamente, verifica-se grande diversidade entre as espécies. As colónias podem ter aspecto muito variável, desde glabras a pulverulentas. A pigmentação pode aparecer somente no reverso das colónias e difundir-se ou não no meio de cultura (Esteves *et al.*, 1990).

Microscopicamente, é caracterizado por formar macroconídios clavados com dimensões de 4 a 8 µm de largura e 10 a 50 µm de comprimento, com paredes lisas não excedendo 2 µm de espessura e com zero a quatro septos. Os macroconídios são, na generalidade, difíceis de obter quando se utilizam os meios de cultura habituais. Muitas das vezes, só se formam sobre

meios vitaminados complexos. Os microconídios podem ser esféricos (2,5 a 4 µm de diâmetro) ou clavados (2 a 3 x 3 a 4 µm) (Martins, 1993).

As espécies do género *Trichophyton* podem infectar a pele, as unhas e o cabelo e são, na sua maior parte, antropofílicas e geofílicas (Martins, 1993).

Entre as espécies incluídas neste género, têm-se isolado, com maior ou menor frequência, de casos de doença no Homem: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton megninii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton gourvillii*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton yaoundei*, *Trichophyton equinum* e *Trichophyton gallinae* (Esteves *et al.*, 1990).

As espécies mais importantes são *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton schoenleinii*.

- **Género *Epidermophyton* Sabouraud, 1910**

Macroscopicamente, as colónias, inicialmente limitadas a micélio de cor verde-oliva característica, tornam-se pregueadas com a idade. Em poucas semanas surgem áreas pleiomorfizadas (Esteves *et al.*, 1990).

Microscopicamente, é caracterizado por possuir macroconídios muito largos, clavados, com 6 a 10 µm de largura e 8 a 15 µm de comprimento, com extremidades distais arredondadas, paredes lisas de 1 a 1,5 µm de espessura e com zero a quatro septos. Não se formam quaisquer microconídios (Martins, 1993).

O género *Epidermophyton* só invade a pele glabra e as unhas. Não parasita os cabelos, nem forma esporos na superfície da haste pilar. Este género é antropofílico, transmitindo-se de pessoa para pessoa. Só se conhecem duas espécies patogénicas pertencentes a este género: *Epidermophyton floccosum* e *Epidermophyton stockdale*.

2.2. MORFOLOGIA

2.2.1. MORFOLOGIA MACROSCÓPICA

As colónias dos dermatófitos são algodoadas, penugentas ou aveludadas consoante a maior ou menor abundância de micélio aéreo. São pulverulentas quando os esporos são abundantes e glabras quando não possuem micélio aéreo (Martins, 1993).

A superfície pode ser cerebriforme se apresentar sulcos e dobras, radiada se os sulcos divergirem a partir do centro ou lisa quando não apresenta sulcos. Podem ser mais ou menos elevadas (acuminadas), ou completamente planas nos casos em que o micélio se estende sobre a superfície do meio sem crescer em altura (Martins, 1993).

Quanto à cor, observa-se que algumas espécies desenvolvem coloração roxa, castanha, vermelha, amarelada ou alaranjada, no verso e/ou no reverso da colónia (por vezes mais evidente neste último). A cor é frequentemente característica da espécie embora, em estirpes diferentes, se observem variações na cor e no aspecto das colónias dentro da mesma espécie. Passagens sucessivas nos meios de culturais habituais levam ao aparecimento de pleiomorfismo. As formas pleiomórficas crescem mais rapidamente, assimilam melhor os açúcares e o azoto mineral e alteram os seus constituintes antigénicos (Martins, 1993).

2.2.2. MORFOLOGIA MICROSCÓPICA

Observadas ao microscópio óptico, as estruturas somáticas dos dermatófitos não diferem das que se observam na generalidade dos fungos. São constituídas por filamentos septados e ramificados, denominados **hifas**. Estas consistem em tubos micelianos de diâmetro compreendido entre 2 e 4 µm, crescendo no sentido da periferia da colónia, à superfície do meio de cultura. A região da hifa delimitada por dois septos é denominada **segmento** ou **artículo** (Fig. 1-a)). O conjunto das hifas constitui o **micélio**.

Uma vez formados, os segmentos já não alargam, mas deles podem sair hifas secundárias que, na maioria das vezes, nascem imediatamente atrás do septo distal, crescendo igualmente em direcção à periferia, fazendo um ângulo mais ou menos obtuso com a hifa a partir da qual se originou (Emmons, 1934 citado por Martins, 1993). O diâmetro dos filamentos pode ser

variável; podem apresentar irregularidades ou, pelo contrário, serem regulares. Ocasionalmente, algumas hifas secundárias em lugar de crescerem para a periferia, crescem para trás (Martins, 1993).

A observação ao microscópio óptico de um pequeno fragmento das colônias de dermatófitos permite visualizar os elementos característicos deste grupo de fungos. Alguns elementos podem ser observados em todas as espécies, enquanto outros são característicos de um dado gênero e outros são exclusivamente característicos de uma determinada espécie. Algumas dessas estruturas fúngicas mais relevantes, descritas seguidamente, são os **esporos** e as **formações ornamentais** (Fig. 1) (Informações extraídas de Emmons, 1970, Vanbreuseghem *et al.*, 1978, Cabrita *et al.*, 1990 e Badillet, 1991 citados por Martins, 1993).

2.2.2.1. ESPOROS

Os esporos assexuados são mais ou menos abundantes e de formas variadas: artrosporos, clamidósporos, microconídios e macroconídios. Nas formas perfeitas ou sexuadas observam-se cleistotécios.

Os **artrosporos** (Fig. 1-b)) formam-se por septação ao longo das hifas e libertam-se por desarticulação. Quando completamente libertos do segmento que lhes deu origem, os artrosporos arredondam-se e podem simular microconídios, cuja origem é completamente diferente.

Os **clamidósporos** (Fig. 1-c)) são esporos redondos, de parede espessa, intercalares ou terminais, bastante resistentes ao calor e à secura, dentro dos quais há uma concentração de protoplasma e substâncias de reserva. Não são peculiares dos dermatófitos nem têm valor taxonómico.

Os **microconídios**, de forma redonda (*Trichophyton mentagrophytes*) ou piriformes (*Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*) e de pequenas dimensões, formam-se por condensação de protoplasma dentro de excrescências e são geralmente unicelulares. Implantam-se isoladamente ao longo ou no topo das hifas, dispõem-se em acládio (Fig. 1-d)) quando estão implantados de um lado e do outro da hifa aérea principal (*Trichophyton rubrum*), ou agrupam-se em cachos implantados em hifas secundárias, cujo conjunto, se for

simples, se assemelha à cruz de Lorraine (*Trichophyton mentagrophytes*, Fig. 1-e)) e os mais espessos a um arbusto (característico em *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulare*).

Os **macroconídios** são esporos de maiores dimensões, multicelulares, de extremidade distal ponteguda ou arredondada, providos de uma parede mais ou menos espessa e divididos por uma série de septos paralelos. A sua forma e dimensão varia com os géneros *Microsporum* (Fig. 1-f)), *Trichophyton* (Fig. 1-g)) e *Epidermophyton* (Fig. 1-h)) e é característica de cada um deles.

2.2.2.2. FORMAÇÕES ORNAMENTAIS

Na observação microscópica dos dermatófitos pode detectar-se a presença de:

- **Hifas em espiral**, quando a hifa se enrola em volta de um eixo assemelhando-se a uma mola em hélice. Os filamentos especializam-se a partir de uma hifa vegetativa, sendo mais finos e segmentados em intervalos muito curtos. São frequentes em *Trichophyton mentagrophytes* e em *Microsporum persicolor* (Fig. 1-i));
- **Micélio em raquete**, quando os segmentos das hifas se dilatam a uma distância muito curta do septo distal. É frequente encontrarem-se no género *Microsporum* (Fig. 1-j));
- **Micélio pectinado**, quando aparecem protuberâncias num dos lados da hifa (Fig. 1-k)). Em *Microsporum rivalieri* este aspecto toma a sua expressão máxima e a sua observação é importante para diagnosticar a espécie; as hifas dobram-se em arcos de círculo, e as protuberâncias formam-se no lado convexo de cada arco;
- **Candelabros fávicos**, são hifas que terminam em forma de cabeça de prego (formas mais simples, Fig. 1-i)) ou em forma de haste de veado (formas mais desenvolvidas, Fig. 1-m)). Este aspecto é característico de *Trichophyton schoenleinii*;
- **Corpos nodulares**, que consistem em novelos compactos formados pela hifa enrolada sobre si mesma, de onde saem filamentos curtos (Fig. 1-n)). Em certas estirpes de *Trichophyton mentagrophytes* são muito frequentes.

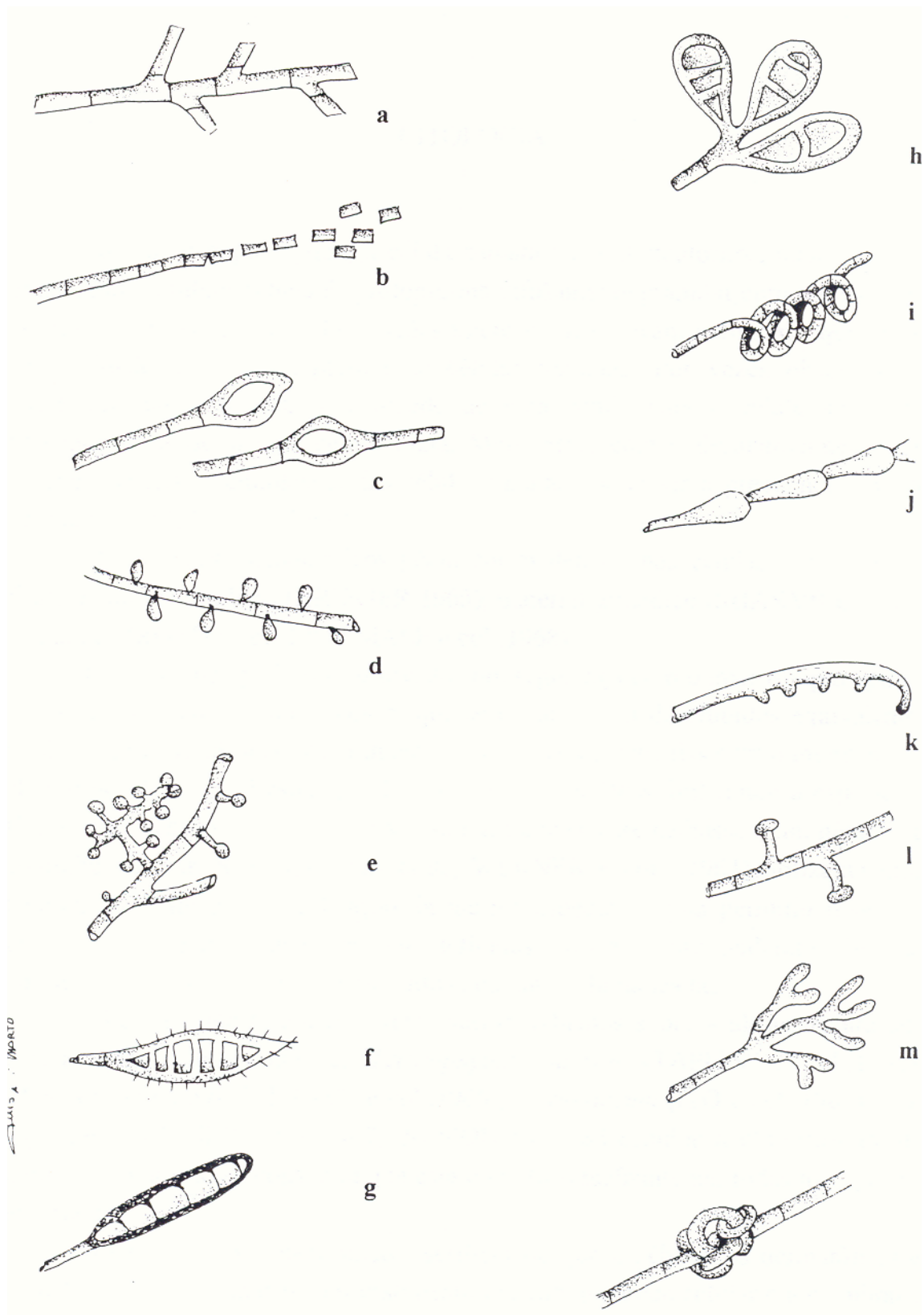


Fig. 1 – Aspecto microscópico dos dermatófitos em cultura: **a)** micélio septado; **b)** artrosporos; **c)** clamidósporos; **d)** microconídios em acládio; **e)** microconídios em cruz de Lorraine; **f)** macroconídio do género *Microsporum*; **g)** macroconídio do género *Trichophyton*; **h)** macroconídios do género *Epidermophyton*; **i)** hifas em espiral; **j)** micélio em raquete; **k)** micélio pectinado; **l)** e **m)** candelabros fávicos; **n)** corpos nodulares (Extraído de Martins, 1993).

2.3. REPRODUÇÃO

A reprodução nos dermatófitos pode fazer-se assexuadamente, por simples fragmentação das hifas ou através de células reprodutoras especializadas não sexuadas, os conídios, ou sexuadamente, por conjugação de talos de polaridade diferente.

A reprodução não sexuada por células especializadas, pode fazer-se por esporos unicelulares – microconídeos – e por esporos pluricelulares – macroconídios –. A germinação a partir de macroconídios dá lugar a várias hifas provenientes de várias células do esporo, as quais se podem fundir mais tarde (Weeler *et al.*, 1958 citados por Martins, 1993).

A compatibilidade ou a possibilidade de fusão de duas hifas de estirpes diferentes dá-se entre fungos da mesma espécie e não entre fungos de espécies diferentes (Davidson *et al.*, 1932 citados por Martins, 1993).

2.4. PATOGENIA DOS FUNGOS DERMATÓFITOS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO

Os fungos dermatófitos possuem duas propriedades muito importantes: são queratinofílicos e queratinolíticos, i.e., têm a capacidade de, no seu estado saprofítico, digerir a queratina *in vitro* e de a utilizar como substrato, podendo invadir tecidos vivos e provocar determinadas lesões (Simpanya, 2002).

Fugita e Matsuyama (1987) e Aljabre *et al.* (1992), citados por Martins (1993), sugeriram que a emergência das hifas invasoras durante a infecção fúngica favorece a sobrevivência do fungo *in vivo* apesar da resposta imunitária protectora do hospedeiro, actuando assim como um factor de virulência adicional em muitas infecções micóticas.

Os dermatófitos, em geral, invadem e parasitam as partes não vivas: camadas queratinizadas da pele, unhas e cabelo. Esta relação parasita-hospedeiro altamente especializada é responsável por uma grande variedade de manifestações clínicas. No que respeita ao aspecto das infecções dermatofíticas da pele, assim como os cabelos partidos e as unhas distróficas, há uma grande variedade de graus de reacções inflamatórias e eczematosas que os agentes micóticos provocam no hospedeiro (Grappel *et al.*, 1974 e Barlow, 1976 citados por Martins,

1993). Muitas destas interações parasita-hospedeiro estão dependentes de substâncias e enzimas produzidos por muitos dermatófitos. Cada género deste grupo de fungos é caracterizado por possuir “tecidos preferenciais” que infecta, no entanto, desconhecem-se as razões da especificidade tecidual que se tem observado mas é provável que esteja relacionada com as necessidades nutricionais específicas ou com a produção de enzimas pelos próprios organismos.

A severidade do processo infeccioso (infecção suave → infecção grave) pode dever-se, em parte, à reacção do hospedeiro ao organismo invasor que, por sua vez, depende de vários factores: virulência da espécie ou da estirpe infectante; reacção do hospedeiro aos produtos metabólicos produzidos pelo fungo; local anatómico da infecção; factores locais ambientais.

Se, por um lado, se admite que existam espécies ou estirpes fúngicas com maior virulência que outras, por outro lado, o estado imunológico do hospedeiro é também de grande importância na determinação da resposta à infecção fúngica. Para que as respostas imunitárias do hospedeiro sejam despoletadas é necessário que o fungo tenha conseguido atravessar as barreiras não específicas do nosso organismo que tentam impedir a sua entrada (Laboratoires Pfizer, 1989).

No caso particular das dermatofitias, estas barreiras primárias à infecção fúngica incluem, entre outras: a acção esterilizante da pele atribuída à presença de ácidos gordos não saturados de cadeia longa que se encontram na própria pele (Rothman *et al.*, 1945 e Burak *et al.*, 1958 citados por Martins, 1993; Laboratoires Pfizer, 1989); a modificação sebácea do couro cabeludo na altura da puberdade ou a acção da gordura do cabelo de adultos atribuída à presença de ácidos gordos alifáticos saturados entre C₇ e C₁₁ (Nicolaidis *et al.*, 1952 e Van Hecke e Meysman, 1980 citados por Martins, 1993); a acção das membranas mucosas atribuída à presença de fluidos e de secreções sebáceas contendo substâncias antifúngicas (Laboratoires Pfizer, 1989); a competição com a flora bacteriana normal (Laboratoires Pfizer, 1989); e a taxa de “turn-over” epitelial (Laboratoires Pfizer, 1989).

2.5. EPIDEMIOLOGIA

Quando se pretende considerar a distribuição e a importância dos fungos dermatófitos em qualquer região, dever-se-á ter em consideração vários factores. Estes incluem a presença de

um reservatório animal para as espécies zoofílicas, a existência de condições que permitam a expansão de epidemias de espécies antropofílicas e a migração de pessoas que transportem infecções de dermatófitos característicos de outras regiões, permitindo o aparecimento de novos focos onde o fungo possa sobreviver e possivelmente expandir-se à população autóctone. Este último factor tem possibilitado o isolamento de uma maior variedade de espécies de fungos dermatófitos em locais onde, em princípio, seria pouco provável encontrá-los (Evans e Richardson, 1989 citados por Martins, 1993).

Cada espécie tem, em relação aos hospedeiros, diferentes graus de especificidade. Epidemiologicamente podem ser classificadas em três grupos: antropofílicas, zoofílicas e geofílicas (Ajello, 1960 e Tanaka *et al.*, 1992 citados por Martins, 1993).

As **espécies antropofílicas** são parasitas obrigatórios do Homem. Esse é o seu reservatório habitual e propagam-se por contágio directo, de pessoa para pessoa, ou indirecto, através de objectos contaminados. Frequentemente produzem surtos epidérmicos em escolas, orfanatos, piscinas e em outros locais públicos onde os utentes tenham grande probabilidade de entrar em contacto com os agentes micóticos (Emmons *et al.*, 1977 citados por Martins, 1993). Em geral, as infecções têm evolução crónica e reacção inflamatória reduzida o que sugere que as espécies pertencentes a este grupo estão bem adaptadas à existência nos tecidos humanos (Beneke e Rogers, 1980 citados por Martins, 1993). As lesões que estes fungos provocam localizam-se geralmente em zonas do corpo habitualmente cobertas por roupa ou sapatos (Ripon, 1985 citado por Martins, 1993).

Os chamados fungos antropofílicos incluem *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton megninii*, *Trichophyton concentricum*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum ferrugineum* e *Epidermophyton floccosum* (Martins, 1993).

As **espécies zoofílicas** só ocasionalmente afectam o Homem; os animais são o seu principal reservatório. Estas espécies parasitam ou apenas existem saprofiticamente nos animais e, são os próprios animais, que contagiam directa ou indirectamente o ser humano (Allelo, 1974 citado por Martins, 1993). As infecções provocam o aparecimento de lesões de evolução

crónica, com frequência epizoótica, a partir das quais o agente etiológico se pode propagar ao Homem originando lesões muito inflamatórias.

As espécies de dermatófitos que frequentemente causam dermatofitias em animais são: *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulare*, *Microsporum distortum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae* e *Trichophyton erinaceae* (Cabrita *et al.*, 1973 citados por Martins, 1993).

As **espécies geofílicas** vivem como saprófitas no solo parasitando restos queratinizados. A partir destes, podem infectar o Homem e os outros animais, dando origem a quadros clínicos com um componente inflamatório elevado, o que sugere uma má adaptação destes fungos ao parasitismo nos tecidos animais (Nannizzi, 1927 e Dawson e Gentles, 1959 citados por Martins, 1993).

Microsporum gypseum é a espécie geofílica que se isola, com maior frequência, de lesões no Homem (Martins, 1993).

3. OUTROS FUNGOS FILAMENTOSOS POTENCIALMENTE QUERATINOFÍLICOS

O termo “fungo queratinofílico” é utilizado para designar todos os fungos que colonizam substratos ricos em queratina, degradando-a em componentes de baixo peso molecular (Gugnani, 2002). Os fungos denominados de queratinofílicos são todos aqueles que demonstram possuir actividade queratinofílica *in vitro*. Diferem dos fungos denominados de queratinolíticos na medida em que a degradação da queratina efectuada por estes últimos foi experimentalmente provada, verificando-se, também, que invadem tecidos *in vivo*, provocando dermatomicoses.

Actualmente, verifica-se um aumento da prevalência de lesões superficiais provocadas por fungos filamentosos não dermatófitos potencialmente queratinofílicos, anteriormente considerados apenas como ambientais ou contaminantes (Alteras, 1979; Araújo, 2003; Onychomycosis, 2007).

No grupo dos fungos filamentosos não dermatófitos têm sido referidos os seguintes géneros/espécies: *Acremonium spp.*; *Aspergillus spp.*; *Fusarium oxysporum*; *Onychocola canadensis*; *Scopulariopsis brevicaulis*; *Scopulariopsis spp.*; *Scytalidium dimidiatum*; *Scytalidium hyalinum*; entre outros (Gentle *et al.*, 1970, Zaias, 1972, Campbell *et al.*, 1977, Onsberg, 1980 e Badillet *et al.*, 1982 citados por Esteves *et al.*, 1990; Rosado, 1989; Onychomycosis, 2007).

Entre os fungos não dermatófitos com capacidade para invadir as unhas e produzir onicomicoses consideram-se, sobretudo, *Scopulariopsis brevicaulis*, que atinge principalmente as unhas dos pés (Zaias, 1972 citado por Esteves *et al.*, 1990) e *Hendersonula toruloidea*, ou a sua forma artrosporada (anamorfa) *Scytalidium hyalinum*, que produzem também lesões nas palmas das mãos, plantas e espaços interdigitais dos pés e cuja patogenicidade parece comprovada.

Roberts (1985), citado por Esteves *et al.* (1990), considera *Scopulariopsis brevicaulis* agente patogénico secundário em unhas infectadas por dermatófitos, ou lesadas por outra causa,

embora Onsberg (1980), citado por Esteves *et al.* (1990), atribua unicamente aquela espécie a etiologia de 6% das onicomicoses.

A maior parte dos casos devidos a *Hendersonula toruloidea* ou a *Scytalidium hyalinum* foram diagnosticados em Inglaterra ou em França e em indivíduos que viveram em áreas tropicais (Gentle *et al.*, 1970, Campbell *et al.*, 1977 e Badillet *et al.*, 1982 citados por Esteves *et al.* 1990). O aspecto clínico, em regra, não se distingue do das dermatofitias e é frequente que seja atingida mais de uma unha. Os filamentos são, geralmente, hialinos, mais raramente pigmentados, de diâmetro variável e com aspecto sinuoso, lembrando a pseudofilamentação de *Candida* na pele (Moore, 1986 citado por Esteves *et al.* 1990). Em cerca de 1/3 dos casos a infecção é associada a dermatofítia. As discromias ungueais são, com frequência, devidas à presença de bactérias (Zaias, 1972 citado por Esteves *et al.*, 1990), no entanto, conhecem-se alterações originadas por fungos, como a cor castanha resultante de infecção por *Scopulariopsis brevicaulis* ou as manchas negras produzidas por *Hendersonula toruloidea*.

Deve dar-se uma maior atenção às espécies isoladas a partir de lesões da pele e/ou dos seus anexos queratinizados que não pertencem ao grupo dos fungos dermatófitos e que, muitas das vezes, são consideradas como simples contaminantes (Fusconi e Filipello Marchisio, 1991).

Num estudo anteriormente efectuado na Unidade de Micologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P. (INSA, I.P.), constatou-se que existe realmente uma actividade queratinofílica de relevo em determinadas espécies de fungos ambientais, denotando, algumas delas, actividades queratinofílicas surpreendentemente elevadas. É, pois, de considerar a sua estreita relação com determinadas patologias clínicas que afectam a pele, as unhas ou os cabelos. No mesmo estudo, chegou-se à conclusão que se devem considerar como significativos os resultados que apontem para infecções provocadas por estas espécies, passando os mesmos a ser validados no decorrer da rotina laboratorial. Recomendou-se, ainda, ser de grande importância uma forte sensibilização dos clínicos no sentido destes passarem a considerar as espécies em questão como potencialmente patogénicas, podendo assim ser tomadas as medidas terapêuticas correctas e adequadas ao tratamento das infecções provocadas (Sabino, 2002).

Devido à semelhança clínica das lesões com as dermatomicoses causadas por fungos dermatófitos, o estudo micológico por método clássico revela-se fundamental para a sua diferenciação.

4. FUNGOS LEVEDURIFORMES

4.1. MORFOLOGIA, REPRODUÇÃO, POSIÇÃO TAXONÓMICA E ECOLOGIA

As leveduras constituem um grupo heterogéneo de fungos, cuja forma de desenvolvimento dominante é unicelular. O soma leveduriforme é caracterizado, geralmente, por células globosas, ovóides, elípticas, cilíndricas ou apiculadas (Lacaz, 1960).

A maioria das leveduras reproduz-se assexuadamente, por gemulação ou fissão binária. Algumas têm a capacidade de produzir estruturas que se assemelham a sacos (ascos ou *asci*), dentro dos quais se formam esporos (ascósporos) que intervêm na reprodução sexuada; outras, ainda, produzem esporos sexuais (basidiósporos) numa estrutura especial, o basídio (*basidium*) (Esteves *et al.*, 1990).

Em taxonomia, durante muito tempo, a classificação aceite, baseada essencialmente na morfologia e na reprodução sexuada, considerava os filos: *Zigomycota* (fungos que formam zigósporos), *Ascomycota* (fungos que formam ascos com ascósporos), *Basidiomycota* (fungos que formam basídios com basidiósporos) e *Deuteromycota* (grupo a que pertenciam os fungos dos quais só se conhecia a reprodução assexuada).

Actualmente, para além de aspectos morfológicos e reprodutores, consideram-se também na classificação novos dados relacionados com a ultra-estrutura das paredes celulares e com sequências de genes ARN ribossomal. A nova classificação mantém as divisões *Zigomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*, desaparecendo a divisão *Deuteromycota* (sendo esta distribuída pelas anteriores). Surge, também, uma nova divisão: a *Chitridiomycota*, onde se encontram organismos com esporos móveis e que são sobretudo parasitas de algas e sem importância clínica.

As leveduras eram anteriormente integradas, por vários autores, na classe dos *Deuteromycetes* que pertencia à divisão dos Fungos Imperfeitos ou *Deuteromycota*. Nesta classe estavam incluídas as principais leveduras com importância em patologia clínica. Os *Deuteromycetes* incluíam os fungos em que não se observava reprodução sexuada. Designavam-se por fungos imperfeitos ou anamorfos porque não se conheciam as suas formas sexuadas (perfeitas ou

teleomorfas). À medida que se foram descobrindo as suas formas perfeitas ou teleomorfas, as várias espécies e géneros foram sendo transferidas para a classe dos *Ascomycetes* ou para os *Basidiomycetes* (Grigoriu *et al.*, 1987; Esteves *et al.*, 1990). Actualmente, o principal grupo de leveduras está incluído na classe *Hemiascomycetes* que pertence à divisão *Ascomycota*. Nesta divisão, incluem-se os géneros *Candida* e *Geotrichum*. Na divisão *Basidiomycota*, salienta-se a espécie *Cryptococcus neoformans* e os géneros *Malassezia*, *Trichosporon* e *Rhodotorula*.

As leveduras são saprófitas do meio ambiente podendo algumas, em determinadas condições, tornar-se patogénicas para o homem (Grigoriu *et al.*, 1987). Com interesse em Micologia Médica encontram-se, principalmente, as leveduras pertencentes aos géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Trichosporon*. É particularmente relevante a importância do género *Candida* em patologia humana (Badillet *et al.*, 1987).

4.2. GÉNERO CANDIDA

O número de espécies incluídas neste género tem variado com os diferentes critérios de classificação (Esteves *et al.*, 1992). Segundo Torres-Rodríguez e Carceller (1993), existem mais de 150 espécies identificadas, de que apenas uma parte é responsável por patologia humana. Entre estas espécies, apenas 3 ou 4, em particular *Candida albicans*, ocasionam mais de 90% das micoses. As espécies *non-albicans* com maior importância em Micologia Médica são *Candida tropicalis* (*Candida paratropicalis*), *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis* (*Candida kefyr*), *Candida lusitanea* e *Candida lipolytica*.

4.2.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ECOLOGIA

A espécie mais importante, *Candida albicans*, tem distribuição geográfica mundial (Enweani *et al.*, 1987; Esteves *et al.*, 1990; Torres-Rodríguez e Carceller, 1993). Algumas espécies *non-albicans* são, também, encontradas por todo o mundo, outras apresentam maior prevalência nos países tropicais e europeus (Grigoriu e Delacrétaz, 1979).

O habitat natural de *Candida albicans* é constituído pelas mucosas do Homem, de outros mamíferos e de aves, onde vive como comensal. No Homem, o tracto digestivo e o canal

vaginal constituem os principais “reservatórios”. Encontra-se raramente na pele sã (Ryley, 1986; Grigoriu *et al.*, 1987; Esteves *et al.*, 1990; Torres-Rodríguez e Carceller, 1993).

Candida albicans tem sido, também, isolada a partir do solo, de fontes vegetais, de materiais e objectos que conservam a humidade e de ambientes hospitalares (Esteves *et al.*, 1990; Torres-Rodríguez e Carceller, 1993). Em doentes internados, isola-se com maior frequência relativamente à população normal, facto provavelmente importante na perspectiva das infecções nosocomiais (Ryley, 1986; Mendling, 1988). Os isolamentos a partir da atmosfera têm sido raros (Esteves *et al.*, 1990).

O habitat das restantes espécies é mal conhecido. São, por vezes, isoladas a partir da pele e das mucosas de indivíduos sem lesões, de animais e de material inerte (Esteves *et al.*, 1990).

4.2.2. POSIÇÃO TAXONÓMICA

O género *Candida* Berkhout, 1923, igualmente conhecido por *Oidium* Robin, 1853, ou *Monilia* Zopf, 1890, entre outras sinonímias, outrora integrado na classe dos *Deuteromycetes* passou a ser considerado, por alguns autores, como pertencente à classe dos *Ascomycetes*, à medida que se foram descobrindo as formas perfeitas (teleomorfas) de algumas das espécies (Badillet *et al.*, 1987; Esteves *et al.*, 1990). Actualmente, género *Candida* é incluído na divisão *Ascomycota*.

4.2.3. CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO

A identificação de leveduras efectua-se, correntemente, com base em estudos clássicos de morfologia e fisiologia celular (Torres-Rodríguez e Carceller, 1993). As características morfológicas e de reprodução permitem a identificação dos géneros, enquanto que os critérios fisiológicos são utilizados na identificação das espécies (Lodder, 1970).

4.2.4. MORFOLOGIA

As leveduras do género *Candida* são fungos dimorfos que têm a capacidade de existir no vivo e em cultura (em vários meios e temperaturas) quer sob forma leveduriforme quer sob forma filamentosa (Esteves *et al.*, 1990; Ghannoum *et al.* em: Meunier, 1995).

Morfologicamente, caracterizam-se pela presença de células redondas, ovais, cilíndricas ou alongadas, por vezes de forma irregular (fase leveduriforme); pela formação de pseudomicélio em todas ou na maioria das espécies e variedades; e, por vezes, pelo desenvolvimento de verdadeiro micélio em algumas estirpes (fase filamentosa) (Esteves *et al.*, 1990; Ghannoum *et al.* em: Meunier, 1995).

A distinção entre pseudo e verdadeiro micélio, baseia-se na formação dos septos, espessura da parede celular e dimensões relativas das células terminais e sub-terminais. Alguns autores não reconhecem o termo pseudo-hifa, utilizado para descrever as células leveduriformes dispostas em cadeias que não se encontram permanentemente conectadas, em contraste com as verdadeiras hifas, cujos segmentos formam uma verdadeira unidade fisiológica.

Um número reduzido de espécies tem capacidade de produzir tubos germinativos. Em todas as espécies e variedades verifica-se ausência de formação de artrósporos e balistósporos (Esteves *et al.*, 1990).

4.2.5. REPRODUÇÃO

As leveduras do género *Candida* reproduzem-se assexuadamente por gemulação multipolar. Algumas espécies são ascosporadas, i.e., têm a capacidade de produzir ascos (*asci*), dentro dos quais se formam ascósporos que intervêm na reprodução sexuada. Conhecem-se, inclusivamente, as formas perfeitas (teleomorfas) de algumas espécies:

Formas sexuadas em *Candida spp.*

Forma imperfeita ou anamorfa

- *Candida pseudotropicalis* (Castellani) Basgal, 1931
- *Candida robusta* Didens e Lodder, 1942
- *Candida krusei* (Castellani) Berkhout, 1923
- *Candida guilliermondii* (Castelanii) Langeron e Guerra, 1935

Forma perfeita ou teleomorfa

- *Kluyveromyces fragilis* (Jørgensen, 1909)
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Pichia kudriavzenni* (Boidin, Pignal e Besson, 1965)
- *Pichia guilliermondii* (Wickerham, 1966)

- *Candida pulcherima* (Lindner) Windisch, 1901
- *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron e Talice, 1918
- *Candida norvegensis* (Dietrichson) Vanuden e Buckley, 1970
- *Metschni kowia pulcherima* (Pitt e Miller)
- *Lodderomyces elongisporus* (Recca e Mrak) Van der Walt
- *Pichia norvegensis* (Leask e Yarrow, 1976)

(Adaptado, em parte, de Drouhet, 1983)

4.2.6. FISILOGIA

As condições indispensáveis para a maioria das leveduras se desenvolver são: presença de fonte azotada e de fonte de carbono, pH ligeiramente ácido e temperatura entre os 30° e os 37° C (Segretain *et al.*, 1987).

As leveduras do género *Candida*, em particular, caracterizam-se por capacidade fermentativa (fermentação alcoólica em muitas espécies) e por assimilação de determinados compostos de carbono e nitrogénio. A maioria das espécies é oxidase positiva quando cultivada em meios de cultura sem glucose. Algumas espécies produzem polissacáridos extracelulares com reacção positiva para o iodo, outras têm capacidade para reduzir o trifeniltetrazólio, são sensíveis à ciclo-heximida e a determinados agentes antifúngicos. Em todas as espécies e variedades verifica-se ausência de produção de pigmentos carotenóides, de actividade ureásica e de utilização do KNO₃ (Badillet *et al.*, 1987; Esteves *et al.*, 1990).

4.2.7. CANDIDÍASE

As alterações orgânicas, locais ou gerais, por leveduras do género *Candida* – candidíases ou candidoses –, quando estes agentes adquirem capacidade patogénica, são encontradas por todo o mundo. A sua incidência depende das espécies envolvidas e varia de região para região (Grigoriu *et al.*, 1987).

Em condições especiais do organismo do hospedeiro, verifica-se o aparecimento de lesões cuja gravidade é extremamente variável, desde o vulgar “sapinho” (candidíase bucal) até à sépsis mortal. As infecções podem revelar-se de modo agudo, subagudo ou crónico,

registando-se tendência para recidiva, se não forem corrigidas as causas que motivam o aparecimento da doença (Esteves *et al.*, 1992).

Admite-se que, na maioria dos casos, a candidíase por *Candida albicans* seja de origem endógena. Quando estão em causa outras espécies patogénicas de *Candida*, a infecção é frequentemente exógena (Esteves *et al.*, 1992).

As infecções adquirem fisionomia expressiva na superfície do corpo, sendo incharacterísticas no interior do organismo. A sintomatologia depende da localização da doença (Esteves *et al.*, 1992).

4.2.7.1. QUADROS CLÍNICOS

A candidíase inclui uma diversidade polimorfa de quadros clínicos, em regra localizados, que afectam a pele, as mucosas, as unhas, o tecido subcutâneo ou os órgãos internos.

As lesões cutâneo-mucosas são sobretudo intertriginosas e as viscerais têm carácter ocasional. Observam-se, também, formas disseminadas, superficiais ou sistémicas. As formas diagnosticadas com maior frequência são a candidíase bucal e a vaginal (Enweani *et al.*, 1987; Segretain *et al.*, 1987; Esteves *et al.*, 1990; Torres-Rodríguez e Carceller, 1993).

Actualmente, verifica-se um aumento da prevalência de lesões superficiais provocadas por fungos leveduriformes. Neste grupo de fungos tem sido referido, sobretudo, o género *Candida spp.* (Alteras, 1979; Araújo, 2003; Onychomycosis, 2007).

4.2.7.2. PATOGENIA E SUSCEPTIBILIDADE PARA A INFECÇÃO

As leveduras do género *Candida*, em particular *Candida albicans*, inicialmente saprófitas, podem, na presença de alterações nas condições fisiológicas ou patológicas do indivíduo, adquirir capacidade patogénica (Grigoriu e Delacrétaz, 1979).

Vários autores defendem que a passagem do estado de comensalismo a patogénico é acompanhada por modificações do fungo que funcionam como factores de virulência, conferindo-lhe a capacidade de aderência às células do hospedeiro (Sandi e Rogers, 1982;

Esteves *et al.*, 1990; Pike *et al.*, 1991; Ghannoum e Edwards Jr, 1992; Torres-Rodríguez e Carceller, 1993; Senet e Robert, 1995).

Segundo Torres-Rodríguez e Carceller (1993) e Senet e Robert (1995), essas modificações compreendem: desenvolvimento de formas filamentosas com produção de hifas ou pseudo-hifas, reestruturação da parede celular, alterações na superfície hidrofóbica e nas propriedades de aderência a células e a outros materiais, aumento da secreção proteica, produção de enzimas extracelulares (proteínases e fosfolipases), variabilidade genética e antigénica, entre outras.

Alguns autores referem que a susceptibilidade para a infecção seja devida a situação constitucional ou adquirida do indivíduo (Ryley, 1986; Esteves *et al.*, 1990).

Senet e Robert (1995), defendem que a severidade do processo infeccioso depende do grau imunológico de “enfraquecimento” do hospedeiro, que conduz à proliferação do fungo, o que significa que na patogenia da candidíase humana, a diferença de virulência entre as estirpes afigura-se, possivelmente, menos relevante do que a susceptibilidade do indivíduo para a afecção.

4.2.7.3. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

O diagnóstico micológico de todas as formas de candidíase, ao contrário do que acontece na maioria das micoses, não deve fundamentar-se unicamente no isolamento e na identificação dos respectivos agentes etiológicos, uma vez que:

- *Candida albicans* é muito frequente nas mucosas humanas em estado de comensalismo;
- Outras espécies de leveduras são também isoladas, embora com menor frequência, da pele e das mucosas de indivíduos aparentemente saudáveis.

Nestas condições é, por vezes, difícil valorizar o papel comensal ou patogénico das leveduras isoladas (Segretain *et al.*, 1987; Odds *et al.*, 1988; Esteves *et al.*, 1990), o que exige a consideração de vários factores:

- Observação directa do agente nas lesões: quantidade e morfologia;

- Manifestações patológicas produzidas;
- Quantidade e morfologia do agente no exame directo;
- Número de colónias desenvolvidas em cultura;
- Identificação da(s) espécie(s);
- Relação entre a(s) espécie(s) isolada(s) e a localização das lesões (adaptado de Esteves *et al.*, 1990).

5. TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA

Os agentes antifúngicos são utilizados no tratamento de infecções fúngicas.

Os **agentes antimicóticos tópicos** encontram-se disponíveis sob forma de cremes, loções, pó sprays e vernizes (Sobel em: Kibbler *et al.*, 1996) e utilizam-se, correntemente, na prática clínica no tratamento de infecções da pele, dos seus anexos queratinizados (unhas ou cabelo) ou das mucosas.

Os **agentes antimicóticos de uso geral** existem sob forma de comprimidos e são administrados, geralmente, na prática clínica no tratamento de infecções profundas ou sistémicas e, também, em doentes com infecções fúngicas recorrentes.

Qualquer vantagem proveniente da administração de terapêutica oral sob o ponto de vista clínico, deverá ser ponderada contra os potenciais efeitos colaterais adversos e a possível toxicidade provocada pela utilização dos antimicóticos orais (Sobel em: Kibbler *et al.*, 1996).

O aumento do número de doentes em imunossupressão, entre outras causas, e a conseqüente incidência de infecções fúngicas, sistémicas e oportunistas, provocadas em elevada percentagem por leveduras dos géneros *Candida* e *Cryptococcus* impulsionaram os avanços na terapêutica antifúngica, o que conduziu à emergência de novos fármacos e à necessidade de standardização dos testes de susceptibilidade *in vitro* (Carrillo-Muñoz, 1993; Favel *et al.*, 1995).

Actualmente, são muitos os fármacos antimicóticos disponíveis, sendo os principais os polienes, os azóis, as alilaminas e um grupo diverso que inclui a griseofulvina (Hay, 1994).

Polienes:

Os polienes são antibióticos antifúngicos produzidos sobretudo por espécies do género *Streptomyces spp.* e caracterizados por um número variável de duplas ligações. São antibióticos macrólitos que se ligam preferencialmente ao ergosterol das membranas celulares fúngicas, formando canais porosos transmembranares que permitem a passagem de pequenas

moléculas e iões através deles, levando a uma eliminação dos gradientes iónicos (K^+ , Mg^{2+} , açúcares e outros metabolitos) e conduzindo assim à morte celular. Foram os primeiros antifúngicos a serem produzidos. Têm um largo espectro de acção, poucos fungos lhes são resistentes e são pouco tóxicos por via oral, no entanto, a toxicidade aumenta por via parentérica (Esteves *et al.*, 1990).

A **anfotericina B**, um antifúngico do grupo dos polienes, é um fungicida de largo espectro mas está associado a efeitos secundários adversos significativos, tais como: toxicidade renal, dores de cabeça, convulsões, febre e calafrios. No entanto, a sua toxicidade é suficientemente limitada para permitir uma utilização sistémica. A anfotericina B de administração intravenosa é bastante utilizada em infecções fúngicas disseminadas, principalmente em doentes imunodeprimidos. Muitos dos efeitos secundários estão relacionados com a sua grande toxicidade, pelo que se têm tentado novas formulações, combinando a anfotericina com um complexo lipossomal. As novas fórmulas de anfotericina na forma lipossómica e de dispersão coloidal produzem menos efeitos colaterais (Esteves *et al.*, 1990; Bergold e Georgiadis, 2004).

A **nistatina**, outro antifúngico do grupo dos polienes, tem a vantagem de ser menos tóxico do que a anfotericina B, no entanto, tem apenas aplicação tópica. Foi o primeiro antifúngico a ser descrito e o primeiro específico na terapia da candidíase (Bergold e Georgiadis, 2004).

Alilaminas:

Nos últimos anos, tem sido estudada uma nova linha de antifúngicos sintéticos, derivados de alilamina, nomeadamente a **naftifina**, usada na forma tópica. A naftifina tem grande capacidade anti-inflamatória, e revela-se eficaz nas dermatofitias (Bergold e Georgiadis, 2004).

Outro antifúngico desta linha é a **terbinafina**, igualmente eficaz nas dermatofitias mas de administração oral. Trata-se de um composto altamente lipofílico que tende a acumular-se na pele e nas unhas. O seu modo de acção caracteriza-se pela diminuição da síntese de ergosterol, uma vez que inibe a esqualeno epoxidase (enzima necessária à síntese de ergosterol). A sua acção fungicida poderá ser devida à acumulação intracelular de esqualeno ou a uma disrupção secundária da síntese de quitina (Bergold e Georgiadis, 2004).

Azóis:

É conhecida desde a década de 40 a actividade antibacteriana e antifúngica do benzimidazol. Na década seguinte, observou-se que a substituição de certos átomos desta molécula aumentava a sua actividade.

Os azóis têm um mecanismo de acção mais lento que as outras classes de antifúngicos e actuam penetrando na célula fúngica impedindo a síntese de esteróis, nomeadamente o ergosterol, o qual desempenha importante papel na homogeneidade e na estabilidade da membrana celular cuja permeabilidade aumenta pela sua falta. Esta classe de antifúngicos actua inibindo a citocromo P450 C-14 α -dimetilase (P45014DM). Esta é uma enzima que permite a conversão de lanosterol em ergosterol, durante a biossíntese deste último. O bloqueio da síntese do ergosterol compromete a integridade das enzimas oxidativas, o que leva à acumulação de fosfolípidos no interior das células fúngicas, culminando na morte celular (Esteves *et al.*, 1990).

Os azóis possuem um espectro de acção largo, sendo também utilizados em infecções generalizadas, causando menos reacções adversas que a anfotericina B. O uso excessivo destes fármacos levou ao aparecimento de resistências em algumas espécies. Neste grupo estão incluídos antifúngicos, tais como: **cetoconazol**; **clotrimazol**; **econazol**; **isoconazol**; **miconazol**; **tioconazol** (Bergold e Georgiadis, 2004).

Os primeiros derivados azólicos comercializados surgiram na década de 70. Os primeiros a surgirem foram o miconazol e o cetoconazol, que hoje em dia são basicamente usados no tratamento de infecções ginecológicas e dermatológicas, como candidíases e dermatofitias (Bergold e Georgiadis, 2004).

Na década de 80 surgiram novos derivados azólicos, os triazólicos, dos quais se destacam o **fluconazol** e o **itraconazol**, que constituíram um grande avanço em infecções fúngicas sistémicas (Bergold e Georgiadis, 2004).

Nos nossos dias, observa-se a chegada dos triazólicos de segunda geração: **voriconazol**; **posaconazol**; **raVuconazol**. Estes três antifúngicos apresentam acção via oral, podendo o voriconazol ser, também, administrado na forma intra venosa. Estudos recentes comprovam a

excelente actividade antifúngica do voriconazol, que apresenta um maior espectro de acção que o itraconazol. O voriconazol é indicado para o tratamento de aspergiloses invasivas e infecções graves causadas por *Scedosporium apiospermum* e *Fusarium spp.* (Bergold e Georgiadis, 2004).

As principais diferenças entre as várias moléculas de azóis dizem respeito à farmacocinética e à sua avidéz relativa para células imidazóis (cetonazol; clotrimazol; econazol; isoconazol; miconazol; tioconazol) e os mais recentes triazóis (fluconazol; itraconazol; voriconazol; posaconazol; ravuconazol).

Griseofulvina:

Antifúngico isolado em 1938, por Oxford *et al.*, a partir de *Penicillium griseofulvum*. A griseofulvina actua penetrando nas células fúngicas por um processo dependente de energia e provoca disrupção do fuso mitótico, ficando o ciclo celular parado em metafase, pelo que os fungos deixam de invadir o tecido do hospedeiro. É um antifúngico activo contra todas as espécies de dermatófitos, mas não contra os agentes etiológicos das restantes micoses superficiais. No Homem, é o antibiótico antifúngico com melhor absorção por via oral e é activo nas diferentes localizações das dermatofitias (pele, unhas, couro cabeludo e barba). Como efeitos colaterais descrevem-se dores de cabeça, perturbações gastrointestinais, erupções cutâneas e leucopenia (Esteves *et al.*, 1992). Os casos em que o tratamento pela griseofulvina não é eficaz nas dermatofitias têm sido relacionados desde há anos com deficiências imunitárias do doente, uma vez que são raras as estirpes resistentes *in vitro* (Hildick-Smith, 1964, Meyer-Rohn, 1971, De Vroey, 1985 e Svejgaard, 1985 citados por Esteves *et al.*, 1992).

6. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO*

O interesse e a procura pelos testes de susceptibilidade *in vitro* reforçaram-se nos últimos anos (Galgiani *et al.*, 1992; Dromer, 1995; Odds, 1995).

Os testes de susceptibilidade *in vitro* baseiam-se na diluição ou na difusão dos agentes antifúngicos em meios de cultura, nos quais o fungo se desenvolve (Carrillo-Muñoz, 1994).

Estes testes têm valor potencial, antes do tratamento, para determinar a escolha do antifúngico mais adequado em cada caso individual, com o objectivo de se prever o eventual sucesso terapêutico (Galgiani *et al.*, 1992; Dromer, 1995; Odds, 1995). No decurso do tratamento, constituem contributo valioso para controle terapêutico e detecção do possível aparecimento de resistências (Favel *et al.*, 1995).

No entanto, até à data, poucos estudos demonstraram a correlação entre a clínica e os resultados *in vitro* (Van Cutsem, 1988; Dromer, 1995), sendo também conhecida a resistência intrínseca de algumas leveduras aos azóis (*Candida krusei* e muitas estirpes de *Candida glabrata*) e a existência de estirpes de *Candida albicans* resistentes em pacientes com SIDA (Torres-Rodríguez, 1996).

A corrente aplicação dos testes de susceptibilidade *in vitro* encontra-se limitada pelo número de variáveis introduzidas durante o processo laboratorial, que inclui: o tipo de solventes utilizados nas técnicas de macrodiluição para obtenção de suspensões fúngicas e para diluição dos agentes antifúngicos; a composição e o pH dos meios de cultura utilizados nos métodos de difusão em agar; a concentração e o modo de preparação do inóculo; a temperatura e o tempo de incubação; os critérios de leitura utilizados, entre outros (Van Cutsem, 1988; Galgiani *et al.*, 1992; Carrillo-Muñoz, 1994).

Os resultados podem, também, ser condicionados pela “idade laboratorial” da estirpe e pela própria fisiologia dos fungos, nomeadamente, a sua taxa de crescimento lenta e a capacidade que certos fungos dimorfos têm de crescer quer sob forma unicelular (leveduriforme), quer sob forma miceliana (filamentosa), dependendo das condições de pH, temperatura e composição do meio de cultura (Galgiani *et al.*, 1992).

Outros factores a ter em consideração são as propriedades básicas dos próprios agentes antifúngicos, das quais se salientam: a sua solubilidade, estabilidade metabólica, actividade antifúngica intrínseca e a tendência para produzirem inibição parcial do crescimento do fungo, em particular, nas técnicas de macrodiluição, quando em presença de vasta série de concentrações (Galgiani *et al.*, 1992; Dromer, 1995).

Impôs-se, como necessária, a uniformização da metodologia para que os resultados fossem compreensíveis. Nesse sentido, o “National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)” criou um subcomité para coordenar o trabalho nesta área com o objectivo de desenvolver um método de referência seguro e reprodutível que permitisse a correlação entre os resultados *in vitro* e a eficácia clínica (Galgiani *et al.*, 1992).

Método de referência:

O "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts" constitui o método de referência standardizado e aprovado pelo NCCLS, designado actualmente por “Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)”. Trata-se de um método de determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), realizado por macro ou micro diluições.

No entanto, apesar dos esforços desenvolvidos, o método de referência proposto para avaliar a susceptibilidade *in vitro* de leveduras e de outros fungos aos derivados imidazólicos, em especial, continua a ser controverso. A interpretação de resultados não está, ainda, bem documentada e a correlação com a clínica não se encontra esclarecida (Dromer, 1995; Favel *et al.*, 1995; Torres-Rodríguez, 1996). Mais estudos serão necessários para que os resultados *in vitro* possam constituir um guia terapêutico com vista ao sucesso clínico (Dromer, 1995).

Existem outros métodos cujos resultados são relativamente satisfatórios quando comparados com o método de referência.

Método dos discos:

O método dos discos é o método clássico de realização de antifungogramas que consiste na utilização de discos impregnados de agentes antifúngicos com diferentes concentrações, consoante a molécula testada.

Os discos são aplicados sobre uma placa de meio de cultura sólido previamente semeada com uma suspensão do fungo isolado. Nesta técnica, deve-se respeitar a densidade do inóculo e o tempo de incubação recomendado, para se poder efectuar a leitura do diâmetro dos halos ou zonas de inibição de crescimento do fungo isolado, relativamente aos diferentes antifúngicos testados. A leitura dos halos de inibição formados pode ser dificultada pelo surgimento de um duplo halo de inibição ou pelo crescimento de micro-colónias no interior da zona de inibição, principalmente no caso dos azóis.

E-test:

O E-test é uma técnica de determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), baseada na utilização de tiras rectangulares de um material inerte impregnado com um gradiente exponencial pré-definido do antifúngico a estudar.

As tiras são colocadas sobre uma placa de meio de cultura sólido previamente semeada com uma suspensão do fungo isolado. Após incubação, a inibição do crescimento fúngico traduz-se pela presença de uma elipse, cujos pontos de intersecção com a escala da tira definem a CMI. Trata-se de uma técnica simples, rápida e reprodutível, mas dado o seu objectivo e o seu custo é, em regra, reservada a casos particulares: micoses sistémicas a leveduras ou estirpes de leveduras resistentes a antifúngicos.

ATB TM FUNGUS 2 INT (bioMérieux):

A galeria ATB TM FUNGUS 2 INT (bioMérieux) permite determinar a susceptibilidade das leveduras do género *Candida* e da espécie *Cryptococcus neoformans* aos antifúngicos em meio semi-sólido em condições muito próximas do método de referência de micro-diluição (conforme as recomendações da EUCAST e do CLSI/NCCLS).

A galeria ATB[™] FUNGUS 2 INT (bioMérieux) é constituída por 16 pares de cúpulas. O primeiro par, sem antifúngico, serve de controlo de crescimento. Os 15 seguintes contêm 4 antifúngicos – Flucitosina; Anfotericina B; Fluconazol; Itraconazol – de várias concentrações que permitem determinar as CMI. A levedura a testar é colocada em meio de suspensão, transferida para o meio de cultura do kit e inoculada na galeria. Após incubação, a leitura do crescimento é feita quer visualmente, quer com o sistema ATB ou mini API[®]. O resultado obtido permite fornecer uma CMI.

No que respeita aos fungos dermatófitos, não existe disponível, até à data, um método de referência estandardizado para a determinação da susceptibilidade *in vitro* de fungos dermatófitos a agentes antifúngicos (Ghannoum, 2001 citado por Karaca e Koç, 2004). Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos, a nível internacional, de determinação da susceptibilidade *in vitro* de dermatófitos a agentes antifúngicos e os resultados têm demonstrado variações consideráveis (Mock *et al.*, 1998 e Jessup *et al.*, 2000 citados por Karaca e Koç, 2004).

7. DERMATOMICOSSES E DOENTES DIABÉTICOS

Os fungos adquirem presentemente uma importância acrescida devido à incidência cada vez maior de micoses crónicas, por vezes fatais, em pessoas cujo sistema imunitário esteja comprometido. Destas, é de referir particularmente doentes de leucemia, tumores, SIDA, diabetes ou fibrose quística (Torres-Rodríguez e López-Jodra, 2000).

Um dos grupos mais susceptíveis a infecções fúngicas superficiais é o dos doentes diabéticos, uma vez que a alteração do seu sistema imunológico compromete as suas defesas naturais, por exemplo ao nível da pele e das unhas (Mateus, 2005).

A diabetes é uma doença metabólica crónica com elevados custos humanos, sociais e económicos em franco crescimento nos países desenvolvidos e em rápida expansão por todo o mundo. É considerado como o mais grave problema de saúde pública e, só no nosso país, calcula-se que existam entre 400.000 a 500.000 pessoas com diabetes (APDP, 2007). Tal como nos outros países, metade das pessoas não sabem que têm diabetes (diabetes tipo 2). Esta situação deve-se ao facto de que pessoas com diabetes tipo 2, na imensa maioria obesas, podem já ser diabéticas, sem terem os sintomas habituais da doença. Quando se faz o diagnóstico de diabetes já decorreram muitos anos da doença: em média, 7 a 8 anos.

A diabetes deve ser encarada como um conjunto de alterações no organismo provocado pela falta de insulina, uma hormona que é segregada pelas células β , dos ilhéus de Langerhans, do pâncreas e a consequente subida de açúcar no sangue: hiperglicémia. É uma doença crónica e incurável, sendo, no entanto, perfeitamente controlável. O arsenal terapêutico hoje existente e uma cuidada educação do paciente, permitem às pessoas com diabetes aprender a viver com a sua doença, a ter um quotidiano compatível com uma boa qualidade de vida e a exercer uma profissão, seja ela qual for (APDP, 2007).

De acordo com a Circular Normativa N° 09/DGCG de 4 de Julho de 2002, os actuais critérios de classificação e diagnóstico da Diabetes *Mellitus* estabelecem a existência de quatro tipos clínicos, etiologicamente distintos, da diabetes:

- **Diabetes tipo 1:** Resulta da destruição das células β do pâncreas, com insulinopenia absoluta, passando a insulinoterapia a ser indispensável para assegurar a sobrevivência. Na maioria dos casos, a destruição das células β dá-se por um mecanismo auto-imune, pelo que se passa a denominar **Diabetes tipo 1 Auto-imune**. Em alguns casos, no entanto, não se consegue documentar a existência do processo imune, passando a ser denominada por **Diabetes tipo 1 Idiopática**. A diabetes tipo I corresponde a cerca de 10% da totalidade dos diabéticos e pode surgir de uma forma aguda, muito em especial em idades mais jovens e mesmo em crianças de tenra idade;
- **Diabetes tipo 2:** É a forma mais frequente de diabetes, resultando da existência de insulinopenia relativa, com maior ou menor grau de insulinoresistência. Corresponde a 90% da totalidade dos diabéticos e surge principalmente em idades mais avançadas, depois dos 40 anos de idade, o que não significa que não possa aparecer mais cedo.
- **Diabetes Gestacional:** Corresponde a qualquer grau de intolerância à glucose documentado, pela primeira vez, durante a gravidez;
- **Outros tipos específicos de Diabetes:** Correspondem a situações em que a diabetes é consequência de um processo etiopatogénico identificado, como, por exemplo, doença pancreática.

Os doentes diabéticos são, em geral, reconhecidos como pacientes mais vulneráveis a uma série de complicações de natureza metabólica e/ou de origem infecciosa, como os processos bacterianos, fúngicos e virais. Somam-se as implicações próprias da doença, que incluem alterações vasculares e neurológicas, que muitas vezes contribuem para agravar as condições clínicas existentes (Sibbald, 1984, Huntley, 1986, Jelinek, 1994, Romano *et al.*, 1998, Shemer *et al.*, 1998 e Koivukangas *et al.*, 1999 citados por Minelli *et al.*, 2003). A insuficiência vascular periférica e a neuropatia diabética representam factores que predis põem à instalação e ao desenvolvimento de infecções nos tecidos queratinizados (Huntley, 1986 citado por Minelli *et al.*, 2003).

A hiperosmolaridade do soro do diabético ocasiona anomalias na função leucocitária, a qual é associada à diminuição na difusão de nutrientes e à migração dos leucócitos através das

paredes vasculares espessadas. A pele do diabético passa a ser um órgão aberto às mais variadas formas de comprometimento, especialmente de origem infecciosa, facilitando as complicações e/ou retardando a cura de processos aparentemente benignos e de curta duração (Koivukangas *et al.*, 1999 citados por Minelli *et al.*, 2003).

Os doentes diabéticos apresentam muitas vezes manifestações cutâneas aliadas à doença, sendo frequente a colonização dos tecidos queratinizados por fungos, incluindo os processos causados por dermatófitos e leveduras do género *Candida*, o que pode constituir uma porta de entrada para infecções mais graves ou dar origem ao aparecimento de dermatomicoses, especialmente onicomicoses, de difícil tratamento, sobretudo nos membros inferiores (Minelli *et al.*, 2003; Mateus, 2005).

O pé diabético:

Os pés são alvo da convergência de praticamente todas as complicações crónicas a que o doente diabético está sujeito, em função do potencial elevado de produzir incapacidade. Um grande número de amputações das extremidades inferiores ocorre anualmente em pessoas diabéticas, e estima-se que mais de metade delas poderia ser evitada mediante cuidados apropriados com os pés (Minelli *et al.*, 2003).

A úlcera neurotrófica plantar representa a complicação final das alterações patológicas provocadas pela neuropatia devido à formação de calosidades plantares que fissuram e ulceram (Saye, 1994 citado por Minelli *et al.*, 2003).

Mesmo em estado de equilíbrio, quando não existe infecção das camadas profundas da pele, podem ocorrer importantes manifestações da pele e seus anexos, como infecções micóticas das unhas, das margens ungueais e dos espaços interdigitais, onde a humidade é maior. As infecções ungueais por fungos são frequentes, conduzindo a relevantes alterações das unhas que podem favorecer o aparecimento de infecções secundárias mais graves, como paroníquias (Torres *et al.*, 1993 e Albreski *et al.*, 1999 citados por Minelli *et al.*, 2003).

A colonização das camadas profundas da pele ou a progressão rápida da infecção em camadas superficiais tem importância variável, dependendo do estado da circulação local. A obstrução

arterial e a microangiopatia favorecem a instalação da infecção, levando a quadros de necrose séptica por grande variedade de agentes patogénicos (Minelli *et al.*, 2003).

Vários autores, de diferentes países, têm sugerido que é previsível a obtenção de uma prevalência mais elevada de dermatomicoses em doentes diabéticos comparativamente a indivíduos não diabéticos (Alteras e Saryt, 1979; Gupta *et al.*, 1998; Piérard e Piérard-Franchimont, 2005; Interamerican College of Physicians & Surgeons, 2006; Onychomycosis, 2007). Num desses estudos, determinou-se que o risco de aparecimento de onicomioses em doentes diabéticos é aproximadamente três vezes superior quando comparado com indivíduos não diabéticos. No mesmo estudo, determinou-se a prevalência de onicomioses em doentes diabéticos em 26%, e estimou-se que um terço das pessoas com diabetes possam desenvolver onicomioses durante o decorrer da sua vida (Gupta *et al.*, 1998).

Considerando a natureza dos agentes etiológicos identificados, segundo a literatura, verifica-se uma predominância de fungos dermatófitos em relação a fungos filamentosos não dermatófitos e leveduriformes, em pacientes diabéticos e não diabéticos (Alteras e Saryt, 1979; Araújo *et al.*, 2003; Piérard e Piérard-Franchimont, 2005; Onychomycosis, 2007). No entanto, a casuística da Unidade de Micologia do INSA, I.P. referente aos últimos cinco anos (2002-2006) sugere o aumento da prevalência de dermatomicoses provocadas por fungos leveduriformes e por outros fungos filamentosos queratinofílicos em relação a fungos dermatófitos, em pacientes não diabéticos.

Têm, também, sido referidos alguns factores predisponentes e/ou de risco para o desenvolvimento de onicomioses em pessoas com diabetes como: idade, sexo, história familiar de onicomiose, tratamentos com imunossuppressores, doença vascular periférica, caminhar descalço em zonas contaminadas (piscinas; duches comuns), prática de exercício físico e uso de meias de desporto (Gupta *et al.*, 1998; Interamerican College of Physicians & Surgeons, 2006).

Neste enquadramento, e uma vez que são escassos os dados referentes a infecções fúngicas superficiais em doentes diabéticos no nosso país, será importante a realização de um estudo prospectivo que permita determinar a sua prevalência, averiguar quais as espécies fúngicas mais frequentes e avaliar os eventuais factores predisponentes para a infecção.

II – PROJECTO CIENTÍFICO

1. OBJECTIVOS

Este projecto científico teve como **objectivo geral** avaliar a presença de dermatomicoses nos membros inferiores em doentes diabéticos seguidos na Consulta de Podologia da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal (APDP), em Lisboa.

Os **objectivos específicos** do nosso estudo foram os seguintes:

- Comparar os resultados obtidos para a população de doentes diabéticos com uma população controlo constituída por pacientes não diabéticos, com suspeita clínica de dermatomicose, que efectuaram análises micológicas no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P. (INSA, I.P.), em Lisboa;
- Isolar e identificar fungos dermatófitos, outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos e fungos leveduriformes que afectam a pele e/ou respectivos anexos queratinizados – unhas – na população de doentes diabéticos e na população controlo;
- Averiguar quais as espécies fúngicas mais frequentes nas duas populações estudadas;
- Correlacionar os factores predisponentes apurados com a positividade das amostras na população diabética, por análise de protocolo clínico previamente elaborado;
- Determinar a susceptibilidade *in vitro* de fungos leveduriformes isolados na população diabética a diversos antifúngicos e contribuir para a implementação na rotina laboratorial do método de difusão em agar para determinação da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de fungos dermatófitos a agentes antifúngicos;
- Comparar os resultados obtidos para a população diabética portuguesa estudada com os dados da literatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL DE ESTUDO

O material de estudo foi constituído por amostras de produtos biológicos com queratina, nomeadamente pele e respectivos anexos queratinizados – unhas – dos membros inferiores. A escolha deste tipo de amostras biológicas deveu-se à conjugação de dois factores:

- Os indivíduos com diabetes apresentam uma circulação sanguínea deficiente ao nível dos seus membros inferiores, pernas e pés, o que provoca um menor aporte de oxigénio nessas zonas do corpo, sendo frequente a colonização dos tecidos queratinizados por fungos;
- A alteração do sistema imunológico nestes doentes compromete a capacidade do seu organismo combater as infecções fúngicas, por exemplo ao nível da pele e das unhas, o que pode dar origem ao aparecimento de dermatomicoses de difícil tratamento ou constituir uma porta de entrada para infecções mais graves.

2.2. POPULAÇÕES ESTUDADAS

No período compreendido entre 2007-03-01 e 2007-08-31 efectuaram-se colheitas de pele e/ou de unhas em duas populações diferentes: uma população diabética e uma população controlo.

A **população diabética** seguida na Consulta de Podologia da APDP foi constituída por 163 doentes diabéticos, com sinais e/ou sintomas clínicos para o diagnóstico clínico de dermatomicose, de idades compreendidas entre os 27 e os 89 anos, e cuja média de idades se situou nos $63,68 \pm 0,993$ anos (média \pm desvio padrão). Efectuaram-se colheitas de pele e/ou de unha(s) dos membros inferiores, em cada doente diabético, totalizando 272 amostras.

O presente estudo revelou algumas questões de índole ética, ao longo da elaboração dos questionários, tendo sido solicitada a autorização da Comissão de Ética da APDP. Todos os doentes diabéticos que, de alguma forma participaram no presente estudo, foram informados sobre os objectivos e a natureza do estudo, sendo-lhes dado o direito de decidir livremente

sobre a sua participação e colaboração na investigação, por meio de um consentimento informado (Anexo I). No mesmo documento foi solicitado aos doentes que autorizassem a colheita de amostras de pele e/ou de unha(s) para a realização de análises, bem como a disponibilização dos seus dados clínicos. Foi ainda assegurado que a identidade do indivíduo não seria associada às respostas fornecidas nos questionários aplicados, uma vez que o seu preenchimento e tratamento foram efectuados de forma anónima e confidencial. Assim, a colheita dos diferentes produtos biológicos nesta população foi acompanhada de preenchimento de protocolo clínico previamente elaborado (Anexo I), onde foram registados dados clínicos relevantes do doente, sendo sempre mantida a confidencialidade dos dados pessoais.

A **população controlo** foi constituída por 141 pacientes não diabéticos, com suspeita clínica de dermatomicose, que efectuaram análises micológicas no INSA, I.P.. Realizaram-se colheitas de pele e/ou de unha(s) em cada paciente, totalizando 187 amostras.

A colheita dos diferentes produtos biológicos nesta população foi acompanhada de preenchimento de ficha de identificação do utente, onde foram registados alguns dados clínicos de cada paciente, de acordo com o procedimento de rotina existente na Central de Análises do INSA, I.P.. Foram incluídos no estudo todos os pacientes que efectuaram análises micológicas de pele e/ou de unha(s) dos membros inferiores. Foram excluídos do estudo todos os pacientes diabéticos, todos os pacientes que efectuaram análises micológicas a cabelo/couro cabeludo e todos os pacientes que efectuaram análises micológicas de pele e/ou de unha(s) de outras localizações anatómicas do corpo humano.

2.3. PROTOCOLO CLÍNICO

Com o objectivo de se correlacionarem os factores predisponentes com a presença de fungos na pele e/ou nas unhas na população diabética registaram-se, para cada doente diabético, com base num protocolo clínico previamente estabelecido (Anexo I), os principais factores que têm sido considerados como predisponentes de dermatomicoses, os quais se enunciam seguidamente:

Factores predisponentes:

- Localização da lesão
- Sexo
- Idade
- Grupo étnico
- Profissões de risco
- Região do País de residência

• Endócrinos	Diabetes Tipo 1 Diabetes Tipo 2	Anos de evolução Controlo A1c
--------------	------------------------------------	----------------------------------

• Metabólicos	Obesidade	
---------------	-----------	--

- Outras doenças gerais
- Doença vascular periférica
- Úlcera do pé
- Trauma prévio da(s) pele/unha(s)
- Dificuldade/incapacidade para manter higiene apropriada da(s) pele/unha(s)

• Tratamentos	Hipoglicemiantes	AO Insulina
	Gerais	Antibióticos Antifúngicos Imunossuppressores Corticosteróides Outros
	Locais	Antissépticos Antibióticos Antifúngicos Outros

- Antecedentes pessoais de dermatomicoses
- Genéticos | História familiar de dermatomicoses
- Exposição a grandes quantidades de inóculo | Exercício físico | Piscinas
| Meias de fibra | Ginásio
- Vestuário e calçado | Meias de desporto
| Sapatos de desporto
- Contacto com animais | Animais domésticos

2.4. COLHEITAS

Procedeu-se à colheita asséptica de amostras de tecidos queratinizados (pele e/ou unhas) para exame micológico, em ambas as populações estudadas. As amostras foram colhidas, sempre que possível, antes do início de tratamento com agentes antimicóticos. As técnicas de colheita de pele e de unhas descrevem-se seguidamente:

Colheita de pele:

Nas infecções de pele, o material biológico deve ser colhido a partir da fronteira entre o tecido infectado e o tecido saudável. Antes da amostra ser retirada, a pele deve ser limpa com álcool a 70% para remover vestígios de pomadas ou unguentos. A colheita de pele efectua-se raspando com um bisturi estéril a periferia da lesão. As escamas de pele são recolhidas para o interior de uma placa de Petri esterilizada. Por último, passa-se com uma zaragatoa estéril embebida em soro fisiológico esterilizado sobre a lesão (Fig. 2 e 3).

Para a pesquisa de fungos nos espaços interdigitais das mãos e dos pés raspa-se com bisturi estéril ambos os lados e a base de cada espaço interdigital, devendo também colher-se amostra do 4º espaço interdigital mesmo sem qualquer lesão. No caso de não ser possível proceder deste modo, passa-se apenas na zona afectada com uma zaragatoa estéril embebida em soro fisiológico esterilizado.



Fig. 2 – Aspecto clínico de dermatomicose da pele.



Fig. 3 – Colheita de pele.

Colheita de unhas:

A colheita de unhas infectadas efectua-se raspando com um bisturi estéril várias camadas da parte dorsal da unha, principalmente da zona entre o tecido saudável e o tecido infectado. Cortam-se as partes afectadas com o auxílio de uma tesoura estéril. O material raspado/cortado é recolhido para o interior de uma placa de Petri esterilizada. Por último, passa-se com uma zaragatoa estéril embebida em soro fisiológico esterilizado sobre a lesão (Fig. 4 e 5).



Fig. 4 – Aspecto clínico de dermatomicose das unhas.



Fig. 5 – Colheita de unhas.

As placas de Petri e as zaragatoas foram devidamente identificadas com o número de processo de cada paciente e a localização da lesão. As amostras biológicas provenientes da população diabética eram transportadas semanalmente para o Laboratório de Micologia do INSA, I.P. onde se efectuava o seu processamento, no sentido de se evitar a contaminação dos prováveis elementos fúngicos presentes. As amostras biológicas provenientes da população controlo eram transportadas diariamente para o referido laboratório onde se efectuava o seu processamento (Fig. 6).

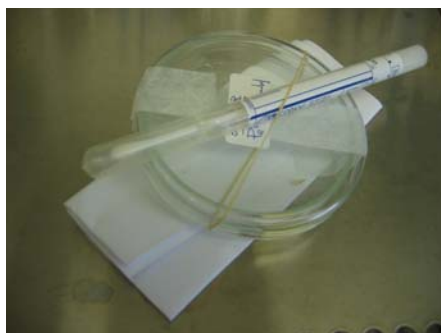


Fig. 6 – Amostra biológica de unha proveniente da população controlo. Placa de petri com fragmentos de unha e zaragatoa da respectiva lesão ungueal.

2.5. ESTUDO MICOLÓGICO

Material e equipamento utilizado:

- Algodão hidrófilo
- Ansas estéreis, 10 µl
- Aparelho ATB™ Expression™, bioMérieux, para leitura automática das galerias de identificação ID 32 C® (bioMérieux)
- Autoclaves
- Bicos de Busen, para manter as condições de assepsia nas bancadas de trabalho e flamejar os bocais dos tubos de ensaio
- Bico eléctrico, pbi international, para esterilização de fios rectos e de lancetas de metal, antes e depois de se efectuar o corte de fungos filamentosos na Câmara de Segurança Biológica
- Bisturis esterilizados Romed® HOLLAND, Refª.: SCALP 24
- Caixa de esferovite
- Câmara de Segurança Biológica – Classe II Bio-II-A, Telstar, para sementeira de produtos clínicos
- Câmara de Segurança Biológica – Classe II BSB 36, ICN Flow, para repicagem de fungos filamentosos, corte de colónias e preparação de exames microscópicos
- Câmara Fotográfica Digital Canon powershot s45, Leica
- Combinado de laboratório medcool, Sanyo, para armazenamento de meios de cultura e soluções
- Combinado de laboratório medcool, Sanyo, para armazenamento de reagentes

- Densitómetro DENSIMAT MM005230, bioMérieux, para medição da densidade de soluções
- Estufas de esterilização
- Estufa de incubação Memmert, Concessus, a $30^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, para incubação de galerias de identificação ID 32 C[®]
- Estufa de incubação Heraeus, a $27^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, para análises de produtos biológicos queratinizados
- Fios rectos metálicos
- Lamelas de vidro DESAG/NORMAX, 22x22 mm
- Lâminas de vidro MARIENFELD, 75x25x1 mm, Ref^ª: ISSO 8037/1
- Lancetas de metal
- Luvas de vinil SYNSATION[™] PF
- Máquina fotográfica Nikon Colpix 4600
- Microscópio óptico LEICA DMLS, LEICA MICROSSISTEMAS, para observação microscópica de estruturas fúngicas
- Microscópio óptico LEITZ LABORLUX K, MICROSSISTEMAS, para observação microscópica de estruturas fúngicas. Equipado com máquina fotográfica WILD MPS 12
- Micropipetas Pipetman, Gilson, 200 µl
- Micropipetas Pipetman, Gilson, 1000 µl
- Objectivas LEICA, C PLAN 10x/0.22, N PLAN 40x/0.65 e C PLAN 100x/1.25 OIL
- Objectivas LEITZ WETZLAR, EF 10/0.25, EF 40/0.65 e EF 100/1.25 OEL
- Oculares LEICA, HC PLAN 10x/20
- Oculares LEITZ, PERIPLAN 10x/18
- Papel de filtro
- Papel poroso
- Parafilm “M”[®] PECHINEY PLASTIC PACKAGING
- Pinças
- Pipetas de Pasteur em embalagem individual esterilizada
- Placas de Petri de plástico Bibby Sterilin Ltd. e de vidro, 90 mm de Ø
- Pontas para micropipetas Pipetman, Gilson
- Régua
- Suportes para tubos de ensaio

- Tesouras
- Tubos de ensaio de diversas capacidades
- Vortex K-550-GE, SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC, para homogeneização de soluções ou suspensões
- Zaragatoas estéreis de algodão do tipo hidrófobo EUROTUBO[®] DELTALAB Ref^ª: 08191

O **método laboratorial** utilizado para detecção, isolamento e identificação de fungos dermatófitos, de outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos e de fungos leveduriformes (Fig. 7, 8 e 9) em produtos biológicos queratinizados, segundo protocolo laboratorial previamente estabelecido (Anexo I), compreendeu:

- | | | |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Pesquisa directa | <ul style="list-style-type: none"> • Exame directo | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Isolamento | <ul style="list-style-type: none"> • Fungos filamentosos e leveduriformes | <ul style="list-style-type: none"> • Método clássico |
| <ul style="list-style-type: none"> • Identificação | <ul style="list-style-type: none"> • Fungos filamentosos • Fungos leveduriformes | <ul style="list-style-type: none"> • Método clássico • Meio cromogénico • Micrométodo |



Fig. 7 – Fungo dermatófito.

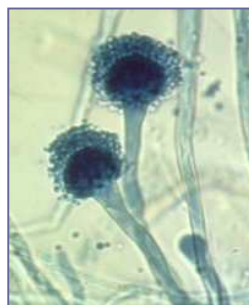


Fig. 8 – Fungo filamentosos não dermatófito.

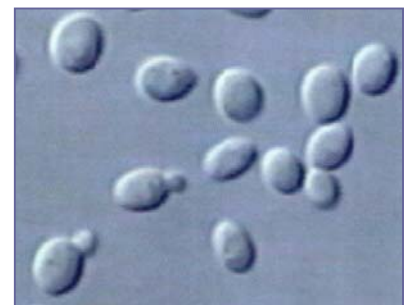


Fig. 9 – Fungo leveduriforme.

A valorização dos agentes etiológicos identificados efectuou-se de acordo com a sua importância clínica, descrita na literatura. Os géneros a valorizar, entre outros, especificam-se no Quadro II.

QUADRO II – Agentes etiológicos a valorizar, entre outros descritos na literatura, no estudo micológico de produtos biológicos queratinizados.

Fungos dermatófitos	Fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos	Fungos leveduriformes
<p><i>Epidermophyton spp.</i></p> <p><i>Trichophyton spp.</i></p> <p><i>Microsporum spp.</i></p>	<p><i>Aspergillus spp.</i></p> <p><i>Chrysosporium spp.</i></p> <p><i>Fusarium spp.</i></p> <p><i>Scedosporium spp.</i></p> <p><i>Scopulariopsis spp.</i></p> <p><i>Scytalidium spp.</i></p> <p><i>Acremonium spp.</i></p> <p><i>Alternaria spp.</i></p>	<p><i>Candida spp.</i></p> <p><i>Trichosporon spp.</i></p> <p><i>Cryptococcus spp.</i></p>

O método laboratorial para determinação da **susceptibilidade *in vitro*** de fungos leveduriformes e de estirpes de dermatófitos a diversos agentes antifúngicos efectuou-se pelo método de difusão em agar, segundo protocolo laboratorial previamente estabelecido (Anexo I).

2.5.1. PESQUISA DIRECTA

2.5.1.1. EXAME DIRECTO

O exame directo do material biológico permite a observação do fungo *in vivo* e de algumas das suas características morfológicas.

As preparações efectuaram-se a partir de material biológico recentemente colhido, em KOH (hidróxido de potássio) a 30% (Anexo II).

Colocaram-se um ou mais fragmentos do produto a analisar em lâmina com uma gota de KOH a 30 %, cobriram-se com lamela de vidro e deixou-se actuar o KOH durante 20 minutos ou mais ⁽¹⁾ (Fig. 10). Quando o material biológico estava suficientemente dissociado, comprimiu-se a lamela ligeiramente sobre a lâmina, absorvendo-se o excesso de potassa com auxílio de papel de filtro.

O princípio desta técnica assenta na capacidade que o KOH tem para promover a desagregação das células e a dissolução da queratina, um dos principais componentes da pele e das unhas, enquanto que os elementos fúngicos se mantêm inalterados. A parede celular dos fungos resiste à acção do KOH, o que permite a sua fácil visualização quando observados microscopicamente, apresentando-se como estruturas que refractam fortemente a luz (Shu-Hui Tan *et al.*, 1994; Collier *et al.*, 1999).

A observação microscópica (objectivas de 10x e 40x) de exames directos permitiu a visualização de células de escamas de pele ou de fragmentos de unhas e da flora bacteriana associada.

Os exames directos consideram-se negativos quando se verifica a ausência de estruturas fúngicas. Os exames directos consideram-se positivos quando, para além das estruturas celulares mencionadas, se observa a presença de esporos e/ou hifas (filamentos) (Fig. 11) ou de leveduras e/ou pseudomicélio.

⁽¹⁾ Observação: O tempo que se deve deixar actuar o KOH varia muita com a natureza e dimensões do material colhido. Em escamas de pele e fragmentos de unhas, o tempo óptimo de actuação do KOH é variável com a espessura do material e pode ir de 15 minutos a várias horas.

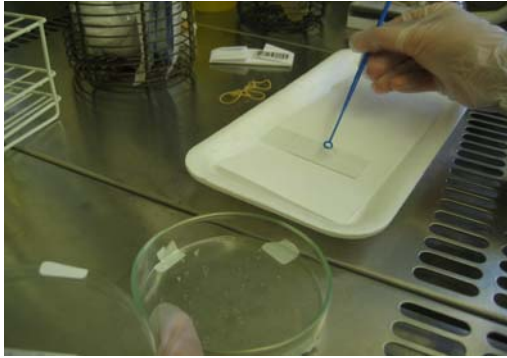


Fig. 10 – Preparação de exame directo de unha em KOH 30%.

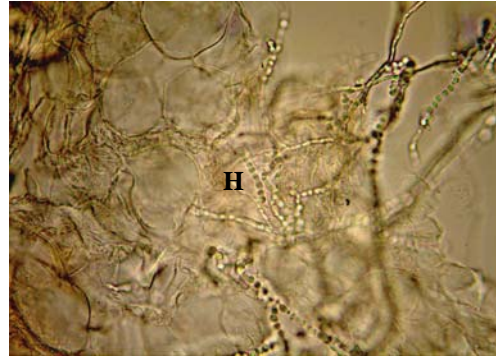


Fig. 11 – Exame directo de unha em KOH 30%. Observação de hifas (H = hifas). 400 x.

Os aspectos das estruturas fúngicas que se visualizam microscopicamente são muito variáveis e não são característicos das espécies. Os fungos dermatófitos desenvolvem-se nos tecidos queratinizados, originando hifas ramificadas e septadas, muitas vezes entrecruzadas. Outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos podem, também, desenvolver-se na pele e nas unhas, originando filamentos ramificados e septados semelhantes aos dos dermatófitos (Esteves *et al.*, 1990).

Nas formas superficiais de candidíase podem observar-se:

- Leveduras, geralmente, redondas ou ovais; sem cápsula; isoladas ou em gemulação; com 2 a 4 μ de diâmetro; acompanhadas ou não de verdadeiro micélio, com filamentos septados de diâmetro constante e entrecruzados e ainda, por vezes, de pseudomicélio: género *Candida* (Esteves *et al.*, 1990);
- Leveduras acompanhadas de verdadeiro micélio; com artrósporos abundantes, cilíndricos a ovais: género *Trichosporon* (Esteves *et al.*, 1990; Hoog e Guarro, 1995);
- Leveduras de forma arredondada ou ovalar, anascosporadas, geralmente capsuladas, quase sempre não pigmentadas e que não formam pseudomicélio: género *Cryptococcus* (Esteves *et al.*, 1990).

2.5.2. MÉTODO CLÁSSICO DE ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E DE FUNGOS LEVEDURIFORMES

2.5.2.1. CULTURAS

A cultura comprova a viabilidade do fungo e das suas características *in vitro* e permite a identificação do género/espécie do agente causador da lesão constituindo, desta forma, uma técnica complementar do exame directo. A identificação da espécie tem interesse clínico e epidemiológico.

Condições de manuseamento e segurança: A sementeira das amostras efectuou-se em câmara de segurança biológica, com fluxo ligado, para que se mantivessem as condições de assepsia e se evitassem as contaminações bacterianas e/ou as provocadas por fungos saprófitas.

As culturas dos produtos biológicos queratinizados efectuaram-se em tubo contendo meio de cultura sólido, em posição inclinada. Cada amostra foi semeada em meio de *Agar Micobiótico* (Difco) e em meio de *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol (meios desidratados comercializados, cuja composição se descreve em Anexo III) (Fig. 12).

Com auxílio de ansa estéril, efectuaram-se duas estrias longitudinais ao longo da superfície dos meios de cultura, rasgando os meios, de forma a promover a criação de condições de relativa anaerobiose. Semearam-se as amostras, inoculando directamente um ou mais fragmentos do produto biológico a analisar nesses dois pontos dos meios de cultura.

A zaragatoa que se passa sobre a lesão, aquando da colheita de pele ou de unha(s), foi colocada em tubo contendo meio de cultura líquido: *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III) (Fig. 13).



Fig. 12 – Sementeira de pele ou de unha em meios de cultura sólidos: *Agar Micobiótico* (Difco) e *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol.



Fig. 13 – Colocação de zaragatoa de lesão de pele ou de unha em meio de cultura líquido: *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol.

Os meios de cultura foram incubados em estufa a 27° C, durante 3 a 4 semanas, procedendo-se à observação periódica das culturas para verificar a evolução de crescimento das colónias.

O período de incubação necessário para o desenvolvimento das colónias é, normalmente, de:

- 15 a 20 dias para fungos dermatófitos;
- 5 a 7 dias para outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos;
- 24 a 72 horas para fungos leveduriformes.

As leituras efectuaram-se ao fim da primeira, da segunda e da terceira semana a partir da data da sementeira. A interpretação de resultados foi efectuada de acordo com os seguintes critérios:

- Resultado negativo → ausência dos fungos filamentosos e dos fungos leveduriformes anteriormente referidos (Quadro II).
- Resultado positivo → presença dos fungos filamentosos e/ou dos fungos leveduriformes anteriormente referidos (Quadro II).

As colónias dos fungos dermatófitos são algodoadas, penujentas ou aveludadas, conforme a maior ou menor quantidade de micélio aéreo, pulverulentas quando os esporos são abundantes

e glabras, lisas ou cerebriformes, mais ou menos elevadas, quando não possuem micélio aéreo (Fig. 14). Nalgumas espécies observa-se pigmentação roxa, castanha, vermelha ou amarelada, às vezes mais evidente no reverso da colónia (Esteves *et al.*, 1990).



Fig. 14 – Colónias de *Trichophyton rubrum* em *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol. Fungo filamentoso em *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol. Primoculturas em *Agar Micobiótico* (Difco), *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol e *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol.

As colónias dos outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos apresentam aspectos muito variáveis, de acordo com o género/espécie a que pertencem e são, geralmente, pigmentadas (Fig. 15).



Fig. 15 – Colónias de *Aspergillus flavus* em *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol. Fungo filamentoso em *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol. Primoculturas em *Agar Micobiótico* (Difco), *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol e *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol.

As colónias dos fungos leveduriformes são:

- Colónias brancas, cremosas; formadas por células redondas ou ovais, desprovidas de cápsula, isoladas ou em gemulação; com 2 a 4 μ de diâmetro: género *Candida* (Esteves *et al.*, 1990) (Fig. 16);
- Colónias, em regra, brancas, inicialmente cremosas, depois mais secas, pregueadas, formadas ou não por células gemulantes e pseudomicélio; artrósporos rectangulares abundantes: género *Trichosporon* (Esteves *et al.*, 1990; Hoog e Guarro, 1995);
- Colónias inicialmente brancas, lisas, brilhantes, de bordo inteiro e mucóides. Com o tempo, adquirem cor amarelada ou acastanhada. Microscopicamente, observam-se elementos leveduriformes, tendo a maioria 4 a 7 μ de diâmetro, isoladamente ou em gemulação. Nas primoculturas, a cápsula pode ou não ser evidente: género *Cryptococcus* (Esteves *et al.*, 1990).



Fig. 16 – Colónias de *Candida parapsilosis* em *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol. Depósito de leveduras em *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol. Primoculturas em *Agar Micobiótico* (Difco), *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol e *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol.

Para cada cultura positiva nos meios de *Agar Micobiótico* (Difco) e de *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III) em que se observou a presença de colónias leveduriformes, executou-se exame microscópico em água destilada (1 gota) (Anexo II), a partir de uma ou de várias colónias, com o objectivo de:

- Confirmar a presença de leveduras;
- Excluir a presença de bactérias, isoladas ou associadas a leveduras.

O mesmo procedimento foi seguido para cada cultura positiva no meio de *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III), em que se observou o aparecimento de depósito no fundo do tubo contendo meio líquido (Fig. 16).

O tempo de incubação mínimo para considerar as amostras negativas foi de três semanas.

Controlo de qualidade: Sementeira de estirpes de referência ATCC *C. albicans* e ATCC *C. parapsilosis*.

2.5.3. MÉTODO CLÁSSICO DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

A identificação de fungos filamentosos efectua-se, fundamentalmente, pelas características macroscópicas da colónia: cor da frente e reverso da colónia; topografia; textura; bem como pelas suas características microscópicas: presença de macro e/ou microconídeos; tamanho dos esporos; presença/ausência de septos nas hifas e dimensão das mesmas; morfologia do conidióforo.

No caso de se tratar de um fungo dermatófito, a localização da lesão, a origem do paciente, o país onde tem residido nos últimos meses, a sua profissão e o contacto com animais devem ser dados clínicos considerados, com vista a uma identificação mais segura e à comprovação da fonte de contágio.

Condições de manuseamento e segurança: As culturas foram manuseadas em câmara de segurança biológica, com fluxo ligado, para que se mantivessem as condições de assepsia. A câmara de fluxo laminar deve ser utilizada na repicagem de fungos filamentosos, na realização de corte de colónias e na preparação de exames microscópicos, nomeadamente de espécies fúngicas produtoras de muitos esporos (*Aspergillus ssp.*; *Penicillium spp.*; *Cladosporium spp.*; *Mucor spp.*). Deve recorrer-se ao uso de máscara de forma a evitar a inalação de esporos, sendo também recomendado o uso de luvas no manuseamento das diferentes espécies fúngicas e de tudo aquilo que com elas se relaciona (Santos *et al.*, 1998). Após o corte das colónias, as placas de Petri devem ser isoladas com Parafilm.

2.5.3.1. MÉTODO DE REPICAGEM

Após o período de incubação, procedeu-se à identificação das colónias de fungos filamentosos. Para a identificação de fungos dermatófitos usou-se o meio de *Agar Micobiótico* (Difco) (Anexo III) e no caso de haver dúvidas repicou-se para meio de *Malte Agar* (Difco) com cloranfenicol, em placa (Anexo III). Os restantes fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos foram repicados e identificados a partir de meio de *Malte Agar* (Difco) com cloranfenicol, em placa (Anexo III).

A técnica de repicagem consiste em seleccionar uma área de esporulação de onde se pretende retirar o inoculo e transferir, em condições de assepsia, um pequeno fragmento de micélio para o centro de uma placa ou de um tubo com meio de cultura fresco (Santos *et al.*, 1998).

Quando se obtiveram culturas positivas para fungos filamentosos nos meios de *Agar Micobiótico* (Difco) ou de *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol, efectuámos repicagem, com auxílio de fio recto, com extremidade dobrada em ângulo recto, previamente esterilizado no bico eléctrico e arrefecido na extremidade do meio, para meio de cultura em placa: *Malte Agar* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III), incubada durante 1 semana, a 27° C (Fig. 17 e 18).



Fig. 17 – *Trichophyton rubrum*.
Reisolamento em *Malte Agar* (Difco) com cloranfenicol.



Fig. 18 – *Scopulariopsis brevicaulis*.
Reisolamento em *Malte Agar* (Difco) com cloranfenicol.

Quando se obtiveram culturas positivas para fungos filamentosos no meio de *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III), efectuámos subcultura, com auxílio de

zaragatoa colocada no meio de cultura líquido, para meio de cultura em placa: *Malte Agar* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III), incubada durante 1 semana, a 27° C (Fig. 19).



Fig. 19 – Colônia de fungo filamentoso (*Alternaria spp.*) em *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol e respectiva subcultura em *Malte Agar* (Difco) com cloranfenicol.

2.5.3.2. EXAME MICROSCÓPICO

O exame microscópico permite a observação das características microscópicas das colônias: presença de macro e/ou microconídeos; tamanho dos esporos; presença/ausência de septos nas hifas e dimensão das mesmas; morfologia do conidióforo.

Efectuámos o corte de cada colónia, com auxílio de fio recto previamente esterilizado no bico eléctrico e arrefecido na extremidade do meio de cultura em tubo ou em placa, e transferimos um pequeno fragmento do micélio para lâmina de vidro com uma gota de corante azul de lactofenol (Anexo II). Com o auxílio de lanceta de metal dissociámos o micélio e cobrimo-lo com lamela de vidro (Fig. 20 e 21).

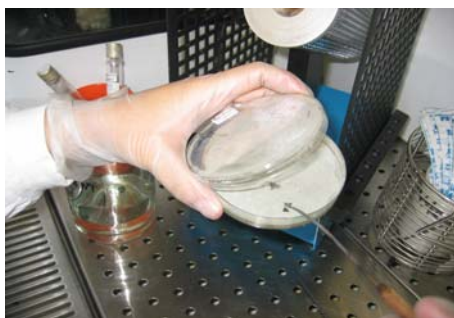


Fig. 20 – Corte de colónia de fungo filamentoso.

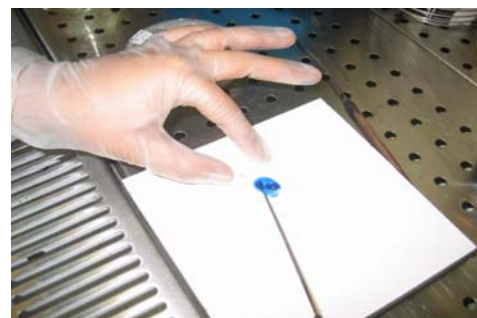


Fig. 21 – Preparação de exame microscópico de fungo filamentoso em azul de lactofenol.

O princípio desta técnica assenta na capacidade que o azul de lactofenol tem para corar as estruturas fúngicas, permitindo a sua fácil visualização quando observadas microscopicamente. A parede das células fúngicas é muito hidrofílica, pelo que permite a entrada do corante para o seu interior. Como resultado, o citoplasma fica corado de azul, assim como todas as outras estruturas fúngicas.

A observação microscópica (objectiva de 40x) ⁽¹⁾ das lâminas permitiu a visualização da presença de macro e/ou microconídeos, do tamanho dos esporos, da presença/ausência de septos nas hifas e da dimensão das mesmas, da morfologia do conidióforo e da eventual existência de outras estruturas particulares (Fig. 22 e 23).

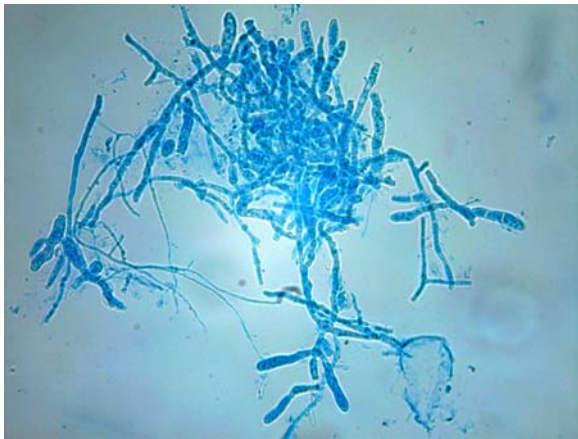


Fig. 22 – *Epidermophyton floccosum*. Exame microscópico de fragmento de colónia. 400 x.



Fig. 23 – *Scedosporium spp.*. Exame microscópico de fragmento de colónia. 400 x.

Procedeu-se à identificação de fungos filamentosos tendo em atenção as características macroscópicas da colónia (cor da frente e reverso da colónia; topografia; textura), bem como as suas características microscópicas (presença de macro e/ou microconídeos; tamanho dos esporos; presença/ausência de septos nas hifas e dimensão das mesmas; morfologia do conidióforo). Consultámos um esquema prático de orientação para a identificação dos géneros de fungos filamentosos de interesse clínico (Fig. 24) e recorreremos a atlas de identificação de fungos existentes na Unidade de Micologia do INSA, I.P..

⁽¹⁾ Observação: A objectiva de 100x apenas se utilizou para confirmação de determinadas características microscópicas.

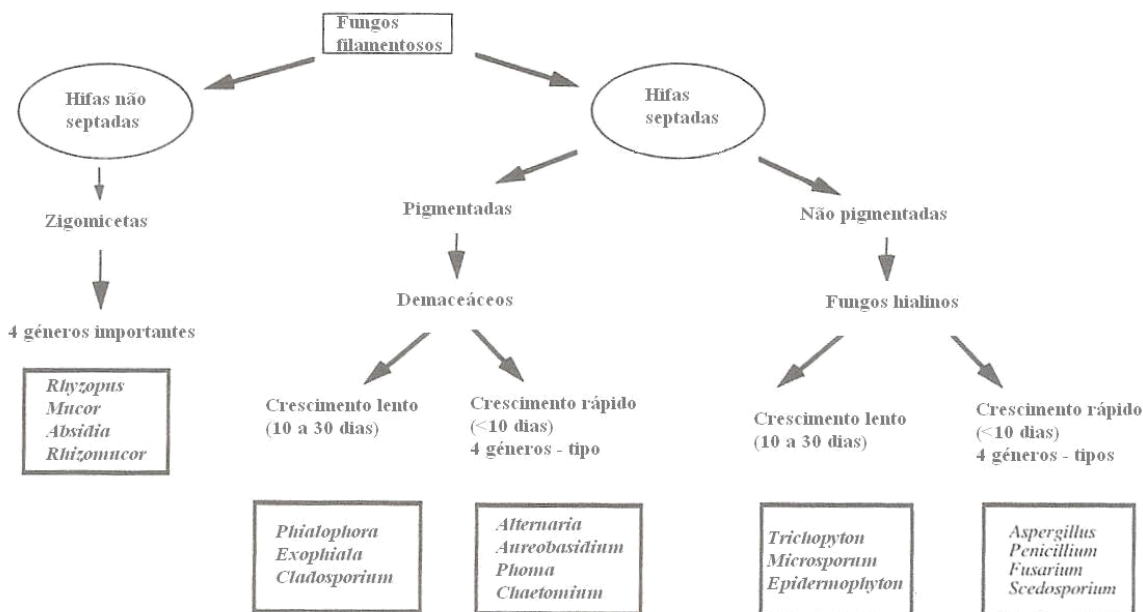


Fig. 24 – Esquema prático de orientação para a identificação dos géneros de fungos filamentosos de interesse clínico (Adaptado de Grillot, 1996).

Controlo de qualidade: Participação em programas de avaliação externa da qualidade: NEQAS; LabQuality (PNAEQ).

2.5.3.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Quando a distinção entre determinadas espécies de fungos dermatófitos se revelou particularmente difícil devido à escassez de elementos característicos das espécies recorremos, ainda que pontualmente, ao estudo de determinadas características bioquímicas.

2.5.3.3.1. ACTIVIDADE UREÁSICA

A actividade ureásica tem sido utilizada para diferenciação entre *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. O primeiro desdobra a ureia em sete dias (urease positiva), o segundo não (urease negativa) (Philpot, 1967 citado por Esteves *et al.*, 1990).

Quando se obtiveram culturas positivas para fungos dermatófitos em que a distinção entre duas espécies, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, foi particularmente difícil, efectuámos um corte de cada colónia, com auxílio de fio recto previamente esterilizado no bico eléctrico e arrefecido na extremidade do meio de cultura em tubo ou em placa, e transferimos um

pequeno fragmento do micélio para tubo contendo meio de cultura líquido: *Ureia líquida* (Anexo III), incubado durante 1 semana, a 27° C.

No fim desse período de tempo, registou-se a alteração da cor do meio de cultura e procedeu-se à distinção entre as duas espécies de fungos dermatófitos:

- Urease - → laranja → *T. rubrum*
- Urease + → rosa → *T. mentagrophytes*

2.5.4. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS LEVEDURIFORMES

A identificação de fungos leveduriformes assenta em conjunto de características morfológicas e de provas fisiológicas que se complementam entre si, face ao valor limitado de cada prova quando valorizada isoladamente. As provas fisiológicas foram realizadas para todas as espécies de leveduras *non-albicans*, cujas características não permitem identificação directa.

2.5.4.1. OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS

É fundamental a purificação da levedura em estudo antes de se proceder à sua identificação. O termo purificação refere-se à obtenção de uma cultura livre de outros microrganismos, para poder ser submetida ao processo de identificação (Santos *et al.*, 1998).

Uma das técnicas consiste em efectuar um riscado na superfície do meio sólido, através de três ou quatro quadrantes, com o auxílio de ansa ou zaragatoa carregada com o material celular.

Quando se obtiveram culturas positivas para fungos leveduriformes nos meios de *Agar Micobiótico* (Difco), *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol ou *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III), efectuámos subcultura, com auxílio de ansa estéril, para meio de cultura em placa: *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III), incubado durante 24 ou 48 h, a 27° C.

2.5.4.2. MEIO CROMOGÉNICO DE IDENTIFICAÇÃO DE *CANDIDA ALBICANS*

É conhecida a possibilidade de existir flora leveduriforme mista no mesmo produto biológico (Bernhardt *et al.*, 1996; Galán-Sánchez *et al.*, 1996).

Com a finalidade de se identificarem separadamente as diferentes espécies de fungos leveduriformes eventualmente presentes nas amostras de pele e de unhas, utilizámos o meio de cultura em placa: *Candida ID*® (bioMérieux) (Anexo III). Trata-se de um meio cromogénico selectivo que permite a identificação directa de *Candida albicans*, em 24 a 48 h. O princípio da identificação assenta na demonstração da actividade de um enzima específico desta espécie de levedura – N-acetil β -D-galactosaminidase – que promove a hidrólise de um substrato cromogénico constituinte do meio. Como resultado, as colónias de *Candida albicans* ficam coradas de azul.

A utilização deste meio de cultura permite, também, a obtenção de culturas puras, uma vez que inibe o crescimento bacteriano, tendo sido usado para purificação de fungos leveduriformes, em alternativa ao meio de cultura em placa: *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III).

Quando se obtiveram culturas positivas para fungos leveduriformes nos meios de *Agar Micobiótico* (Difco), *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol ou *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III), efectuámos subcultura, com auxílio de ansa estéril, para o meio de *Candida ID*® (bioMérieux) (Anexo III), incubada durante 24 ou 48 h, a 27° C (Fig. 25).



Fig. 25 – Depósito de leveduras em *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol e respectiva subcultura em *Candida ID*® (bioMérieux).

A identificação de *Candida albicans* – colónias azuis – efectuou-se directamente. A identificação de leveduras de outras espécies e géneros – colónias brancas – realizou-se por micrométodo, seguidamente descrito (2.5.4.3.) (Fig. 26 e 27).



Fig. 26 – Flora leveduriforme mista: *Candida albicans* e *Candida spp.*. Subcultura em *Candida ID*® (bioMérieux).



Fig. 27 – *Candida parapsilosis*. Subcultura em *Candida ID*® (bioMérieux).

2.5.4.3. MICROMÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS LEVEDURIFORMES

A identificação de estirpes leveduriformes efectuou-se recorrendo a um micrométodo de identificação de leveduras, com 32 testes de assimilação miniaturizados e uma base de dados: ID 32 C® (bioMérieux).

A galeria de identificação ID 32 C® (bioMérieux) é constituída por 32 cúpulas que contêm cada uma delas um substrato carbonado sob forma desidratada (Fig. 28). O princípio do *kit* consiste na assimilação dos vários substratos carbonados, sendo o desenvolvimento das leveduras detectado pela opacidade nas cúpulas (reação positiva). A levedura a analisar é colocada em suspensão num meio semi-sólido: API® C Medium (bioMérieux) (Anexo III). Após 24 a 48 h de incubação, o crescimento em cada cúpula lê-se com os aparelhos ATB™ Expression™ ou *mini API*®, ou visualmente. A identificação é obtida com um sistema de identificação.



Fig. 28 - Galeria de identificação de leveduras ID 32 C[®] (bioMérieux).

O procedimento experimental foi realizado de acordo com a bula do *kit* ID 32 C[®] (bioMérieux) (Fig. 29). A leitura das galerias de identificação ID 32 C[®] (bioMérieux) efectuou-se em aparelho ATB[™] Expression[™] (bioMérieux). Trata-se de um “software” de identificação equipado com leitor automático que pesquisa em cada cúpula da galeria de identificação a presença de crescimento leveduriforme, permitindo chegar à identificação de espécie. Nos casos em que não foi possível efectuar leitura automática realizou-se leitura visual e procedeu-se à interpretação de resultados de acordo com as instruções do fabricante.

Controlo de qualidade: Identificação de estirpes de referência ATCC e de estirpes provenientes dos programas de avaliação externa da qualidade: NEQAS; LabQuality (PNAEQ).

METHODOLOGIE / PROCEDURE / METHODIK / TECNICA / PROCEDIMENTO /
 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / METOD / METODE / METODYKA

Tests morphologiques
 Morphology tests
 Morphologische Tests
 Tests morfológicos
 Testes morfológicos
 Εξετάσεις μορφολογίας
 Morfoloģiska tester
 Morfoloģisk test
 Öçena morfoloģii

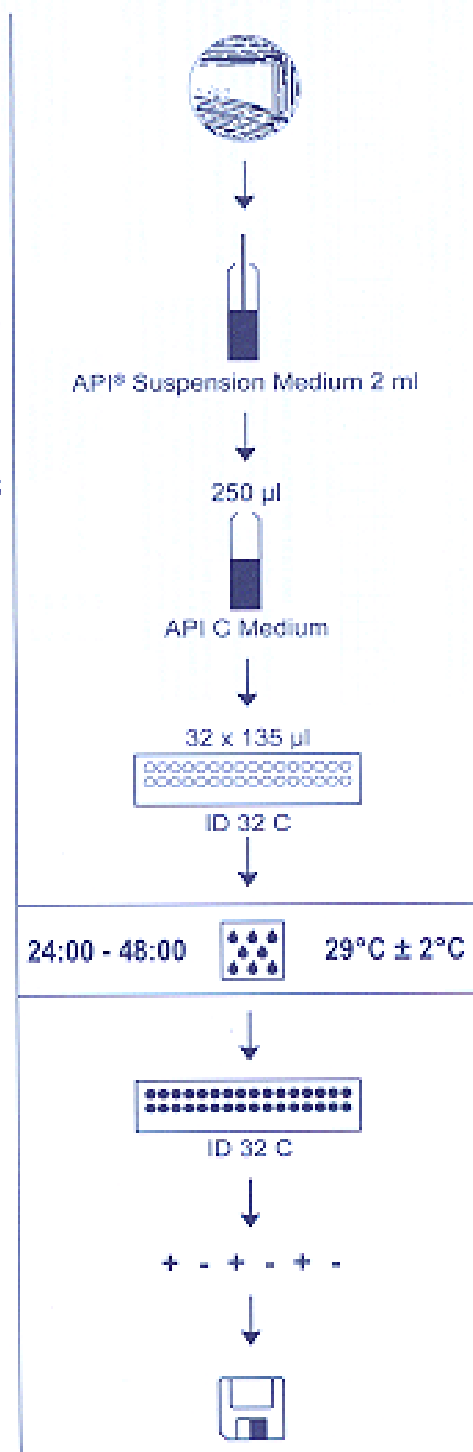


Fig. 29 – Procedimento experimental do micrométodo de identificação de leveduras: ID 32 C[®] (bioMérieux) (Extraído da bula do kit ID 32 C[®] (bioMérieux)).

2.5.5. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* AOS ANTIFÚNGICOS

2.5.5.1. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE FUNGOS LEVEDURIFORMES AOS ANTIFÚNGICOS

A susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos foi determinada para os fungos leveduriformes isolados ⁽¹⁾ na população diabética pelo método de difusão em agar, em meio de *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) (Anexo III), segundo protocolo laboratorial previamente estabelecido (Anexo I).

Utilizámos o método clássico de realização de antifungigramas que consiste na aplicação de discos impregnados de agentes antifúngicos com diferentes concentrações, consoante a molécula testada. Nesta técnica, deve-se respeitar a densidade do inoculo e o tempo de incubação recomendado, para se poder efectuar a leitura do diâmetro dos halos de inibição de crescimento do fungo isolado, relativamente aos diferentes antifúngicos testados.

A partir de subcultura recente (24 a 48 h, a 27° C) em meio de cultura de *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol, em placa, (Anexo III), preparou-se suspensão homogénea de leveduras, com auxílio de ansa estéril, em API[®] Suspension Medium (bioMérieux) (Anexo III), com opacidade equivalente a 0,5 McFarland.

A suspensão foi distribuída com zaragatoa estéril efectuando um espalhamento na superfície do meio de cultura em placa (90 mm de Ø): *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) (Anexo III).

Deixou-se secar o meio, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Após secagem, com auxílio de pinça estéril, aplicaram-se, sob a superfície do meio, os discos referentes aos vários antifúngicos utilizados: Cetoconazol; Clotrimazol; Econazol; Fluconazol; Itraconazol; Miconazol (Anexo IV). De referir que a distância entre os discos deverá ser suficiente para que não se verifique sobreposição dos halos de inibição (≤ 6 discos por placa).

⁽¹⁾ Observação: A susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos foi determinada para todos os fungos leveduriformes isolados nos meios de cultura sólidos. A susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos não foi determinada para os fungos leveduriformes isolados no meio de cultura líquido *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III), uma vez que de acordo com os critérios de quantificação seguidos na rotina laboratorial da Unidade de Micologia do INSA, I.P., as colónias isoladas a partir do meio de cultura líquido referido correspondem sempre a raras colónias e nessa situação, em regra, não se efectua o antifungigrama.

As placas foram incubadas a 27° C. A leitura efectuou-se após um período de incubação de 24 a 72 h, através da medição do diâmetro dos halos ou zonas de inibição formadas (Protocolo laboratorial, Anexo I) (Fig. 30). A interpretação dos resultados efectuou-se de acordo com os critérios de avaliação do fabricante (Quadro III).



Fig. 30 – Susceptibilidade *in vitro* de estirpe de *Candida parapsilosis* a vários antifúngicos pelo método dos discos. Visualização dos halos ou zonas de inibição formadas.

QUADRO III – Susceptibilidade *in vitro* a diversos antifúngicos. Interpretação de resultados.

Antifúngicos	Concentração do agente antifúngico/disco	Diâmetro do halo de inibição (mm)	Interpretação de resultados
Cetoconazol	50 µg	≤ 11 12 – 19 ≥ 20	Sensível (S) Intermédia (I) Resistente (R)
Ciclopirox	50 µg	≤ 11 12 – 19 ≥ 20	S I R
Clotrimazol	50 µg	≤ 11 12 – 19 ≥ 20	S I R
Econazol	50 µg	≤ 11 12 – 19 ≥ 20	S I R
Fluconazol	25 µg	≤ 11 12 – 19 ≥ 20	S I R
Griseofulvina	25 µg	Sem halo ≥ 10	S R

Antifúngicos	Concentração do agente antifúngico/disco	Diâmetro do halo de inibição (mm)	Interpretação de resultados
Itraconazol	8 µg	Sem halo	S
		10 -14	I
		≥ 15	R
Miconazol	50 µg	≤ 11	S
		12 – 19	I
		≥ 20	R

(Adaptado, em parte, de Rosco (1998) e do guia/bula Disks for antifungal susceptibility of yeasts (BIORAD)).

Sabe-se que, para os derivados imidazólicos, algumas estirpes formam duas zonas de inibição distintas; uma zona mais larga e uma zona mais reduzida com pequenas colónias de leveduras (Drouhet e Dupont, 1978). Nesses casos, apenas se valorizaram os halos transparentes e/ou bem delimitados. Quando houve formação de halos de inibição simples, não transparentes, as estirpes foram classificadas como intermédias a esse(s) antifúngico(s).

2.5.5.2. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE ESTIRPES DE FUNGOS DERMATÓFITOS AOS ANTIFÚNGICOS

Não existe disponível, até à data, um método de referência estandardizado para a determinação da susceptibilidade *in vitro* de fungos dermatófitos a agentes antifúngicos (Ghannoum, 2001 citado por Karaca e Koç, 2004).

Neste estudo paralelo, pretendeu-se contribuir para a implementação na rotina laboratorial da Unidade de Micologia do INSA, I.P. do método de difusão em agar para determinação da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de dermatófitos a agentes antifúngicos.

A susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos foi avaliada para várias estirpes de dermatófitos isoladas na população diabética pelo método de difusão em agar em meio de *Mueller-Hinton Agar* (Difco) (Anexo III), adaptando, em parte, o método de referência para fungos filamentosos (NCCLS, 1998), de acordo com protocolo laboratorial previamente estabelecido (Anexo I).

Neste estudo, utilizámos o método clássico de realização de antifungigramas (método dos discos), descrito anteriormente (2.5.5.1.), e o E-test.

O E-test é uma técnica de determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), baseada na utilização de tiras rectangulares de um material inerte impregnado com um gradiente exponencial pré-definido do antifúngico a estudar. As tiras são colocadas sobre uma placa de meio de cultura sólido previamente semeada com uma suspensão do fungo isolado. Após incubação, a inibição do crescimento fúngico traduz-se pela presença de uma elipse, cujos pontos de intersecção com a escala da tira definem a CMI. Trata-se de uma técnica simples, rápida e reprodutível, mas dado o seu objectivo e o seu custo é, em regra, reservada a casos particulares: micoses sistémicas a leveduras ou estirpes de leveduras resistentes a antifúngicos.

No presente trabalho, a utilização da referida técnica em estirpes de dermatófitos teve como objectivo testar um novo antifúngico: Posaconazol E test[®] (AB BIODISK) (Anexo IV) que está, igualmente, a ser analisado para leveduras e outros fungos filamentosos oportunistas considerados agentes etiológicos de infecções do tracto respiratório, na Unidade de Micologia do INSA, I.P..

A partir de subcultura recente (7-15 dias, a 27° C) em meio de cultura de *Malte Agar* (Difco) com cloranfenicol, em tubo ou em placa, (Anexo III), preparou-se suspensão homogénea de estirpe de dermatófito, com opacidade equivalente a 1,0 McFarland. Com auxílio de zaragatoa estéril embebida em API[®] Suspension Medium (bioMérieux) (Anexo III), efectuou-se raspagem sobre a colónia fúngica, de forma a que a zaragatoa transportasse o máximo de material biológico possível para o frasco contendo o meio de suspensão, e agitou-se vigorosamente a suspensão no vortex.

A suspensão (constituída por conídios e hifas) foi distribuída com zaragatoa estéril efectuando um espalhamento na superfície do meio de cultura em placa (90 mm de Ø): *Mueller-Hinton Agar* (OXOID) (Anexo III). De referir que as placas de Petri continham meio de cultura com uma altura de 6,0 mm (para evitar a desidratação do meio durante o período de incubação). Deixou-se secar o meio, à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Após secagem, com auxílio de pinça estéril, aplicaram-se, sob a superfície do meio, os discos referentes aos vários antifúngicos utilizados: Cetoconazol; Ciclopirox; Clotrimazol; Fluconazol; Griseofulvina; Miconazol (Anexo IV). De referir que a distância entre os discos deverá ser suficiente para que não se verifique sobreposição dos halos de inibição formados

(≤ 3 discos por placa). Numa outra placa, com auxílio de pinça estéril, aplicou-se, sob a superfície central do meio, a tira de E-test referente ao antifúngico Posaconazol (Anexo IV).

As placas foram incubadas a 27° C. A leitura das placas contendo os discos impregnados com antifúngicos efectuou-se após um período de incubação de 3-7 dias (variável dependendo da estirpe em estudo), através da medição do diâmetro dos halos ou zonas de inibição formadas (Protocolo laboratorial, Anexo I) (Fig. 31).

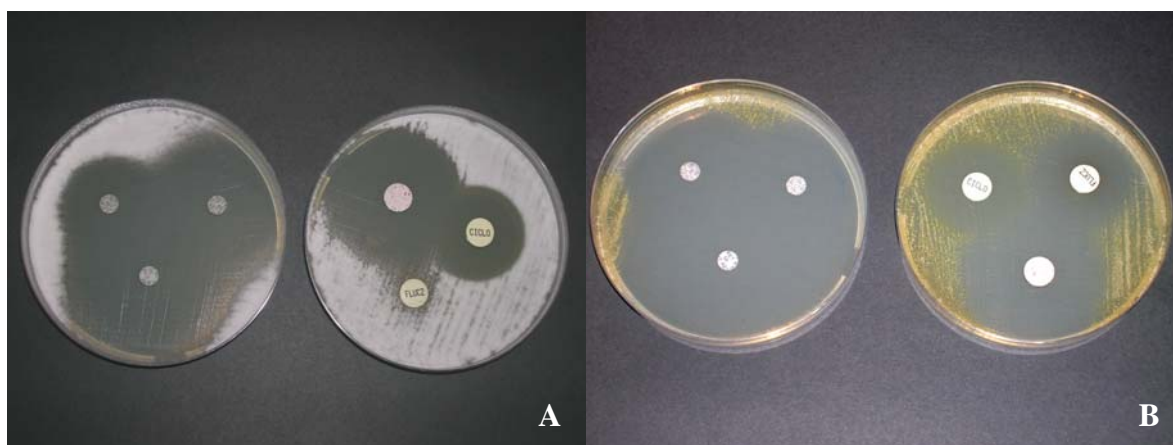


Fig. 31 – Susceptibilidade *in vitro* de estirpe de *Trichophyton mentagrophytes* (A) e de estirpe de *Trichophyton soudanense* (B) a vários antifúngicos pelo método dos discos. Visualização dos halos ou zonas de inibição formadas.

A interpretação dos resultados efectuou-se, adaptando, em parte, os critérios de avaliação que já se encontram estabelecidos para outros fungos filamentosos, de acordo com o fabricante (Quadro III). As microcolónias no interior dos halos ou zonas de inibição formadas não foram valorizadas.

A leitura da placa contendo a tira de E-test efectuou-se após um período de incubação de 3-7 dias (variável dependendo da estirpe em estudo), através da observação da elipse formada, cujos pontos de intersecção com a escala da tira definem a CMI do Posaconazol (Anexo IV) (Fig. 32). As microcolónias no interior da zona de inibição formada não foram valorizadas.

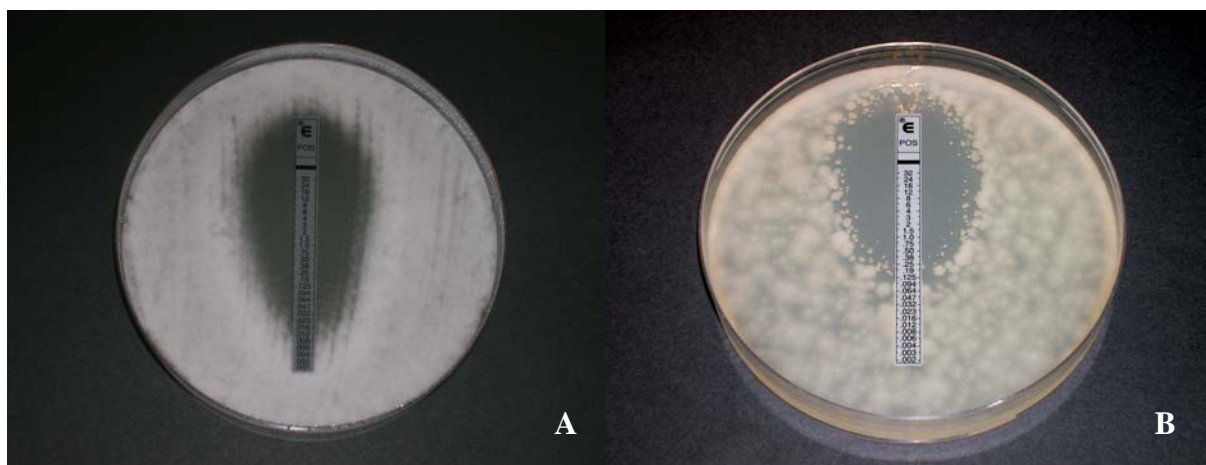


Fig. 32 – Susceptibilidade *in vitro* de estirpe de *Trichophyton mentagrophytes* (A) e de estirpe de *Epidermophyton floccosum* (B) ao Posaconazol pela técnica de E-test. Visualização das elipses formadas.

2.6. PROGRAMAS DE TRATAMENTO ESTATÍSTICO E DE ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS

No final da realização deste trabalho de projecto, pretendeu-se:

- i. Estimar a prevalência de dermatomicoses nos membros inferiores na população de doentes diabéticos;
- ii. Estimar a prevalência de dermatomicoses nos membros inferiores na população controlo;
- iii. Estudar a distribuição dos agentes etiológicos isolados nas duas populações estudadas;
- iv. Estudar a distribuição da prevalência de dermatomicoses nos membros inferiores na população diabética pelos possíveis factores predisponentes para a infecção.

Todos os resultados foram obtidos pelo pacote de programas estatísticos SPSS 15.0. As associações referidas na alínea iv. foram testadas pelo Teste Exacto de Fisher ou pelo Teste Qui-Quadrado de Pearson, de acordo com a metodologia definida pelo Estatista que consultámos. O Teste Exacto de Fisher foi utilizado quando ambas as variáveis eram dicotómicas (tabelas C 2x2). O Teste Qui-Quadrado de Pearson foi utilizado quando uma das variáveis tinha mais do que duas categorias. Rejeitou-se a hipótese nula de não associação sempre que o p-value foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

3. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

3.1. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DERMATOMICOSSES NA POPULAÇÃO DIABÉTICA ⁽¹⁾

A população diabética estudada foi constituída por 163 doentes diabéticos, 99 indivíduos do sexo masculino e 64 do sexo feminino, de idades compreendidas entre os 27 e os 89 anos, e cuja média de idades de situou nos $63,68 \pm 0,993$ anos (média \pm desvio padrão) (95% IC 61,72 – 65,64).

Efectuaram-se colheitas de pele e/ou de unha(s) dos membros inferiores, em cada doente diabético, totalizando 272 amostras: 113 amostras de pele, de diferentes localizações anatómicas dos membros inferiores, e 159 amostras de unhas dos pés (Quadro IV).

QUADRO IV – Amostras de produtos biológicos colhidas na população diabética.

População diabética			
Amostras de produtos biológicos	Nº	Localização	Nº
		anatómica	
• Pele	113	• Pele da perna	2
		• Pele do pé	111
• Unhas	159	• Unha do pé	159
Total	272		272

Do total de doentes diabéticos (n = 163), houve confirmação micológica de dermatomicoses (culturas positivas) em 71 (43,6%) doentes diabéticos, dos quais 45 (45,5%) eram indivíduos do sexo masculino e 26 (40,6%) do sexo feminino. Em 92 (56,4%) doentes diabéticos as culturas foram negativas. Desses, 54 (54,5%) eram indivíduos do sexo masculino e 38 (59,4%) do sexo feminino (Quadro V).

⁽¹⁾ A base de dados correspondente à população diabética apresenta-se em suporte informático (Anexo V).

QUADRO V – Avaliação da presença de dermatomicoses na população diabética.

População diabética						
	Doentes diabéticos		Sexo masculino		Sexo feminino	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Culturas negativas	92	56,4	54	54,5	38	59,4
Culturas positivas	71	43,6	45	45,5	26	40,6
Total	163	100,0	99	100,0	64	100,0

A frequência de dermatomicoses na população diabética de acordo com a localização da lesão foi de: 1 (0,6%) na pele da perna; 25 (15,3%) na pele do pé; 32 (19,6%) na unha do pé; 13 (8,0%) na pele do pé e na unha do pé (Quadro VI).

QUADRO VI – Frequência de dermatomicoses na população diabética de acordo com a localização da lesão.

População diabética		
Localização da lesão	Doentes diabéticos com culturas positivas	
	Nº	%
Pele da perna	1	0,6
Pele do pé	25	15,3
Unha do pé	32	19,6
Pele do pé + Unha do pé	13	8,0
Total	71	43,6

3.2. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DERMATOMICOSSES NA POPULAÇÃO CONTROLO ⁽¹⁾

A população controlo estudada foi constituída por 141 pacientes não diabéticos, 37 indivíduos do sexo masculino e 104 do sexo feminino.

Efectuaram-se colheitas de pele e/ou de unha(s) dos membros inferiores, em cada paciente não diabético, totalizando 262 amostras: 27 amostras de pele, de diferentes localizações anatómicas dos membros inferiores, e 160 amostras de unhas dos pés (Quadro VII).

QUADRO VII – Amostras de produtos biológicos colhidas na população controlo.

População controlo			
Amostras de produtos biológicos	Nº	Localização	Nº
		anatômica	
• Pele	27	• Pele da perna	6
		• Pele do(s) pé(s)	21
• Unhas	160	• Unha(s) do(s) pé(s)	160
Total	187		187

Do total de pacientes não diabéticos (n = 141), houve confirmação micológica de dermatomicoses (culturas positivas) em 72 (51,1%) pacientes não diabéticos, dos quais 22 (59,5%) eram indivíduos do sexo masculino e 50 (48,1%) do sexo feminino. Em 69 (48,9%) pacientes não diabéticos as culturas foram negativas. Desses pacientes, 15 (40,5%) eram indivíduos do sexo masculino e 54 (51,9%) do sexo feminino (Quadro VIII).

⁽¹⁾ A base de dados correspondente à população controlo apresenta-se em suporte informático (Anexo V).

QUADRO VIII – Avaliação da presença de dermatomicoses na população controle.

População controle						
	Pacientes não diabéticos		Sexo masculino		Sexo feminino	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Culturas negativas	69	48,9	15	40,5	54	51,9
Culturas positivas	72	51,1	22	59,5	50	48,1
Total	141	100,0	37	100,0	104	100,0

A frequência de dermatomicoses na população controle de acordo com a localização da lesão foi de: 1 (0,7%) na pele da perna; 8 (5,7%) na pele do(s) pé(s); 61 (43,3%) na(s) unha(s) do pé(s); 2 (1,4%) na pele do(s) pé(s) e na(s) unha(s) do(s) pé(s) (Quadro IX).

QUADRO IX – Frequência de dermatomicoses na população controle de acordo com a localização da lesão.

População controle		
Localização da lesão	Pacientes não diabéticos com culturas positivas	
	Nº	%
Pele da perna	1	0,7
Pele do(s) pé(s)	8	5,7
Unha(s) do(s) pé(s)	61	43,3
Pele do(s) pé(s) + Unha(s) do(s) pé(s)	2	1,4
Total	72	51,1

3.3. AGENTES ETIOLÓGICOS ISOLADOS NA POPULAÇÃO DIABÉTICA ⁽¹⁾

A distribuição dos diferentes grupos de fungos – fungos dermatófitos, outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos e fungos leveduriformes – e respectivas espécies fúngicas isoladas em doentes diabéticos que apresentaram culturas positivas foi de:

- **Fungos leveduriformes** 45 (45,5%): *Candida spp.* 14 (14,1%); *Candida parapsilosis* 10 (10,1%); *Candida albicans* 6 (6,1%); *Candida guilliermondii* 3 (3,0%); *Candida globosa* 3 (3,0%); *Rhodotorula spp.* 3 (3,0%); *Candida famata* 2 (2,0%); *Zygosaccharomyces spp.* 2 (2,0%); *Cryptococcus curvatus* 1 (1,0%); *Rhodotorula minuta* 1 (1,0%);
- **Fungos dermatófitos** 31 (31,3%): *Trichophyton rubrum* 11 (11,1%); *Trichophyton mentagrophytes* 7 (7,1%); *Trichophyton tonsurans* 4 (4,0%); *Trichophyton interdigitale* 2 (2,0%); *Trichophyton soudanense* 2 (2,0%); *Trichophyton schoenleinii* 1 (1,0%); *Trichophyton verrucosum* 1 (1,0%); *Trichophyton violaceum* 1 (1,0%); *Trichophyton spp.* 1 (1,0%); *Epidermophyton floccosum* 1 (1,0%);
- **Outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos** 23 (23,2%): *Aspergillus flavus* 4 (4,0%); *Scedosporium spp.* 3 (3,0%); *Aspergillus glaucus* 2 (2,0%); *Chaetomium spp.* 2 (2,0%); *Phoma spp.* 2 (2,0%); *Acremonium spp.* 1 (1,0%); *Alternaria spp.* 1 (1,0%); *Aspergillus candidus* 1 (1,0%); *Aspergillus versicolor* 1 (1,0%); *Aspergillus spp.* 1 (1,0%); *Crysosporium spp.* 1 (1,0%); *Scopulariopsis brevicaulis* 1 (1,0%); *Scopulariopsis spp.* 1 (1,0%); *Scytalidium dimidiatum* 1 (1,0%); *Scytalidium spp.* 1 (1,0%) (Quadro X e Fig. 33).

⁽¹⁾ A base de dados correspondente à população diabética apresenta-se em suporte informático (Anexo V).

QUADRO X – Grupos de fungos e respectivas espécies fúngicas isoladas em doentes diabéticos com culturas positivas.

População diabética		
Fungos isolados	Nº	%
Leveduras	45	45,5
<i>Candida spp.</i>	14	14,1
<i>Candida parapsilosis</i>	10	10,1
<i>Candida albicans</i>	6	6,1
<i>Candida guilliermondii</i>	3	3,0
<i>Candida globosa</i>	3	3,0
<i>Rhodotorula spp.</i>	3	3,0
<i>Candida famata</i>	2	2,0
<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	2	2,0
<i>Cryptococcus curvatus</i>	1	1,0
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	1,0
Dermatófitos	31	31,3
<i>Trichophyton rubrum</i>	11	11,1
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	7	7,1
<i>Trichophyton tonsurans</i>	4	4,0
<i>Trichophyton interdigitale</i>	2	2,0
<i>Trichophyton soudanense</i>	2	2,0
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	1	1,0
<i>Trichophyton verrucosum</i>	1	1,0
<i>Trichophyton violaceum</i>	1	1,0
<i>Trichophyton spp.</i>	1	1,0
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	1,0
Outros fungos filamentosos	23	23,2
<i>Aspergillus flavus</i>	4	4,0
<i>Scedosporium spp.</i>	3	3,0
<i>Aspergillus glaucus</i>	2	2,0
<i>Chaetomium spp.</i>	2	2,0
<i>Phoma spp.</i>	2	2,0

População diabética		
Fungos isolados	Nº	%
<i>Acremonium spp.</i>	1	1,0
<i>Alternaria spp.</i>	1	1,0
<i>Aspergillus candidus</i>	1	1,0
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	1,0
<i>Aspergillus spp.</i>	1	1,0
<i>Crysosporium spp.</i>	1	1,0
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1	1,0
<i>Scopulariopsis spp.</i>	1	1,0
<i>Scytalidium dimidiatum</i>	1	1,0
<i>Scytalidium spp.</i>	1	1,0
Total de estirpes isoladas	99⁽¹⁾	100,0

⁽¹⁾ Observação: O número total de estirpes isoladas (n = 99) na população diabética foi superior ao total de doentes diabéticos com culturas positivas (71), visto que, em alguns doentes, foram encontradas diversas associações de fungos a partir de amostras de pele e/ou de unha(s).

Distribuição dos diferentes grupos de fungos isolados em doentes diabéticos com culturas positivas

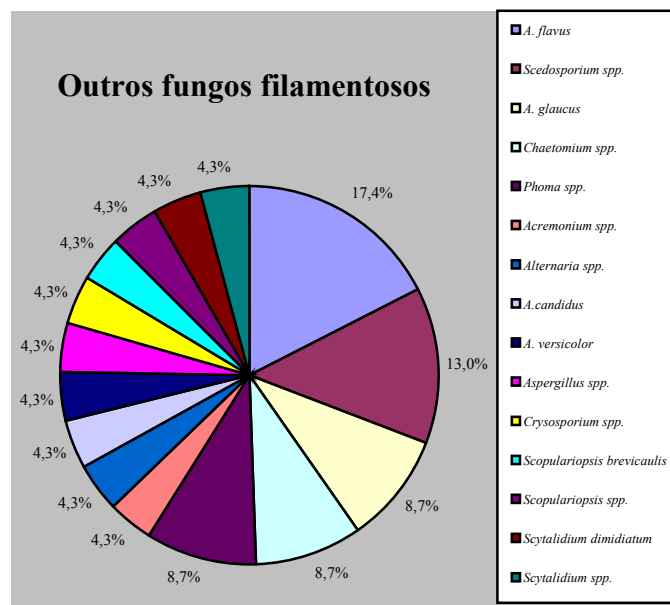
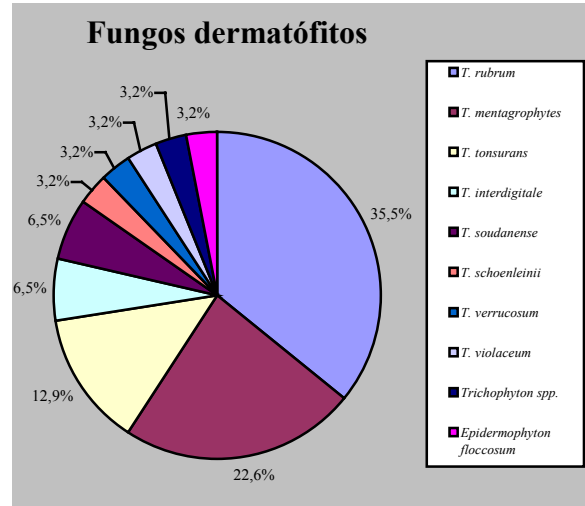
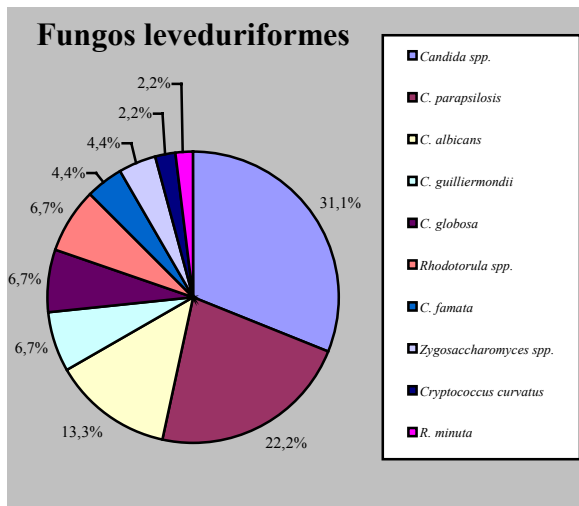
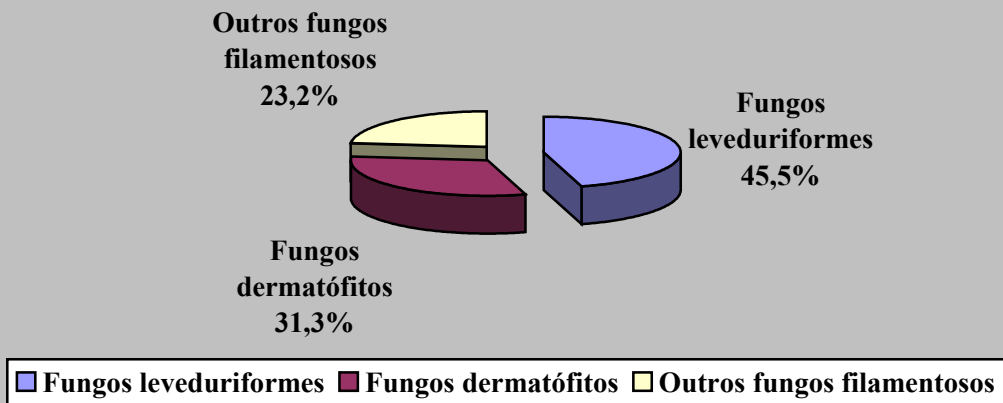


Fig. 33 – Distribuição dos diferentes grupos de fungos e respectivas espécies fúngicas isoladas em doentes diabéticos com culturas positivas.

No Quadro XI encontram-se registados os resultados da frequência de cada uma das espécies fúngicas isoladas na população diabética de acordo com a localização da lesão.

QUADRO XI – Frequência das espécies fúngicas isoladas na população diabética de acordo com a localização da lesão.

FUNGOS LEVEDURIFORMES

Candida spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	149	91,4	91,4	91,4
	Pele do pé	6	3,7	3,7	95,1
	Unha do pé	8	4,9	4,9	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Candida parapsilosis

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	153	93,9	93,9	93,9
	Pele do pé	3	1,8	1,8	95,7
	Unha do pé	7	4,3	4,3	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Candida albicans

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	157	96,3	96,3	96,3
	Pele do pé	1	,6	,6	96,9
	Unha do pé	5	3,1	3,1	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Candida guilliermondii

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	160	98,2	98,2	98,2
	Pele do pé	2	1,2	1,2	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Candida globosa

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	160	98,2	98,2	98,2
	Pele do pé	1	,6	,6	98,8
	Unha do pé	2	1,2	1,2	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Rhodotorula spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	160	98,2	98,2	98,2
	Pele do pé	1	,6	,6	98,8
	Unha do pé	1	,6	,6	99,4
	Pele da perna	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Candida famata

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	161	98,8	98,8	98,8
	Unha do pé	2	1,2	1,2	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Zygosaccharomyces spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	161	98,8	98,8	98,8
	Pele do pé	1	,6	,6	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Cryptococcus curvatus

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Rhodotorula minuta

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Pele do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

FUNGOS DERMATÓFITOS

Trichophyton rubrum

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	152	93,3	93,3	93,3
	Pele do pé	7	4,3	4,3	97,5
	Unha do pé	4	2,5	2,5	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Trichophyton mentagrophytes

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	156	95,7	95,7	95,7
	Pele do pé	3	1,8	1,8	97,5
	Unha do pé	4	2,5	2,5	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Trichophyton tonsurans

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	159	97,5	97,5	97,5
	Pele do pé	1	,6	,6	98,2
	Unha do pé	1	,6	,6	98,8
	Pele do pé + Unha do pé	2	1,2	1,2	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Trichophyton interdigitale

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	161	98,8	98,8	98,8
	Pele do pé	1	,6	,6	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Trichophyton soudanense

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	161	98,8	98,8	98,8
	Pele do pé	2	1,2	1,2	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Trichophyton schoenleinii

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Pele do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Trichophyton verrucosum

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Pele do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Trichophyton violaceum

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Trichophyton spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Epidermophyton floccosum

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

OUTROS FUNGOS FILAMENTOSOS

Aspergillus flavus

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	159	97,5	97,5	97,5
	Unha do pé	4	2,5	2,5	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Scedosporium spp.

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	160	98,2	98,2	98,2
	Pele pé	2	1,2	1,2	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Aspergillus glaucus

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	161	98,8	98,8	98,8
	Pele do pé	2	1,2	1,2	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Chaetomium spp.

	Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	161	98,8	98,8	98,8
	Pele do pé	1	,6	,6	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Phoma spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	161	98,8	98,8	98,8
	Pele do pé	1	,6	,6	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Acremonium spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Alternaria spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Aspergillus candidus

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Aspergillus versicolor

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Pele do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Aspergillus spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Crysosporium spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Scopulariopsis brevicaulis

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Scopulariopsis spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Unha do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Scytalidium dimidiatum

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Pele do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

Scytalidium spp.

Amostras		Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	162	99,4	99,4	99,4
	Pele do pé	1	,6	,6	100,0
	Total	163	100,0	100,0	

No total de doentes diabéticos estudados, encontraram-se fungos leveduriformes em 27,6% da população, fungos dermatófitos em 19,0%, outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos em 14,1% e 56,4% de negativos (Fig. 34).

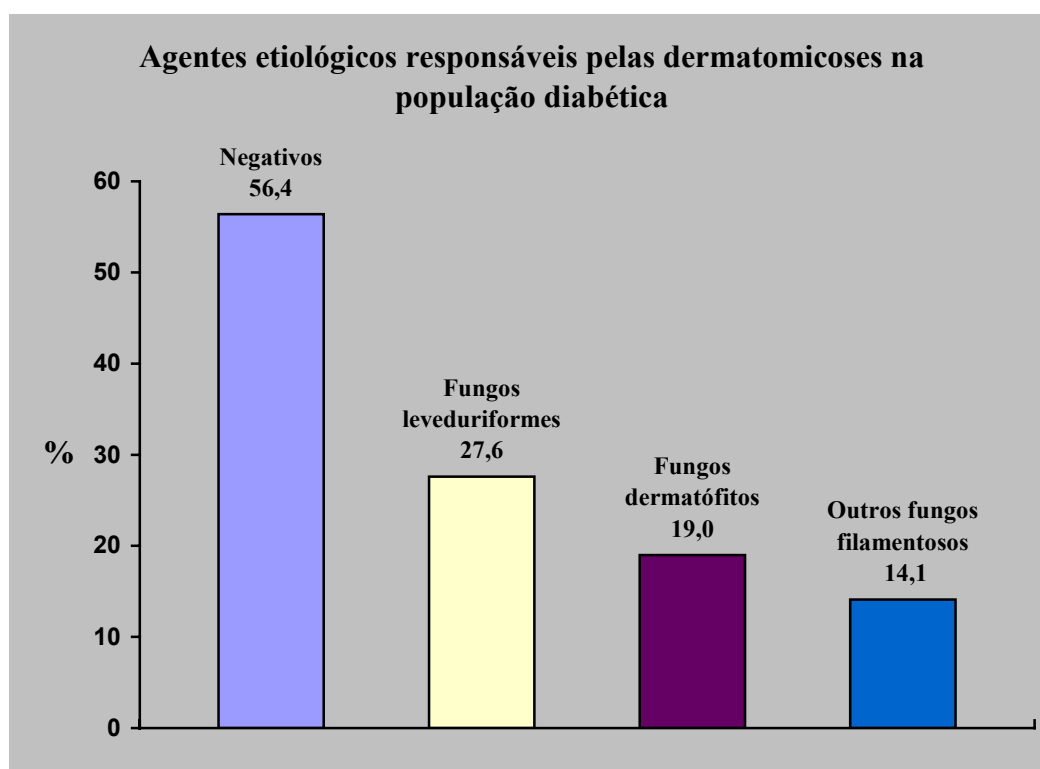


Fig. 34 – Agentes etiológicos responsáveis pelas dermatomicoses na população diabética.

A frequência de associações de fungos encontrada na população diabética foi de 12,3%. Em 13 (8,0%) doentes diabéticos foram encontradas infecções mistas a partir de amostras de pele e/ou de unhas dos pés (Quadro XII). Noutros 7 (4,3%) doentes diabéticos verificou-se que os agentes etiológicos isolados a partir de amostras de pele e de unha do pé em cada doente, e responsáveis por *tinea pedis* e onicomicose, foram diferentes (Quadro XIII).

QUADRO XII – Infecções mistas encontradas em doentes diabéticos (n = 13), a partir de amostras de pele e/ou de unhas dos pés.

Nº do doente diabético	Pele do pé	Unha do pé	Infecção mista encontrada
4	–	<i>T. tonsurans</i> e <i>C. guilliermondii</i>	FD+FL
12	–	<i>Chaetomium spp.</i> e <i>Candida spp.</i>	FFND+FL
21	–	<i>T. rubrum</i> e <i>Rhodotorula spp.</i>	FD+FL
75	–	<i>Candida spp.</i> e <i>Aspergillus spp.</i> e <i>Phoma spp.</i>	FL+FFND+FFND
80	<i>Rhodotorula spp.</i> e <i>Scedosporium spp.</i>	Negativo	FL+FFND
114	Negativo	<i>T. rubrum</i> e <i>Candida spp.</i>	FD+FL
119	<i>C. albicans</i> e <i>Candida spp.</i>	Negativo	FL+FL
124	<i>T. mentagrophytes</i> e <i>Candida spp.</i>	<i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i> e <i>Cryptococcus curvatus</i>	FD + FL e FL + FL+ FL
132	<i>C. parapsilosis</i> e <i>R. minuta</i> e <i>Phoma spp.</i>	<i>Scopulariopsis spp.</i> e <i>A. candidus</i>	FL+FL+FFND e FFND+FFND
145	<i>C. guilliermondii</i>	<i>Scedosporium spp.</i> e <i>Crysosporium spp.</i>	FL e FFND+FFND
153	Negativo	<i>A. flavus</i> e <i>C. parapsilosis</i>	FFND+FL
159	Negativo	<i>T. rubrum</i> e <i>C. parapsilosis</i>	FD+FL
160	Negativo	<i>E. floccosum</i> e <i>Alternaria spp.</i>	FD+FFND

FD = Fungo dermatófito;
 FFND = Fungo filamentoso não dermatófito;
 FL = Fungo leveduriforme;
 _ = Análise não efectuada.

QUADRO XIII – Diferentes agentes etiológicos isolados em doentes diabéticos (n = 7) responsáveis por *tinea pedis* e onicomicose.

Nº do doente diabético	Pele do pé	Unha do pé	Associação de fungos encontrada
65	<i>Candida spp.</i>	<i>C. globosa</i>	FL e FL
67	<i>T. verrucosum</i>	<i>Candida spp.</i>	FD e FL
87	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>C. albicans</i>	FD e FL
94	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. famata</i>	FL e FL
106	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>C. parapsilosis</i>	FD e FL
133	<i>T. tonsurans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	FD e FL
158	<i>T. rubrum</i>	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	FD e FL

FD = Fungo dermatófito;
FL = Fungo leveduriforme.

3.3. AGENTES ETIOLÓGICOS ISOLADOS NA POPULAÇÃO CONTROLO ⁽¹⁾

A distribuição dos diferentes grupos de fungos – fungos dermatófitos, outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos e fungos leveduriformes – e respectivas espécies fúngicas isoladas em pacientes não diabéticos que apresentaram culturas positivas foi de:

- **Fungos leveduriformes** 39 (43,8%): *Candida parapsilosis* 11 (12,4%); *Candida spp.* 11 (12,4%); *Candida guilliermondii* 6 (6,7%); *Candida albicans* 2 (2,2%); *Candida famata* 2 (2,2%); *Candida rugosa* 2 (2,2%); *Rhodotorula spp.* 2 (2,2%); *Cryptococcus laurentii* 1 (1,1%); *Cryptococcus uniguttulatus* 1 (1,1%); *Trichosporon mucoides* 1 (1,1%);
- **Fungos filamentosos não dermatófitos potencialmente queratinofílicos** 33 (37,1%): *Aspergillus versicolor* 5 (5,6%); *Scytalidium spp.* 4 (4,5%); *Acremonium spp.* 3 (3,4%); *Fusarium spp.* 3 (3,4%); *Alternaria spp.* 2 (2,2%); *Fusarium oxysporum* 2 (2,2%); *Phoma spp.* 2 (2,2%); *Acremonium strictum* 1 (1,1%); *Arthrimum spp.* 1 (1,1%); *Aspergillus glaucus* 1 (1,1%); *Aspergillus nidulans* 1 (1,1%); *Aspergillus spp.* 1 (1,1%); *Aureobasidium spp.* 1 (1,1%); *Bipolaris spp.* 1 (1,1%); *Botrytis spp.* 1 (1,1%); *Exophiala spp.* 1 (1,1%); *Pyrenochaeta spp.* 1 (1,1%); *Scopulariopsis brevicaulis* 1 (1,1%); *Scytalidium hialinum* 1 (1,1%);
- **Fungos dermatófitos** 17 (19,1%): *Trichophyton rubrum* 11 (12,4%); *Trichophyton mentagrophytes* 2 (2,2%); *Trichophyton tonsurans* 2 (2,2%); *Trichophyton spp.* 1 (1,1%); *Microsporum spp.* 1 (1,1%) (Quadro XIV e Fig. 35).

⁽¹⁾ A base de dados correspondente à população controlo apresenta-se em suporte informático (Anexo V).

QUADRO XIV – Grupos de fungos e respectivas espécies fúngicas isoladas em pacientes não diabéticos com culturas positivas.

População controlo		
Fungos isolados	Nº	%
Leveduras	39	43,8
<i>Candida parapsilosis</i>	11	12,4
<i>Candida spp.</i>	11	12,4
<i>Candida guilliermondii</i>	6	6,7
<i>Candida albicans</i>	2	2,2
<i>Candida famata</i>	2	2,2
<i>Candida rugosa</i>	2	2,2
<i>Rhodotorula spp.</i>	2	2,2
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	1,1
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	1	1,1
<i>Trichosporon mucoides</i>	1	1,1
Fungos filamentosos não dermatófitos	33	37,1
<i>Aspergillus versicolor</i>	5	5,6
<i>Scytalidium spp.</i>	4	4,5
<i>Acremonium spp.</i>	3	3,4
<i>Fusarium spp.</i>	3	3,4
<i>Alternaria spp.</i>	2	2,2
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	2,2
<i>Phoma spp.</i>	2	2,2
<i>Acremonium strictum</i>	1	1,1
<i>Arthrinium spp.</i>	1	1,1
<i>Aspergillus glaucus</i>	1	1,1
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	1,1
<i>Aspergillus spp.</i>	1	1,1
<i>Aureobasidium spp.</i>	1	1,1
<i>Bipolaris spp.</i>	1	1,1
<i>Botrytis spp.</i>	1	1,1

População controlo		
Fungos isolados	Nº	%
<i>Exophiala spp.</i>	1	1,1
<i>Pyrenochaeta spp.</i>	1	1,1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1	1,1
<i>Scytalidium hyalinum</i>	1	1,1
Dermatófitos	17	19,1
<i>Trichophyton rubrum</i>	11	12,4
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2	2,2
<i>Trichophyton tonsurans</i>	2	2,2
<i>Trichophyton spp.</i>	1	1,1
<i>Microsporum spp.</i>	1	1,1
Total de estirpes isoladas	89 ⁽¹⁾	100,0

⁽¹⁾ Observação: O número total de estirpes isoladas (n = 89) na população controlo foi superior ao total de pacientes não diabéticos com culturas positivas (72), visto que, em alguns pacientes, foram encontradas diversas associações de fungos a partir de amostras de pele e/ou de unha(s).

Distribuição dos diferentes grupos de fungos isolados em pacientes não diabéticos com culturas positivas

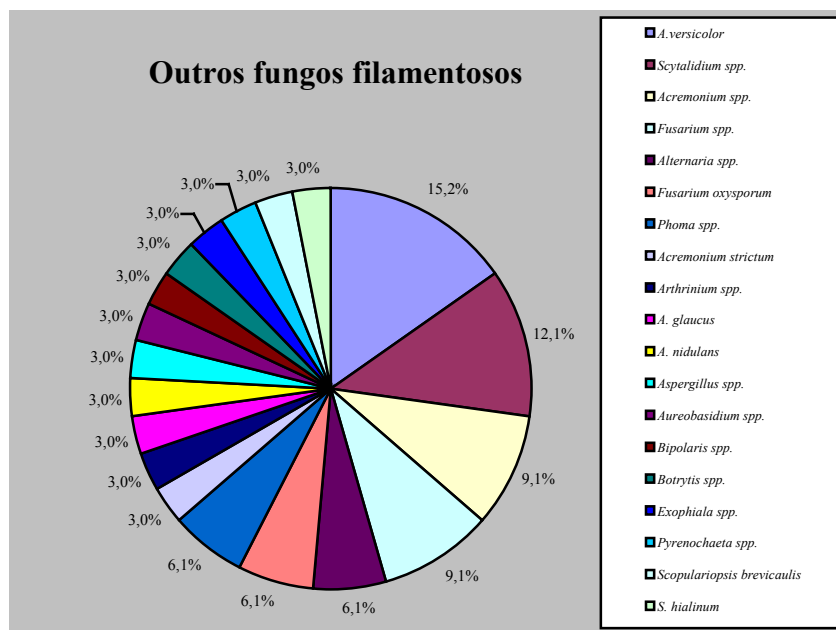
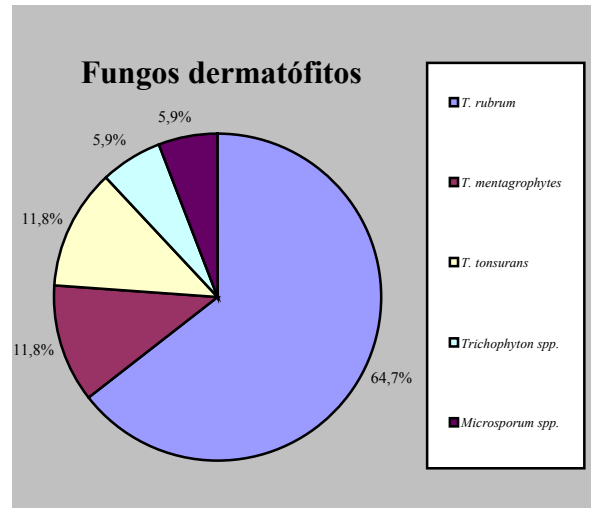
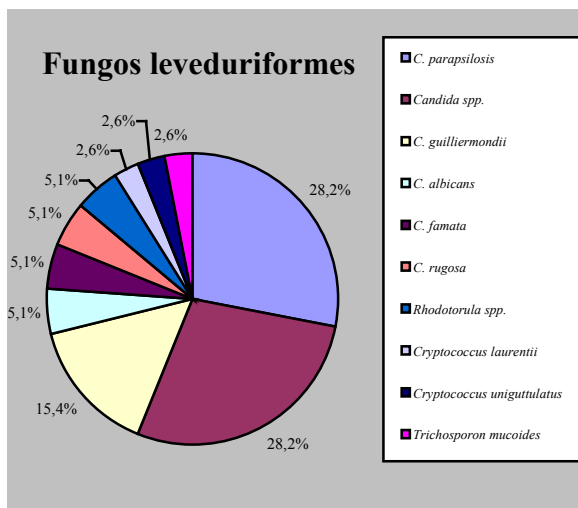
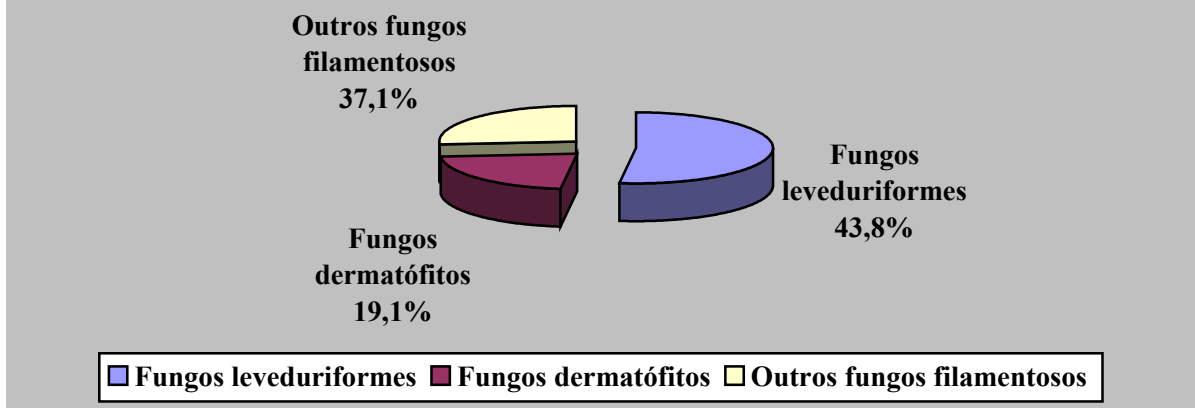


Fig. 35 – Distribuição dos diferentes grupos de fungos e respectivas espécies fúngicas isoladas em pacientes não diabéticos com culturas positivas.

No Quadro XV encontram-se registados os resultados da frequência de cada uma das espécies fúngicas isoladas na população controlo de acordo com a localização da lesão.

QUADRO XV – Frequência das espécies fúngicas isoladas na população controlo de acordo com a localização da lesão.

FUNGOS LEVEDURIFORMES

Candida parapsilosis

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	130	92,2	92,2
	Unha(s)	11	7,8	100,0
	do(s)			
	pé(s)			
Total	141	100,0	100,0	

Candida spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	130	92,2	92,2
	Pele	2	1,4	93,6
	do(s)			
	pé(s)			
	Unha(s)	9	6,4	100,0
do(s)				
pé(s)				
Total	141	100,0	100,0	

Candida guilliermondii

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Válidas	Negativo	135	95,7	95,7
	Pele da	1	,7	96,4
	perna			
	Pele	1	,7	97,1
	do(s)			
	pé(s)			
Unha(s)	4	2,8	100,0	
do(s)				
pé(s)				
Total	141	100,0	100,0	

Candida albicans

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	139	98,6	98,6	98,6
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	2	1,4	1,4	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Candida famata

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	139	98,6	98,6	98,6
Válidas Pele do(s) pé(s)	1	,7	,7	99,3
Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Candida rugosa

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	139	98,6	98,6	98,6
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	2	1,4	1,4	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Rhodotorula spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	139	98,6	98,6	98,6
Válidas Pele do(s) pé(s)	1	,7	,7	99,3
Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Cryptococcus laurentii

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Cryptococcus uniguttulatus

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Pele do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Trichosporon mucoides

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

FUNGOS FILAMENTOSOS NÃO DERMATÓFITOS

Aspergillus versicolor

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	136	96,5	96,5	96,5
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	5	3,5	3,5	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Scytalidium spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	137	97,2	97,2	97,2
Unha(s) do(s) pé(s)	4	2,8	2,8	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Acremonium spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	138	97,9	97,9	97,9
Unha(s) do(s) pé(s)	3	2,1	2,1	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Fusarium spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	138	97,9	97,9	97,9
Unha(s) do(s) pé(s)	3	2,1	2,1	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Alternaria spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	139	98,6	98,6	98,6
Unha(s) do(s) pé(s)	2	1,4	1,4	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Fusarium oxysporum

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	139	98,6	98,6	98,6
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	2	1,4	1,4	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Phoma spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	139	98,6	98,6	98,6
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	99,3
Pele do(s) pé(s) + Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Acremonium strictum

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Arthrinium spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Aspergillus glaucus

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Aspergillus nidulans

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Aspergillus spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Pele do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Aureobasidium spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Bipolaris spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Pele do(s) pé(s) + Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Botrytis spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Exophiala spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Pyrenochaeta spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Válidas Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Scopulariopsis brevicaulis

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Scytalidium hialinum

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

FUNGOS DERMATÓFITOS

Trichophyton rubrum

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	130	92,2	92,2	92,2
Unha(s) do(s) pé(s)	10	7,1	7,1	99,3
Pele do(s) pé(s) + Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Trichophyton mentagrophytes

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	139	98,6	98,6	98,6
Pele do(s) pé(s)	2	1,4	1,4	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Trichophyton tonsurans

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	139	98,6	98,6	98,6
Pele do(s) pé(s)	1	,7	,7	99,3
Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Trichophyton spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

Microsporium spp.

Amostras	Frequência	%	% válida	% acumulada
Negativo	140	99,3	99,3	99,3
Unha(s) do(s) pé(s)	1	,7	,7	100,0
Total	141	100,0	100,0	

No total de pacientes não diabéticos estudados, encontraram-se fungos leveduriformes em 27,7% da população, fungos filamentosos não dermatófitos potencialmente queratinofílicos em 23,4%, fungos dermatófitos em 12,1% e 48,9% de negativos (Fig. 36).

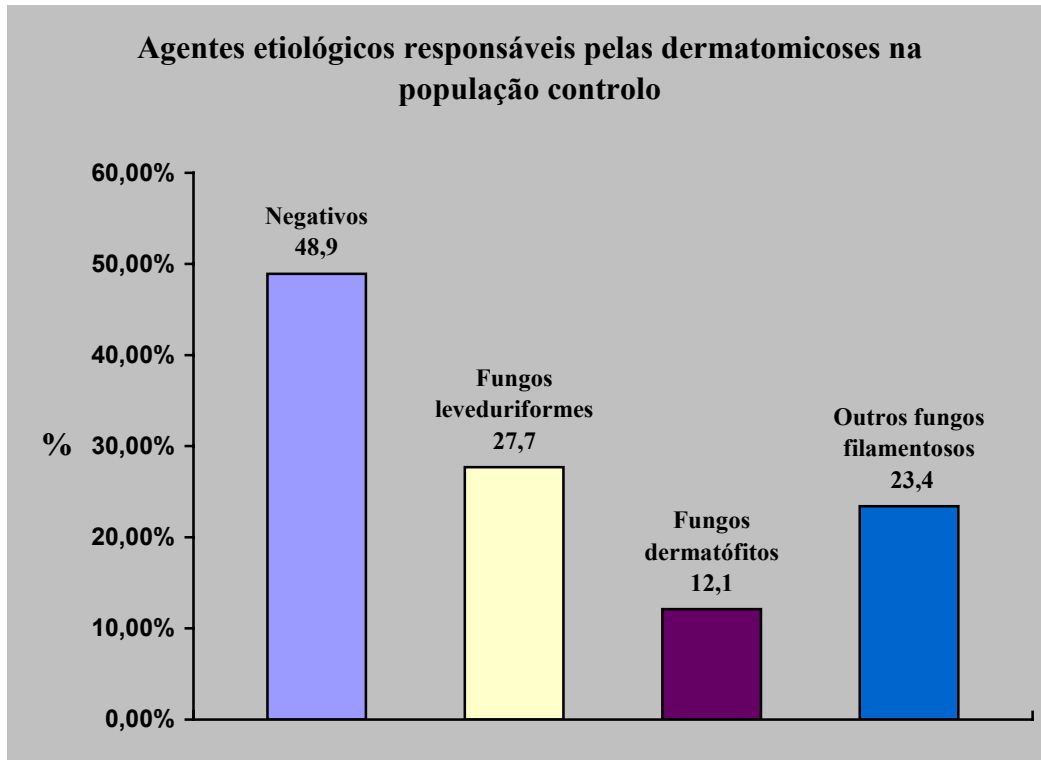


Fig. 36 – Agentes etiológicos responsáveis pelas dermatomicoses na população controle.

A frequência de associações de fungos encontrada na população controle foi de 9,9%. Em 9 (6,4%) pacientes não diabéticos foram encontradas infecções mistas a partir de amostras de pele e/ou de unhas dos pés (Quadro XVI). Noutros 5 (3,5%) pacientes não diabéticos verificou-se que os agentes etiológicos isolados a partir de amostras distintas de pele ou de unhas dos pés em cada paciente, e responsáveis por *tinea pedis* ou onicomicose, foram diferentes (Quadro XVII).

QUADRO XVI – Infecções mistas encontradas em pacientes não diabéticos (n = 9), a partir de amostras de pele e/ou de unhas dos pés.

Nº do paciente não diabético	Pele do(s) pé(s)	Unha(s) do(s) pé(s)	Infecção mista encontrada
2	<i>T. mentagrophytes</i> e <i>Candida spp.</i>	–	FD+FL
33	–	<i>T. rubrum</i> e <i>C. guilliermondii</i> (amostra 1) + <i>C. guilliermondii</i> e <i>Phoma spp.</i> (amostra 2)	FD+FL e FL+FFND
43	<i>Phoma spp.</i> e <i>Bipolaris spp.</i>	<i>Phoma spp.</i> e <i>Bipolaris spp.</i>	FFND+FFND
79	–	<i>Scytalidium spp.</i> e <i>C. parapsilosis</i>	FFND+FL
84	–	<i>Scytalidium spp.</i> e <i>T. rubrum</i>	FFND+FD
114	–	<i>Trichosporon mucoides</i> e <i>C. albicans</i> (amostra 1) + <i>T. mucoides</i> (amostra 2)	FL+FL e FL
122	–	<i>Scytalidium hialinum</i> (amostra 1) + <i>Candida spp.</i> e <i>A. nidulans</i> (amostra 2)	FFND e FL+FFND
130	–	<i>Candida spp.</i> (amostra 1) + <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> e <i>A. versicolor</i> (amostra 2)	FL e FFND+FFND
136	–	<i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Candida spp.</i>	FFND+FL

FD = Fungo dermatófito;

FFND = Fungo filamentoso não dermatófito;

FL = Fungo leveduriforme;

– = Análise não efectuada.

QUADRO XVII – Diferentes agentes etiológicos isolados em pacientes não diabéticos (n = 5) responsáveis por *tinea pedis* ou onicomicose.

Nº do paciente não diabético	Pele do pé (amostra 1)	Pele do pé (amostra 2)	Associação de fungos encontrada
86	<i>C. guilliermondii</i>	<i>Candida spp.</i>	FL e FL
Nº do paciente não diabético	Unha do pé (amostra 1)	Unha do pé (amostra 2)	Associação de fungos encontrada
124	<i>C. parapsilosis</i>	<i>T. tonsurans</i>	FL e FD
125	<i>Scytalidium spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>	FFND e FFND
133	<i>C. guilliermondii</i>	<i>Candida spp.</i>	FL e FL
140	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	FL e FL

FD = Fungo dermatófito;

FFND = Fungo filamentoso não dermatófito;

FL = Fungo leveduriforme.

3.5. CORRELAÇÃO DOS FACTORES PREDISPOENTES COM A POSITIVIDADE DAS AMOSTRAS NA POPULAÇÃO DIABÉTICA ⁽¹⁾

No Quadro XVIII encontram-se registados os resultados da correlação de cada um dos possíveis factores predisponentes apurados (localização da lesão; sexo; idade; etnia; profissão; região do País de residência; tipo de Diabetes; anos de evolução da Diabetes; controlo A1c; obesidade; outras doenças gerais; doença vascular periférica; úlcera do pé; trauma prévio da(s) pele/unha(s); dificuldade/incapacidade para manter higiene apropriada da(s) pele/unha(s); terapêutica hipoglicemiante; tratamentos gerais; tratamentos locais; episódio(s) anterior(es) de infecção fúngica; história familiar de infecções fúngicas; prática de exercício físico em piscina/ginásio; uso de meias/sapatos de desporto; uso de meias de fibra; animais domésticos) com a positividade das amostras na população diabética.

QUADRO XVIII – Possíveis factores predisponentes associados com dermatomicoses na população diabética, por análise de protocolo clínico previamente elaborado.

Localização da lesão				
Pele do pé	Unha do pé	Pele da perna + Unha do pé	Pele do pé + Unha do pé	p = 0,214
Exame cultural positivo				
50,0% (2/4)	31,4% (16/51)	50,0% (1/2)	49,1% (52/106)	

Sexo		
Masculino	Feminino	p = 0,628
Exame cultural positivo		
45,5% (45/99)	40,6% (26/64)	

⁽¹⁾ A base de dados correspondente à população diabética apresenta-se em suporte informático (Anexo V).

Idade		
< 40 anos	≥ 40 anos	p = 0,238
Exame cultural positivo		
16,7% (1/6)	40,6% (66/150)	

Etnia		
Negra	Caucasiana	p = 0,436
Exame cultural positivo		
100,0% (1/1)	43,2% (70/162)	

Profissão		
Profissional não activo	Profissional activo	p = 0,211
Exame cultural positivo		
46,1% (53/115)	34,1% (15/44)	

Região do País de residência			
Norte	Centro	Sul	p = 0,051
Exame cultural positivo			
0,0% (0/1)	59,0% (23/39)	38,1% (45/118)	

Tipo de Diabetes		
tipo 1	tipo 2	p = 0,013 *
Exame cultural positivo		
8,3% (1/12)	46,5% (67/144)	

Anos de evolução da Diabetes						
≤ 10 anos	10-19 anos	20-29 anos	30-39 anos	40-49 anos	≥ 50 anos	p = 0,998
Exame cultural positivo						
44,7% (21/47)	42,6% (20/47)	45,0% (18/40)	45,0% (9/20)	33,3% (1/3)	50,0% (2/4)	

Controlo A1c			
< 6%	6-8%	> 8%	p = 0,258
Exame cultural positivo			
33,3% (2/6)	37,5% (27/72)	50,0% (41/82)	

Obesidade		
Não	Sim	p = 0,631
Exame cultural positivo		
45,9% (39/85)	41,7% (30/72)	

Outras doenças gerais		
Com outras doenças	Com implicações relacionadas com a Diabetes	p = 0,740
Exame cultural positivo		
30,0% (3/10)	38,3% (36/94)	

Doença vascular periférica			
Não	Sim	Ignora	p = 0,170
Exame cultural positivo			
37,9% (22/58)	42,3% (33/78)	60,0% (15/25)	

Úlcera do pé		
Não	Sim	p = 1,000
Exame cultural positivo		
43,7% (55/126)	44,4% (16/36)	

Trauma prévio da(s) pele/unha(s)		
Não	Sim	p = 1,000
Exame cultural positivo		
43,4% (59/136)	44,0% (11/25)	

Dificuldade/incapacidade para manter higiene apropriada da(s) pele/unha(s)		
Não	Sim	p = 0,871
Exame cultural positivo		
43,5% (40/92)	45,5% (30/66)	

Terapêutica hipoglicemiante			
AO	Insulina	AO + Insulina	p = 0,932
Exame cultural positivo			
43,9% (36/82)	41,4% (24/58)	45,5% (10/22)	

Tratamentos gerais						
Não	Antibióticos	Antifúngicos	Corticosteróides	Imunossupressores + Outros	Outros	p = 0,399
Exame cultural positivo						
58,3% (35/60)	50,0% (2/4)	60,0% (3/5)	50,0% (1/2)	0,0% (0/1)	39,6% (21/53)	

Tratamentos locais					
Não	Antibióticos	Antifúngicos	Outros	Antifúngicos + Outros	
Exame cultural positivo					p = 0,227
58,8% (20/34)	100,0% (1/1)	40,0% (38/95)	28,6% (2/7)	41,7% (10/24)	

Episódio(s) anterior(es) de infecção fúngica		
Não	Sim	
Exame cultural positivo		p = 0,695
44,4% (56/126)	39,4% (13/33)	

História familiar de infecções fúngicas		
Não	Sim	
Exame cultural positivo		p = 0,831
43,3% (58/134)	46,2% (12/26)	

Prática de exercício físico em piscina/ginásio		
Não	Sim	
Exame cultural positivo		p = 0,427
44,5% (65/146)	31,3% (5/16)	

Uso de meias/sapatos de desporto		
Não	Sim	
Exame cultural positivo		p = 1,000
44,1% (56/127)	42,9% (15/35)	

Uso de meias de fibra		
Não	Sim	p = 0,111
Exame cultural positivo		
37,0% (30/81)	50,6% (40/79)	

Animais domésticos		
Não	Sim	p = 0,637
Exame cultural positivo		
41,5% (34/82)	45,7% (37/81))	

p = p-value; correspondente ao resultado do teste de associação entre cada uma das variáveis (factores predisponentes) e o resultado de exame cultural positivo;

* **p = 0,013 (p < 0,05) → associação com dermatomicose;**

AO = Antidiabéticos orais.

3.6. CORRELAÇÃO DOS FACTORES PREDISPOENTES COM A POSITIVIDADE DAS AMOSTRAS NA POPULAÇÃO CONTROLO ⁽¹⁾

No Quadro XIX encontram-se registados os resultados da correlação dos possíveis factores predisponentes apurados (localização da lesão; sexo) com a positividade das amostras na população controlo.

QUADRO XIX – Possíveis factores predisponentes associados com dermatomicoses na população controlo, por análise de ficha de identificação do utente.

Localização da lesão				
Pele da perna	Pele do(s) pé(s)	Unha(s) do(s) pé(s)	Pele do(s) pé(s) + Unha(s) do(s) pé(s)	p = 0,186
Exame cultural positivo				
16,7% (1/6)	50,0% (8/16)	52,1% (61/117)	100,0% (2/2)	

Sexo		
Masculino	Feminino	p = 0,256
Exame cultural positivo		
59,5% (22/37)	48,1% (50/104)	

p = p-value; correspondente ao resultado do teste de associação entre cada uma das variáveis (factores predisponentes) e o resultado de exame cultural positivo.

⁽¹⁾ A base de dados correspondente à população controlo apresenta-se em suporte informático (Anexo V).

3.7. SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE FUNGOS LEVEDURIFORMES ISOLADOS NA POPULAÇÃO DIABÉTICA AOS ANTIFÚNGICOS

No Quadro XX encontram-se registados os resultados da susceptibilidade *in vitro* de fungos leveduriformes isolados ⁽¹⁾ na população diabética a diversos antifúngicos: cetoconazol; clotrimazol; econazol; fluconazol; itraconazol; miconazol (Método dos discos).

O total de estirpes sensíveis *in vitro* a cada agente antifúngico foi de: 17 para o econazol, 16 para o cetoconazol, 14 para o clotrimazol, 14 para o miconazol, 13 para o itraconazol e 9 para o fluconazol (Quadro XXI e Fig. 37).

⁽¹⁾ Observação: A susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos foi determinada para todos os fungos leveduriformes isolados nos meios de cultura sólidos. A susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos não foi determinada para os fungos leveduriformes isolados no meio de cultura líquido *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol (Anexo III), uma vez que de acordo com os critérios de quantificação seguidos na rotina laboratorial da Unidade de Micologia do INSA, I.P., as colónias isoladas a partir do meio de cultura líquido referido correspondem sempre a raras colónias e nessa situação, em regra, não se efectua o antifungigrama.

QUADRO XX – Susceptibilidade *in vitro* de estirpes de leveduras isoladas na população diabética (n = 17), nos meios de cultura sólidos, a diversos antifúngicos (Método dos discos). Total de estirpes sensíveis, intermédias e resistentes.

Nº do doente diabético	Levedura isolada	Antifúngicos					
		Cetoconazol	Clotrimazol	Econazol	Fluconazol	Itraconazol	Miconazol
12	<i>Candida spp.</i>	S	S	S	I	S	S
17	<i>Candida spp.</i>	S	S	S	S	S	S
27	<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S
80	<i>Rhodotorula spp.</i>	S	S	S	R	I	S
94	<i>Candida famata</i>	S	S	S	R	R	S
101	<i>Candida famata</i>	S	S	S	I	S	S
119	<i>Candida albicans</i>	I	I	S	R	R	I
119	<i>Candida spp.</i>	S	I	S	R	R	I
124	<i>Candida sp.</i>	S	S	S	S	S	S
124	<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S
124	<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S
124	<i>Cryptococcus curvatus</i>	S	S	S	S	S	S
128	<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S
128	<i>Rhodotorula minuta</i>	S	S	S	R	S	I
129	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	S	I	S	R	S	S

Nº do doente diabético	Levedura isolada	Antifúngicos					
		Cetoconazol	Clotrimazol	Econazol	Fluconazol	Itraconazol	Miconazol
146	<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S
148	<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S

Total de estirpes sensíveis, intermédias e resistentes	16 – S 1 – I 0 – R	14 – S 3 – I 0 – R	17 – S 0 – I 0 – R	9 – S 2 – I 6 – R	13 – S 1 – I 3 – R	14 – S 3 – I 0 – R
---	--------------------------	--------------------------	--------------------------	-------------------------	--------------------------	--------------------------

S = Sensível;
I = Intermédia;
R = Resistente.

QUADRO XXI – Estirpes de leveduras, isoladas na população diabética (n = 17), sensíveis *in vitro* aos vários antifúngicos (Método dos discos).

Estirpes isoladas	Nº	Antifúngicos					
		Cetoconazol	Clotrimazol	Econazol	Fluconazol	Itraconazol	Miconazol
<i>Candida albicans</i>	2	1	1	2	1	1	1
<i>Candida famata</i>	2	2	2	2	0	1	2
<i>Candida parapsilosis</i>	5	5	5	5	5	5	5
<i>Candida spp.</i>	4	4	3	4	2	3	3
<i>Cryptococcus curvatus</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Rhodotorula minuta</i>	1	1	1	1	0	1	0
<i>Rhodotorula spp.</i>	1	1	1	1	0	0	1
<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	1	1	0	1	0	1	1
Total de estirpes sensíveis		16 (94,1%)	14 (82,4%)	17 (100,0%)	9 (52,9%)	13 (76,5%)	14 (82,4%)

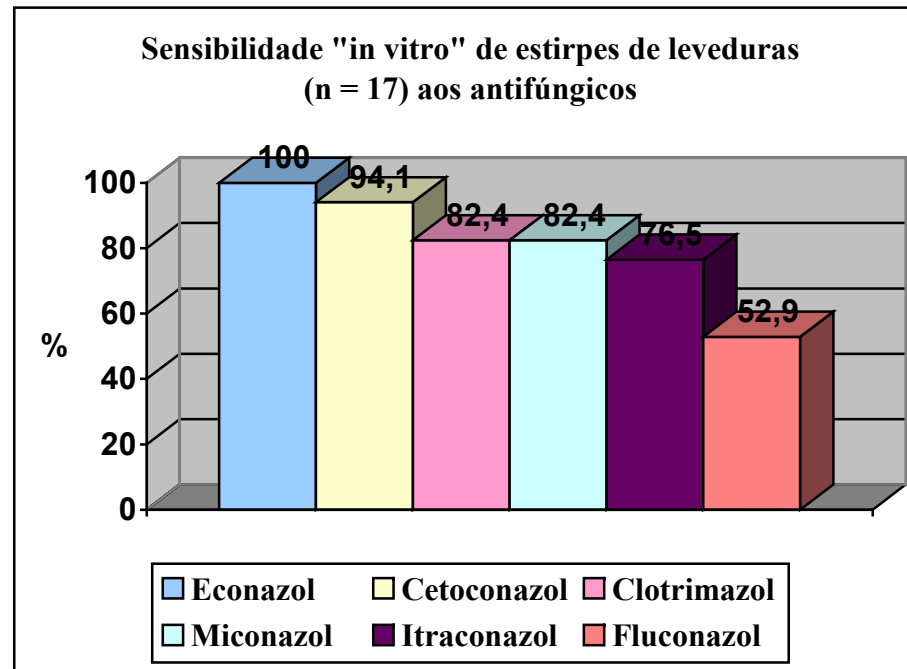


Fig. 37 – Sensibilidade *in vitro* de estirpes de leveduras isoladas na população diabética (n = 17) aos vários antifúngicos testados (Método dos discos).

3.8. SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE ESTIRPES DE FUNGOS DERMATÓFITOS ISOLADOS NA POPULAÇÃO DIABÉTICA AOS ANTIFÚNGICOS

No Quadro XXII encontram-se registados os resultados da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de fungos dermatófitos isoladas na população diabética a diversos antifúngicos: cetoconazol; ciclopirox; clotrimazol; fluconazol; griseofulvina; miconazol (Método dos discos).

O total de estirpes presumivelmente sensíveis *in vitro* a cada agente antifúngico foi de: 31 para o cetoconazol, 31 para o ciclopirox, 30 para o miconazol, 28 para o clotrimazol, 23 para a griseofulvina e 5 para o fluconazol (Quadro XXIII e Fig. 38).

No Quadro XXIV encontram-se registados os resultados da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de fungos dermatófitos isoladas na população diabética ao antifúngico posaconazol (Método E-test).

QUADRO XXII – Susceptibilidade *in vitro* de estirpes de dermatófitos isoladas na população diabética (n = 31) a diversos antifúngicos (Método dos discos). Total de estirpes presumivelmente sensíveis, intermédias e resistentes.

Nº do doente diabético	Dermatófito isolado	Antifúngicos					
		Cetoconazol (Ø em mm)	Ciclopirox (Ø em mm)	Clotrimazol (Ø em mm)	Fluconazol (Ø em mm)	Griseofulvina (Ø em mm)	Miconazol (Ø em mm)
4	<i>Trichophyton tonsurans</i>	> 60 *	34	> 60 *	39	55	49
14	<i>Trichophyton interdigitale</i>	55	32	39	Sem halo	42	36
21	<i>Trichophyton rubrum</i>	48	33	55	Sem halo	54	35
30	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	45	30	51	Sem halo	42	30
39	<i>Trichophyton rubrum</i>	52	34	40	Sem halo	46	35
40	<i>Trichophyton rubrum</i>	52	31	40	Sem halo	42	32
50	<i>Trichophyton soudanense</i>	> 60 *	31	> 60 *	35	59	> 60 *
54	<i>Trichophyton violaceum</i>	55	35	42	Sem halo	39	38
62	<i>Trichophyton spp.</i>	20	32	20	Sem halo	Sem halo	9
66	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	45	30	54	Sem halo	45	33
67	<i>Trichophyton verrucosum</i>	68	23	Sem halo	Sem halo	Sem halo	48
83	<i>Trichophyton soudanense</i>	> 60 *	31	> 60 *	31	47	50
87	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	20	34	39	Sem halo	Sem halo	20

Nº do doente diabético	Dermatófito isolado	Antifúngicos					
		Cetoconazol (Ø em mm)	Ciclopirox (Ø em mm)	Clotrimazol (Ø em mm)	Fluconazol (Ø em mm)	Griseofulvina (Ø em mm)	Miconazol (Ø em mm)
103	<i>Trichophyton tonsurans</i>	53	32	37	Sem halo	52	33
104	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	47	29	Sem halo	Sem halo	Sem halo	27
106	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	45	31	45	Sem halo	41	29
114	<i>Trichophyton rubrum</i>	52	35	44	Sem halo	51	33
118	<i>Trichophyton tonsurans</i>	49	28	54	Sem halo	49	34
120	<i>Trichophyton rubrum</i>	44	35	41	Sem halo	48	32
122	<i>Trichophyton rubrum</i>	44	30	40	Sem halo	47	33
124	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	46	30	51	Sem halo	46	35
130	<i>Trichophyton rubrum</i>	45	34	63	Sem halo	Sem halo	45
132	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	50	36	17	20	Sem halo	29
133	<i>Trichophyton tonsurans</i>	48	31	58	Sem halo	50	35
137	<i>Trichophyton rubrum</i>	38	30	46	Sem halo	Sem halo	34
139	<i>Trichophyton interdigitale</i>	45	30	51	14	43	35
150	<i>Trichophyton rubrum</i>	50	30	45	Sem halo	50	35
155	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	46	30	46	Sem halo	45	31

Nº do doente diabético	Dermatófito isolado	Antifúngicos					
		Cetoconazol (Ø em mm)	Ciclopirox (Ø em mm)	Clotrimazol (Ø em mm)	Fluconazol (Ø em mm)	Griseofulvina (Ø em mm)	Miconazol (Ø em mm)
158	<i>Trichophyton rubrum</i>	> 60 *	44	> 60 *	Sem halo	56	> 60 *
159	<i>Trichophyton rubrum</i>	62	35	48	Sem halo	53	36
160	<i>Epidermophyton floccosum</i>	59	25	22	24	Sem halo	37

Total de estirpes presumivelmente sensíveis, intermédias e resistentes	31 – S	31 – S	28 – S	5 – S	23 – S	30 – S
	0 – I	0 – I	1 – I	1 – I	0 – I	0 – I
	0 – R	0 – R	2 – R	25 – R	8 – R	1 – R

Ø = Diâmetro;

* = Casos em que não foi possível determinar o diâmetro dos halos devido à elevada inibição do crescimento fúngico;

S = Sensível;

I = Intermédia;

R = Resistente.

QUADRO XXIII – Estirpes de dermatófitos, isoladas na população diabética, presumivelmente sensíveis *in vitro* aos vários antifúngicos (Método dos discos).

Estirpes isoladas	Nº	Antifúngicos					
		Cetoconazol	Ciclopirox	Clotrimazol	Fluconazol	Griseofulvina	Miconazol
<i>Trichophyton interdigitale</i>	2	2	2	2	0	2	2
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	7	7	7	6	0	5	7
<i>Trichophyton rubrum</i>	11	11	11	11	0	9	11
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	1	1	1	0	1	0	1
<i>Trichophyton soudanense</i>	2	2	2	2	2	2	2
<i>Trichophyton tonsurans</i>	4	4	4	4	1	4	4
<i>Trichophyton verrucosum</i>	1	1	1	0	0	0	1
<i>Trichophyton violaceum</i>	1	1	1	1	0	1	1
<i>Trichophyton spp.</i>	1	1	1	1	0	0	0
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	1	1	1	1	0	1
Total de estirpes presumivelmente sensíveis		31 (100,0%)	31 (100,0%)	28 (90,3%)	5 (16,1%)	23 (74,2%)	30 (96,8%)

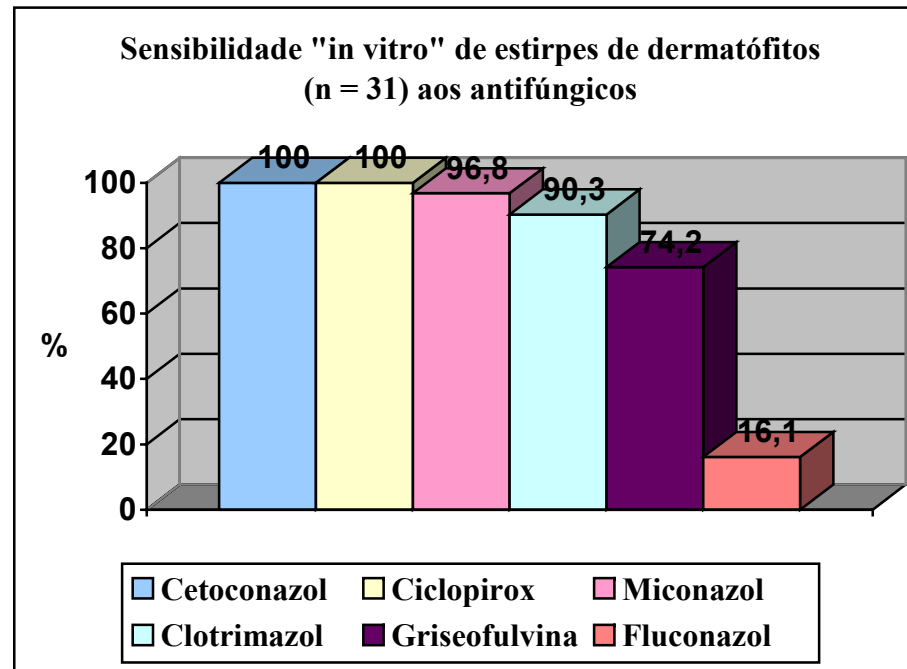


Fig. 38 – Sensibilidade *in vitro* de estirpes de dermatófitos isoladas na população diabética (n = 31) aos vários antifúngicos testados (Método dos discos).

QUADRO XXIV – Susceptibilidade *in vitro* de estirpes de dermatófitos isoladas na população diabética (n = 31) ao antifúngico Posaconazol (Método E-test).

Nº do doente diabético	Dermatófito isolado	Antifúngico
		Posaconazol CMI (µg/ml)
4	<i>Trichophyton tonsurans</i>	0,006
14	<i>Trichophyton interdigitale</i>	0,094
21	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,045
30	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,25
39	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,064
40	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,047
50	<i>Trichophyton soudanense</i>	0,012
54	<i>Trichophyton violaceum</i>	0,032
62	<i>Trichophyton spp.</i>	> 32
66	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,125
67	<i>Trichophyton verrucosum</i>	0,19
83	<i>Trichophyton soudanense</i>	< 0,002
87	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	8
103	<i>Trichophyton tonsurans</i>	0,125
104	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,25

N° do doente diabético	Dermatófito isolado	Antifúngico
		Posaconazol CMI (µg/ml)
106	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,064
114	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,032
118	<i>Trichophyton tonsurans</i>	0,094
120	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,064
122	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,25
124	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,064
130	<i>Trichophyton rubrum</i>	3
132	<i>Trichophyton schoenleinii</i>	32
133	<i>Trichophyton tonsurans</i>	0,125
137	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,032
139	<i>Trichophyton interdigitale</i>	0,012
150	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,064
155	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,064
158	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,016
159	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,064
160	<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,094

CMI = Concentração Mínima Inibitória.

4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

O presente trabalho foi iniciado em Março de 2007 e as colheitas efectuaram-se desde esse mês até Agosto do corrente ano. A escolha de uma época do ano relativamente quente foi casual, dado que durante as estações quentes as pessoas com diabetes apresentam um maior risco de desenvolver dermatomicoses na pele e/ou nas unhas devido à exposição acrescida a factores de risco específicos, tais como: caminhar descalço em zonas contaminadas (piscinas; balneários), prática de exercício físico e uso de meias de desporto (Interamerican College of Physicians & Surgeons, 2006).

Em ambas as populações estudadas (diabética e controlo), efectuaram-se colheitas únicas em cada paciente, o que permitiu, por um lado, o estudo homogéneo das duas populações mas inviabilizou, por outro, a avaliação do “ follow up” de cada paciente em termos de ausência, presença ou persistência de fungos dermatófitos, de outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos ou de fungos leveduriformes na pele e/ou nas unhas. As colheitas efectuaram-se de forma aleatória, não foram dirigidas a nenhuma classe etária em particular, tendo sido seleccionados todos os doentes diabéticos inscritos na consulta de Podologia, com sinais e/ou sintomas para o diagnóstico clínico de dermatomicose ou, por qualquer razão, requerendo observação dos membros inferiores. Na população controlo foram elegíveis para o estudo todos os pacientes que efectuaram análises micológicas de pele e/ou de unha(s) dos membros inferiores no INSA, I.P.. Com o objectivo de não haver alteração da homogeneidade das duas populações, no grupo controlo foram excluídos do estudo todos os pacientes diabéticos, todos os pacientes que efectuaram análises micológicas a cabelo/couro cabeludo e todos os pacientes que efectuaram análises micológicas de pele e/ou de unha(s) de outras localizações anatómicas do corpo humano.

Na população diabética, o protocolo clínico permitiu o registo preciso dos dados pessoais e da história clínica de cada um dos doentes diabéticos, sendo sempre mantida a confidencialidade dos dados pessoais. Para além de facultar que toda a informação ficasse permanentemente disponível para posterior consulta, constituiu, também um meio indispensável de suporte dos resultados obtidos, possibilitando a sua correlação com os eventuais factores predisponentes. Na população controlo, o preenchimento de ficha de identificação do utente, onde foram registados alguns dados clínicos de cada paciente, de acordo com o procedimento de rotina existente na Central de Análises do INSA, I.P., não

permitiu a determinação do grupo etário dessa população, uma vez que a maioria das fichas referidas não apresentava o campo relativo à indicação da idade preenchido. O preenchimento dessas fichas realiza-se pelos próprios pacientes, na ausência de técnicos de saúde, situação contrária à verificada aquando do preenchimento dos protocolos clínicos na população diabética, os quais foram preenchidos pelos próprios técnicos de saúde que iam registando as respostas dadas pelos doentes diabéticos.

Nas lesões de pele colheram-se escamas por raspagem, com bisturi estéril, dos bordos das lesões e em zonas onde se observou descamação. Nas lesões de unhas, colheu-se material biológico por raspagem, com bisturi estéril, de várias camadas da parte dorsal da unha, da zona entre o tecido infectado e o tecido saudável, e cortaram-se as partes afectadas com auxílio de tesoura estéril. No final de cada colheita, passou-se com uma zaragatoa estéril, embebida em soro fisiológico esterilizado, sobre a lesão de pele ou de unha. As técnicas de colheita por nós adoptadas estão descritas como métodos ideais de colheita. Esteves *et al.* (1990), refere que na *tinha* da pele glabra colhem-se escamas por raspagem, com bisturi, do bordo da lesão e em áreas onde se observa descamação e na *tinha* das unhas colhem-se fragmentos destas com alicate corta-unhas, com tesoura ou bisturi. A colheita de biopsia ou com broca de sucção não está indicada como técnica de rotina.

A colheita por zaragatoa, quando utilizada isoladamente ou quando não se dispõe de outro meio, não constitui o método indicado de colheita porque a absorção do produto biológico pelo algodão pode falsear a noção quantitativa dos prováveis elementos fúngicos presentes, o que representa um critério importante na avaliação do significado comensal ou patogénico dos fungos (no caso das leveduras, por ex.). Além disso, pode provocar a perda de viabilidade, por secagem, dos referidos agentes etiológicos. Com a noção deste problema e para minimizar o inconveniente atrás mencionado, no caso das amostras provenientes da população diabética (transportadas semanalmente para o Laboratório de Micologia do INSA, I.P.), após a colheita de pele ou de unha, cada zaragatoa foi de imediato colocada em tubo contendo meio de cultura líquido: *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol.

As amostras dos produtos biológicos da população diabética foram recolhidas para placas de Petri de plástico e, conjuntamente com as zaragatoas respectivas, transportadas semanalmente para o Laboratório de Micologia do INSA, I.P., onde se efectuava o seu processamento. As amostras da população controlo foram recolhidas para placas de Petri de vidro e, conjuntamente com as zaragatoas respectivas, transportadas diariamente para o referido laboratório. Como material ideal de acondicionamento das amostras referem-se: lâminas de vidro envolvidas em papel ou pequenos sacos de papel (mais adequados para

fragmentos de unhas). Não se devem utilizar tubos ou recipientes rolhados e estanques porque facilitam a proliferação bacteriana (Esteves *et al.*, 1990).

O exame directo constitui uma técnica de pesquisa do fungo *in vivo*. Trata-se de um método de detecção que pode ser efectuado directamente a partir de amostras clínicas de lesões e imediatamente após colheita, porque é de fácil e rápida execução, não requer material e meios de montagem complexos ou de difícil preparação, nem de condições de esterilidade. As preparações efectuaram-se a fresco, em KOH 30%. A observação do fungo *in vivo*, sob ponto de vista quantitativo e morfológico, fornece informação valiosa e rápida que permite confirmação, ou não, da suspeita clínica estabelecida e constitui elemento de orientação para a atitude posterior a adoptar. Importa, no entanto, salientar que os aspectos morfológicos observados ao exame directo não constituem, por si só, diagnóstico de género ou espécie. Nas escamas de pele e nos fragmentos de unhas, observam-se ao microscópio hifas ramificadas e septadas, muitas vezes entrecruzadas. Os aspectos são muito variáveis e não são característicos das espécies. É frequente que fungos saprófitas potencialmente queratinofílicos se desenvolvam na pele e nas unhas, sobretudo nestas últimas, originando filamentos ramificados e septados semelhantes a fungos dermatófitos. Rigorosamente, só a cultura pode demonstrar que se trata de dermatófito (Esteves *et al.*, 1990). O exame directo deve, pelas razões referidas, ser sempre complementado com o isolamento em cultura que comprova a viabilidade do fungo e das suas características *in vitro* e com a identificação da espécie ou espécies isoladas.

As sementeiras de escamas de pele e de fragmentos de unhas foram efectuadas em tubo contendo meio de cultura sólido, em posição inclinada. É sabido que o período de incubação necessário para o desenvolvimento das colónias de fungos dermatófitos é, normalmente, de 15 a 20 dias, devendo ser dada preferência às culturas em tubo comparativamente às culturas em placa, uma vez que as primeiras exigem menor quantidade de meio e não desidratam nem inquinam tão facilmente como as segundas.

A temperatura de incubação constitui factor importante nos métodos de isolamento. A incubação efectuou-se a $27 \pm 2^\circ \text{C}$. A incubação dos agentes etiológicos responsáveis por infecções fúngicas superficiais pode fazer-se à temperatura ambiente (22 a 30°C), excepto quando se suspeita de *tinha* por *Trichophyton verrucosum* (de origem bovina), em que deverá fazer-se a 37°C (Esteves *et al.*, 1990). Os tubos observam-se periodicamente e nunca antes de três semanas se devem considerar as culturas como negativas, devido à taxa de crescimento lenta das colónias de fungos dermatófitos.

A positividade de exames directos e das culturas nem sempre coincidiu. Em vários casos, o exame directo foi positivo e as culturas foram negativas. Essa situação verifica-se, em regra, quando os filamentos fúngicos perdem a viabilidade. Sabe-se que a morfologia dessas estruturas se conserva, portanto, só a cultura permite dizer se estamos em presença de formas viáveis ou não viáveis. Essa perda de viabilidade pode ocorrer por demora excessiva entre a colheita e a cultura, ou devido a terapêutica eficaz, ainda que formas não viáveis possam estar presentes em lesões antigas não tratadas (Esteves *et al.*, 1990). Das três hipóteses atrás referidas, a primeira parece-nos a menos credível, dado que intervalo de tempo que decorreu entre a colheita e a cultura das amostras provenientes da população diabética demorou apenas uma semana. Vicente *et al.* (1995), citados por Esteves *et al.* (1990), referem que os fungos dermatófitos sobrevivem no material colhido e bem acondicionado durante meses. Quanto às amostras da população controlo, essas, foram processadas diariamente após as colheitas. A segunda hipótese parece-nos a mais provável, uma vez que após análise dos protocolos clínicos, verificámos que, em alguns doentes diabéticos, não foi possível efectuar a colheita de amostras antes do início do tratamento com agentes antimicóticos. Na população controlo, foi sempre recomendado aos pacientes a interrupção da terapêutica com antifúngicos, durante um período de quinze dias, antes da realização da colheita. Noutros casos, em ambas as populações, o exame directo foi negativo e as culturas foram positivas. Segundo alguns autores, o exame directo constitui uma técnica relativamente insensível, mostrando falsos negativos até cerca de 15% dos casos (Liu *et al.*, 2002). No aspecto quantitativo sabe-se, também, que é possível obter em cultura agentes que não são observados ao exame directo, dado o seu reduzido número nas lesões. Por consequência, o exame directo e a cultura põem em evidência aspectos diferentes: o primeiro, a presença do agente etiológico, o segundo, a viabilidade e as características que permitem a identificação da espécie ou das espécies. Constituem técnicas complementares e não intersubstituíveis entre si (Esteves *et al.*, 1990).

A identificação de espécie tem interesse clínico e epidemiológico. A identificação dos fungos filamentosos efectuou-se, fundamentalmente, pelas características macro e microscópicas das colónias. Observaram-se ao microscópio as características das hifas, dos micro e macroconídios e a eventual existência de outros tipos de esporos ou estruturas particulares. Segundo alguns autores, no caso específico dos fungos dermatófitos, a cultura é capaz de fornecer a identificação específica de espécies de dermatófitos baseada em critérios bioquímicos e morfológicos no intervalo de 10 a 15 dias, em mais de 95% dos casos (Liu *et al.*, 2000). No entanto, se os elementos característicos do género ou da espécie forem

escassos, deverão fazer-se culturas em meios especiais que favorecem o aparecimento dessas estruturas. Por vezes, para isolados atípicos e invulgares, torna-se mesmo necessário recorrer a métodos especiais para a distinção entre as espécies: observação das características macroscópicas das colónias em determinados meios de cultura; cultura em lâmina; estudo de certas características bioquímicas; estudo das necessidades nutritivas; perfuração do cabelo *in vitro*; ensaio da compatibilidade sexual *in vitro* (Esteves *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2000). Estes testes não são apenas dispendiosos e demorados (alguns resultados demoram mais de 3 a 4 semanas a surgir após o primeiro isolamento), como também exigem profissionais especializados com formação em Micologia. Por outro lado, os métodos convencionais dependem da avaliação das características fenotípicas dos fungos dermatófitos, as quais são facilmente influenciáveis por factores externos (variações de temperatura, meio de cultura, etc.) que podem interferir com o processo metabólico dos dermatófitos e afectar a interpretação dos resultados das culturas (Faggi *et al.*, 2001). O recurso a técnicas moleculares baseadas em ácidos nucleicos, que assentam na detecção de diferenças genotípicas de organismos patogénicos, permite uma especificidade e uma precisão maiores do que as técnicas baseadas em características fenotípicas, uma vez que as características genotípicas não são influenciadas por factores externos. No entanto, algumas das técnicas moleculares disponíveis são complexas, demoradas e não são facilmente implementadas na rotina laboratorial para a identificação de fungos dermatófitos.

Comprovámos que a presença de bactérias, quando em simbiose ou em associação a leveduras, pode, em determinadas situações, inibir total ou parcialmente o desenvolvimento das leveduras, dificultar as leituras, inviabilizar a purificação das culturas e, ainda, condicionar todo o processo de identificação subsequente, dificultando a respectiva classificação. De facto, os meios de isolamento utilizados nem sempre inibiram o crescimento de bactérias devido à baixa concentração de cloranfenicol (0,05 g/L) presente nesses meios. Na tentativa de ultrapassar esta situação, efectuámos purificação em meio de cultura em placa: *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) com cloranfenicol. No entanto, esta técnica nem sempre revelou ser totalmente eficaz, devido à presença de flora leveduriforme mista em algumas amostras de pele ou de unhas. Em alternativa, utilizámos o meio de cultura em placa: *Candida ID*® (bioMérieux).

Uma das principais vantagens da utilização do meio de *Candida ID*® (bioMérieux) está relacionada com a obtenção de culturas puras. A acção do(s) antibiótico(s) que entra(m) na sua composição promove(m) a inibição da eventual flora bacteriana presente. Outra vantagem, consiste na possibilidade de isolamento de flora leveduriforme mista cuja presença

nem sempre é detectada a partir dos meios clássicos de isolamento, devido à semelhança colorimétrica e morfológica entre as colónias de leveduras. Esta prova permite, ainda, a identificação directa de *Candida albicans*, funcionando como alternativa à pesquisa de tubos germinativos e à pesquisa de clamidósporos no método clássico de isolamento de leveduras. Por todas as características referidas trata-se de um meio de isolamento que simplifica e torna mais rápido todo o processo de identificação subsequente. No presente trabalho, a utilização desta técnica permitiu a detecção de mais de uma espécie de leveduras em várias amostras estudadas. Na população diabética: *Candida albicans* e *Candida spp.* (doente diabético nº 119); *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus curvatus* (doente diabético nº 124); *Candida parapsilosis* e *Rhodotorula minuta* (doente diabético nº 132) (Quadro XII). Na população controlo: *Trichosporon mucoides* e *Candida albicans* (paciente não diabético nº 114) (Quadro XVI).

O método clássico de identificação de leveduras, apoiado em provas de carácter morfológico e fisiológico, constitui um método fiável e reprodutível, embora a preparação de meios e respectiva execução sejam morosas. Os resultados obtidos a partir das diversas provas devem ser analisados e interpretados em conjunto, face ao valor limitado de cada prova quando valorizada isoladamente. No presente trabalho, a identificação de estirpes leveduriformes efectuou-se recorrendo a um micrométodo de identificação de leveduras, com 32 testes de assimilação miniaturizados e uma base de dados: ID 32 C[®] (bioMérieux). Este sistema constitui, também, uma técnica fiável e reprodutível e de mais fácil execução que o método clássico de identificação, representando uma valiosa ajuda no trabalho de rotina laboratorial. Nesta técnica, os principais factores que podem conduzir à identificação incorrecta das estirpes em estudo são a quantidade do inóculo, a temperatura e o período de incubação, elementos que tivemos em conta, sempre que a executámos. Em ambas as populações estudadas, os resultados do *kit* não permitiram obter o perfil de identificação de espécie em algumas estirpes de leveduras pertencentes aos géneros *Candida*, *Rhodotorula* e *Zygosaccharomyces* (apenas na população diabética). A eventual presença de flora bacteriana associada ou de flora leveduriforme mista, foram hipóteses colocadas durante a apreciação dos resultados. A realização de subculturas em meio de *Candida ID*[®] (bioMérieux), nem sempre executada por ruptura de stock, teria, provavelmente, permitido a inibição de bactérias e a detecção de colónias com cores e morfologias diferentes. Outra hipótese considerada consiste na possibilidade das referidas leveduras apresentarem padrões de identificação bioquímicos não abrangidos pelo *kit*.

A determinação da susceptibilidade *in vitro* de leveduras a agentes antifúngicos pelo método de difusão em agar em meio sólido (método dos discos), constituiu técnica de fácil execução comparativamente ao método de referência estandardizado e aprovado pelo NCCLS, designado actualmente por “Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)”. O "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts" constitui um método de determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), realizado por macro ou micro diluições.

O meio de cultura utilizado constitui factor muito importante, especialmente para os derivados imidazólicos que revelam ser particularmente sensíveis à sua composição. A escolha do meio de *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco), em alternativa aos meios sintéticos estandardizados, oferece algumas vantagens. Trata-se de um meio que possibilita a elevada taxa de crescimento de leveduras e a avaliação da susceptibilidade *in vitro* das estirpes testadas em apenas 24 h, enquanto que outros só o permitem ao fim de 48 h. Trata-se de um meio de fácil preparação e que já era utilizado na rotina laboratorial da Unidade de Micologia do INSA, I.P. para determinação da susceptibilidade *in vitro* de leveduras aos antifúngicos.

As principais dificuldades da técnica estão relacionadas com a concentração do inóculo, a distância a que os discos de susceptibilidade são colocados, a temperatura e o período de incubação e os critérios de leitura utilizados. A densidade e a homogeneidade da suspensão constituem factores a considerar. Suspensões demasiado concentradas (> 0,5 McFarland) e pouco homogéneas podem dificultar a leitura das zonas de inibição e, conseqüentemente, conduzir a que estirpes sensíveis sejam consideradas resistentes. Os discos não devem ser colocados muito próximos uns dos outros para evitar que haja sobreposição dos halos de inibição formados, o que poderia impossibilitar a sua valorização. A incubação das placas efectuou-se a $27 \pm 2^\circ \text{C}$. A escolha desta temperatura justifica-se, por um lado, porque as leveduras estudadas foram isoladas a partir de camadas exteriores da pele e seus anexos queratinizados (unhas) e, por outro, porque se verificou que a incubação à temperatura de $35 \pm 2^\circ \text{C}$ provocava inibição do crescimento de algumas estirpes, facto que poderia traduzir-se em falsa sensibilidade das leveduras aos fármacos testados. A temperatura de incubação de 35°C está apenas recomendada para as leveduras isoladas a partir de mucosas e de órgãos profundos. O tempo de incubação variou entre as 24 e as 72 h, em função da taxa de crescimento das diferentes estirpes. Períodos de incubação mais longos poderão traduzir-se em falsa resistência das leveduras. Os critérios de leitura utilizados constituem uma das principais dificuldades do método. No presente trabalho, verificaram-se três tipos de situações: formação de halos simples transparentes; formação de halos simples não

transparentes; formação de duplos halos de inibição. A produção de halos simples transparentes verificou-se na maioria dos casos, e, de forma constante, para o econazol, sendo as estirpes classificadas de acordo com os critérios de avaliação do fabricante. Sempre que se observou formação de halos simples não transparentes, as estirpes foram consideradas como intermédias a esses antifúngicos, independentemente dos critérios de avaliação referidos. No que respeita aos duplos halos de inibição, apenas valorizámos as zonas transparentes e/ou bem delimitadas. Drouhet e Dupont (1978), referiram que os derivados imidazólicos ao actuarem a nível do bloqueio da síntese do esterol, não o efectuam, no entanto, a 100%, favorecendo o desenvolvimento de pequenas colónias de leveduras e, em consequência, a não transparência dos halos. Segundo os mesmos autores, a reavaliação da susceptibilidade dessas colónias parcialmente inibidas conduz, regra geral, ao mesmo padrão de desenvolvimento da estirpe original.

No que respeita aos fungos dermatófitos, não existe disponível, até à data, um método de referência estandardizado para a determinação da susceptibilidade *in vitro* de fungos dermatófitos a agentes antifúngicos (Ghannoum, 2001 citado por Karaca e Koç, 2004). Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos, a nível internacional, de determinação da susceptibilidade *in vitro* de dermatófitos a agentes antifúngicos e os resultados têm demonstrado variações consideráveis (Mock *et al.*, 1998 e Jessup *et al.*, 2000 citados por Karaca e Koç, 2004). Os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* são influenciados por vários factores: meio de cultura utilizado; pH; densidade do inoculo; temperatura e tempo de incubação; variabilidade de critérios de leitura e de interpretação utilizados interlaboratorialmente (Karaca e Koç, 2004).

No presente estudo, pretendeu-se contribuir para a implementação na rotina laboratorial da Unidade de Micologia do INSA, I.P. do método de difusão em agar para determinação da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de dermatófitos a agentes antifúngicos. A susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos foi avaliada para 31 estirpes de dermatófitos isoladas na população diabética pelo método de difusão em agar em meio de *Mueller-Hinton Agar* (Difco), adaptando, em parte, o método de referência para fungos filamentosos (NCCLS, 1998). Neste estudo, utilizámos o método clássico de realização de antifungigramas (método dos discos) e o E-test.

A execução de antifungigramas pelo método dos discos não diferiu do método estandardizado relativamente ao meio de cultura utilizado. A escolha do meio de *Mueller-Hinton Agar* (Difco) oferece algumas vantagens. Trata-se de um meio de cultura que possibilitou a avaliação da susceptibilidade *in vitro* das estirpes testadas em 3 a 7 dias

(período de incubação variável dependendo da estirpe em estudo), enquanto que outros (RPMI agar, por ex.) só o permitem ao fim de 7 a 15 dias (Karaca e Koç, 2004). Trata-se de um meio de fácil preparação e que já era utilizado na rotina laboratorial da Unidade de Micologia do INSA, I.P. para determinação da susceptibilidade *in vitro* de leveduras e de outros fungos filamentosos aos antifúngicos. A desvantagem da utilização de um meio sem adição de antibiótico, traduziu-se na contaminação de algumas placas devido ao desenvolvimento de bactérias e à consequente inibição do crescimento dos fungos dermatófitos, em função da sua taxa de crescimento mais lenta. Nesses casos, houve necessidade de se repetirem os antifungigramas.

As principais dificuldades da técnica estão relacionadas com a concentração do inóculo, com a distância a que os discos de susceptibilidade são colocados, com a temperatura e o período de incubação e com os critérios de leitura e de interpretação utilizados. A densidade e a homogeneidade da suspensão constituem factores importantes que devem ser considerados. Suspensões pouco concentradas (< 1,0 McFarland) podem conduzir, por um lado, à inibição do crescimento dos fungos dermatófitos e, por outro, ao aumento do período de incubação dos antifungigramas, com consequente possibilidade de inquinação das placas devido ao desenvolvimento de bactérias. O inóculo foi ajustado para 1,0 McFarland, usando um densitómetro. Suspensões pouco homogêneas podem dificultar a leitura das zonas de inibição e, consequentemente, falsear a interpretação dos resultados. Os discos não devem ser colocados muito próximos uns dos outros (máximo de 3 discos por placa) para evitar que haja sobreposição dos halos de inibição formados, o que poderia impossibilitar a sua valorização. A incubação das placas efectuou-se a $27 \pm 2^\circ$ C. A escolha desta temperatura justifica-se porque foi justamente a essa temperatura que todas as estirpes de dermatófitos estudadas foram isoladas. O tempo de incubação variou entre os 3 a 7 dias, em função da taxa de crescimento das diferentes estirpes. Os critérios de leitura e de interpretação utilizados constituíram uma das principais dificuldades do método, uma vez que não houve, ainda, um estudo de colaboração multilaboratorial que definisse o tamanho do diâmetro dos halos para estirpes que funcionem como controlos de qualidade. Não existem, ainda, “guidelines” para considerar as estirpes de dermatófitos como sensíveis, intermédias ou resistentes a determinado antifúngico. No presente trabalho, verificaram-se três tipos de situações: formação de halos simples transparentes, formação de halos simples não transparentes, devido à formação de microcolónias no seu interior, e ausência de formação de halos. A produção de halos simples transparentes verificou-se para a maioria dos antifúngicos, sendo as estirpes classificadas de acordo com os critérios de avaliação do fabricante. Sempre que se observou

formação de halos simples não transparentes, as microcolónias no interior das zonas de inibição não foram valorizadas. A ausência de formação de halos de inibição verificou-se, de forma constante, para o fluconazol. As diferentes estirpes de dermatófitos foram classificadas como presumivelmente sensíveis, intermédias ou resistentes aos vários antifúngicos.

No presente estudo, concluímos que a determinação da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de dermatófitos pelo método de difusão em agar, utilizando discos impregnados de agentes antifúngicos com diferentes concentrações, constitui uma técnica relativamente simples e rápida, reprodutível e económica, que poderá ser aplicada na rotina laboratorial. No entanto, mais estudos serão necessários para validação da correlação entre o método dos discos e o método de referência do NCCLS de determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI), realizado por macro ou micro diluições, para que se verifique a aceitação interlaboratorial e a standardização do método dos discos e dos respectivos critérios de interpretação.

A aplicação da técnica de E-test em fungos oferece algumas vantagens que se encontram documentadas na literatura, nomeadamente: trata-se de um método robusto e flexível que apresenta uma boa correlação com o método de referência; os critérios de leitura e de interpretação de resultados são acessíveis; permite a determinação de valores de CMI precisos; é eficaz na detecção de resistências e na monitorização das terapias; e está indicado para fungos presentes em produtos biológicos estéreis (sangue, LCR, etc.). No presente trabalho, a utilização do E-test em estirpes de dermatófitos teve como objectivo testar um novo antifúngico: Posaconazol E test[®] (AB BIODISK) que está, igualmente, a ser analisado para leveduras e outros fungos filamentosos oportunistas, considerados agentes etiológicos de infecções do tracto respiratório, na Unidade de Micologia do INSA, I.P.. A realização de antifungigramas pelo método E-test em estirpes de dermatófitos efectuou-se em paralelo com o método dos discos, seguindo-se a mesma metodologia.

As principais dificuldades da técnica estão relacionadas com a concentração do inóculo, com a temperatura e o período de incubação e com os critérios de leitura e de interpretação utilizados. Suspensões pouco concentradas (< 1,0 McFarland) podem conduzir, por um lado, à inibição do crescimento dos fungos dermatófitos e, por outro, ao aumento do período de incubação dos antifungigramas, com consequente possibilidade de inquinação das placas devido ao desenvolvimento de bactérias. O inóculo foi ajustado para 1,0 McFarland, usando um densitómetro. Suspensões pouco homogéneas podem dificultar a leitura das elipses e, consequentemente, falsear a interpretação dos resultados. A incubação das placas efectuou-se a $27 \pm 2^\circ \text{C}$. A escolha desta temperatura justifica-se porque foi precisamente a

essa temperatura que todas as estirpes de dermatófitos estudadas foram isoladas. O tempo de incubação variou entre os 3 a 7 dias, em função da taxa de crescimento das diferentes estirpes. As placas foram inspeccionadas diariamente em busca de uma elipse. Os critérios de leitura e de interpretação utilizados constituíram uma das principais dificuldades do método, uma vez que não existem, ainda, “guidelines” para classificar as estirpes fúngicas como sensíveis, intermédias ou resistentes ao posaconazol. No presente trabalho, verificaram-se dois tipos de situações: formação de elipses transparentes e formação de elipses não transparentes, devido à formação de microcolónias no seu interior. As microcolónias no interior das elipses não foram valorizadas.

Quando avaliámos os resultados obtidos para a população diabética obtivemos uma prevalência de dermatomicoses nos membros inferiores de 43,6%. A população diabética foi constituída por 12 doentes com diabetes tipo 1 e por 144 com diabetes tipo 2 (em 7 doentes desconhece-se qual o tipo clínico da diabetes). Do total de doentes diabéticos com culturas positivas, 45,5% eram indivíduos do sexo masculino e 40,6% do sexo feminino. Não ficou demonstrado existir associação entre a presença de dermatomicoses nos membros inferiores, em doentes diabéticos, e o sexo (masculino ou feminino) nem com o aumento da idade, apesar da média de idades desta população se situar nos $63,68 \pm 0,993$ anos (95% IC 61,72 – 65,64). Na pesquisa bibliográfica efectuada encontramos poucos trabalhos especificamente dirigidos à avaliação da presença de infecções fúngicas superficiais na pele e nas unhas dos membros inferiores em doentes diabéticos. Em nenhum desses estudos encontramos valores estimados de prevalência de dermatomicoses nos membros inferiores para este grupo de doentes. No entanto, na década passada, vários estudos avaliaram a prevalência de onicomicoses em pacientes diabéticos. Num desses estudos, Gupta *et al.* (1998) referiram que a prevalência de onicomicoses num grupo de pacientes diabéticos, do tipo 1 e 2, foi de 26% e estimaram que um terço das pessoas com diabetes podem desenvolver onicomicoses durante o decorrer da sua vida. No mesmo estudo, determinou-se que os pacientes do sexo masculino apresentavam um risco três vezes superior (2,99) de desenvolverem onicomicoses, quando comparados com pacientes do sexo feminino e que o desenvolvimento de onicomicoses estava correlacionado, de forma significativa, com o aumento da idade. Vários autores, referem que os pacientes do sexo masculino com diabetes tipo 2 apresentam uma prevalência mais elevada de onicomicoses em relação aos restantes (Gupta *et al.*, 1998; Rich, 1996 e Rich e Hare, 1999 citados por Piérard e Piérard-Franchimont, 2005). Noutros estudos anteriormente realizados, Arenas *et al.* (1999), citados por Chanussot e Arenas (2007), referiram que a frequência de onicomicoses em

pacientes diabéticos, no México, foi de 31,5%, enquanto que Chanussot e Arenas (2007), citaram um valor ligeiramente mais elevado, na ordem dos 38,7%. Num outro trabalho realizado há mais tempo, relativo à prevalência de fungos patogénicos nos espaços interdigitais e nas unhas dos pés em pacientes diabéticos, determinou-se uma percentagem ainda mais elevada, na ordem dos 57% (Alteras e Saryt, 1979).

Alguns autores referem que durante as estações quentes (época do ano correspondente ao período de colheita do presente trabalho) as pessoas com diabetes apresentam um maior risco de desenvolver dermatomicoses na pele e/ou nas unhas devido à exposição acrescida a factores de risco específicos, tais como: caminhar descalço em zonas contaminadas devido à maior utilização das piscinas e dos respectivos balneários; prática de exercício físico e uso de meias de desporto (Interamerican College of Physicians & Surgeons, 2006). No entanto, no presente estudo verificou-se não existir associação entre os factores de risco atrás referidos e a presença de dermatomicoses nos membros inferiores em doentes diabéticos. Pelas razões referidas, as diferenças percentuais encontradas entre os resultados do presente trabalho e os dados da literatura não deverão estar relacionadas com as diferentes épocas do ano em que foram efectuadas as colheitas. No entanto, poderão estar, eventualmente, relacionadas com a variação da distribuição do número e do tipo de amostras ao longo do período de colheita e com os grupos etários considerados nos outros trabalhos.

Na população controlo, constituída por pacientes não diabéticos com suspeita clínica de dermatomicose, houve confirmação micológica de dermatomicoses nos membros inferiores em 51,1% dos pacientes, sendo este valor superior ao obtido para a população diabética. Os resultados do presente estudo não confirmam os resultados esperados. Estudos anteriores, a nível internacional, têm sugerido que é previsível a obtenção de uma prevalência mais elevada de dermatomicoses em doentes diabéticos comparativamente a indivíduos não diabéticos (Alteras e Saryt, 1979; Gupta *et al.*, 1998; Piérard e Piérard-Franchimont, 2005). Num desses estudos, determinou-se que o risco de aparecimento de onicomicoses em doentes diabéticos é aproximadamente três vezes superior (2,77) quando comparado com indivíduos não diabéticos (Gupta *et al.*, 1998). Outros autores, num estudo mais recente de avaliação da frequência de micoses no pé diabético, reforçam o conceito, actualmente aceite, que o paciente diabético multiplica o risco relativo de desenvolver uma onicomicose, 1,5 a 2,8 vezes mais, quando comparado a um paciente não diabético (Fekin *et al.*, 2004 citados por Chanussot e Arenas, 2007). Num outro estudo, realizado na Índia em 400 pacientes, determinou-se que a prevalência de onicomicoses em diabéticos foi de 17%, sendo de 6% no grupo controlo, o que confirma os resultados dos estudos atrás referidos (Effendy *et al.*, 2005

citados por Chanussot e Arenas, 2007). As diferenças percentuais encontradas entre os resultados do presente trabalho e os dados da literatura poderão estar, eventualmente, relacionadas com a diferente constituição dos grupos controlo nos vários estudos.

Em ambas as populações estudadas, as infecções mais frequentes foram as onicomicoses seguidas de *tinea pedis*. A frequência de dermatomicoses na população diabética de acordo com a localização da lesão foi de: 19,6% nas unhas dos pés; 15,3% na pele dos pés; 8,0% na pele dos pés e nas unhas dos pés; e 0,6% na pele das pernas. Na população controlo, verificou-se que existe uma grande predominância de lesões nas unhas dos pés (43,3%), seguidas dos casos de lesões na pele dos pés (5,7%), de lesões na pele dos pés e nas unhas dos pés (1,4%) e, por último, de lesões na pele das pernas (0,7%). Como já referimos anteriormente, na pesquisa bibliográfica efectuada não encontramos muitos trabalhos especificamente dirigidos à avaliação da prevalência de infecções fúngicas superficiais na pele e nas unhas dos membros inferiores em doentes diabéticos. A maior parte dos estudos avalia unicamente a prevalência de onicomicoses nesses pacientes. Os nossos resultados são contrários aos encontrados por Romano *et al.* (2001). Estes autores referem que a infecção mais frequente em doentes diabéticos é *tinea pedis*, seguida de onicomicose distal (subungueal). Vários autores referem que a micose plantar constitui um factor de risco e de recorrência para a infecção ungueal, e alertam para o facto de muitas micoses plantares passarem despercebidas e serem confundidas com xeroses e hiperqueratoses devido à fricção (Foulet *et al.*, 2004, Mayser *et al.*, 2004 e Sigurgeisson e Steingrimsson, 2004 citados por Chanussot e Arenas, 2007). Chanussot e Arenas (2007), num estudo de avaliação micológica plantar e interdigital em pacientes diabéticos com onicomicoses, confirmaram a relação de onicomicose com *tinea pedis* e determinaram uma frequência de 61,2% para infecções nas unhas e nas plantas dos pés em pacientes diabéticos. Num outro estudo, determinou-se uma frequência inferior, de 42,4%, para o mesmo tipo de infecções em pacientes diabéticos, nas mesmas localizações anatómicas (Garcia-Humbria *et al.*, 2005 citados por Chanussot e Arenas, 2007). De acordo com Araújo *et al.* (2003), os factores que levam as unhas dos pés a apresentarem uma elevada taxa de onicomicoses são: crescimento lento (1,5 a 2 mm/mês) e maior exposição ao trauma. O facto das unhas dos pés serem zonas do corpo sujeitas a elevada humidade, maceração e calor pode, também, favorecer a colonização por fungos. Em ambas as populações, a elevada frequência com que ocorrem dermatomicoses nos pés, transformam-nas num importante problema de saúde pública, podendo causar um risco particular à saúde do idoso e consequências de sua disseminação na comunidade. No doente diabético, em particular, a prevenção e a prestação de cuidados de saúde são fundamentais,

uma vez que as lesões dos membros inferiores necessitam de diagnóstico rápido e tratamento imediato, para que sejam evitadas complicações ocasionalmente graves ou mesmo fatais (Minelli *et al.*, 2003). Num doente diabético, uma lesão do pé não tratada a tempo pode dar origem ao aparecimento de dermatomicoses, especialmente onicomicoses, de difícil tratamento, constituir uma porta de entrada para infecções mais graves ou gerar a incapacitação permanente do doente (Mateus, 2005).

A distribuição dos agentes etiológicos isolados em doentes diabéticos com culturas positivas foi, por ordem de frequência: fungos leveduriformes 45,5%; fungos dermatófitos 31,3%; outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos 23,2%. Na população controlo, a distribuição dos agentes etiológicos isolados em pacientes não diabéticos com culturas positivas foi de: fungos leveduriformes 43,8%; fungos filamentosos não dermatófitos potencialmente queratinofílicos 37,1%; fungos dermatófitos 19,1%. Comparando os resultados obtidos entre as duas populações estudadas, constatámos que em ambas obtivemos uma predominância de fungos não dermatófitos em relação a fungos dermatófitos. De acordo com a maioria dos estudos de prevalência de onicomicoses em pacientes diabéticos, seria previsível uma predominância de fungos dermatófitos em relação a fungos leveduriformes e a fungos filamentosos não dermatófitos, em ambas as populações (Gupta *et al.*, 1998; Alteras e Saryt, 2004; Piérard e Piérard-Franchimont, 2005; Chanussot e Arenas, 2007). No entanto, os nossos resultados estão de acordo com um estudo semelhante ao do presente trabalho, no qual se determinou que os agentes etiológicos mais frequentes de onicomicoses, em pacientes diabéticos, foram as leveduras (48,1%), seguidas dos dermatófitos (37,0%) e dos fungos filamentosos não dermatófitos (14,8%) (Romano *et al.*, 2001). Num outro estudo anteriormente realizado, determinou-se que a frequência de onicomicoses, em pacientes com diabetes, causada por *Candida spp.* foi de 78,9%, enquanto que por fungos dermatófitos foi de 10,5% (Arenas *et al.*, 1999 citados por Chanussot e Arenas, 2007).

Na pesquisa bibliográfica efectuada, encontrámos, também, vários estudos relativos ao estudo da prevalência de dermatomicoses, sobretudo onicomicoses, na população saudável não diabética. Na sua maioria, os resultados são indicativos da predominância e da importância dos fungos dermatófitos como agentes patogénicos deste tipo de infecções, salienta-se, no entanto, o papel etiológico, ainda que controverso, de algumas espécies de leveduras e de outros fungos filamentosos queratinofílicos como agentes oportunistas de infecções fúngicas superficiais (Rosado e Teles, 1989; Torres-Rodriguez e López-Jodra, 2000; Araújo *et al.*, 2003; Järv *et al.*, 2004; Onychomycosis, 2007). No que diz respeito à população controlo, os nossos resultados estão de acordo com a casuística da Unidade de

Micologia do INSA, I.P. referente aos últimos cinco anos (2002-2006), que sugere o aumento da prevalência de dermatomicoses provocadas por fungos leveduriformes e por outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos em relação a fungos dermatófitos, em pacientes não diabéticos. Podemos, desta forma, concluir que a prevalência de dermatomicoses provocadas por fungos não dermatófitos tem vindo a aumentar, e devido à similaridade clínica das lesões com as infecções causadas por fungos dermatófitos, o estudo micológico revela-se essencial para a sua diferenciação, sendo também importante do ponto de vista epidemiológico e terapêutico.

A valorização dos agentes etiológicos identificados efectuou-se de acordo com a sua importância clínica, descrita na literatura. Quanto às diferentes espécies fúngicas isoladas, *Candida spp.* e *Candida parapsilosis* foram as leveduras mais frequentemente isoladas em ambas as populações. Além do género *Candida*, outros géneros de leveduras foram isolados no conjunto das duas populações, embora com menor frequência: *Cryptococcus spp.*; *Rhodotorula spp.*; *Trichosporon spp.*; *Zygosaccharomyces spp.*. *Trichophyton rubrum* foi o fungo dermatófito isolado com maior frequência em pacientes diabéticos e não diabéticos, seguido de *Trichophyton mentagrophytes* e de *Trichophyton tonsurans*. No seu conjunto, várias espécies do género *Aspergillus*, com predominância de *Aspergillus flavus* na população diabética e de *Aspergillus versicolor* na população controlo, constituíram os fungos filamentosos não dermatófitos mais frequentemente isolados nas duas populações estudadas. Além do género *Aspergillus*, assistiu-se ao isolamento, embora com menor frequência, de uma grande variedade de géneros de fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos no conjunto das duas populações: *Acremonium spp.*; *Alternaria spp.*; *Arthrimum spp.*; *Aureobasidium spp.*; *Bipolaris spp.*; *Botrytis spp.*; *Cryosporium spp.*; *Chaetomium spp.*; *Exophiala spp.*; *Fusarium spp.*; *Phoma spp.*; *Pyrenochaeta spp.*; *Scedosporium spp.*; *Scopulariopsis spp.*; *Scytalidium spp.*. Alguns autores consideram que as espécies fúngicas têm uma distribuição mundial que varia periodicamente, com diferenças significativas em termos da sua composição quantitativa e qualitativa, sendo afectadas por vários factores ambientais. A análise periódica da sua composição é importante do ponto de vista epidemiológico e terapêutico (Araújo *et al.*, 2003). Um estudo anteriormente realizado, mostra que *Candida albicans* constitui a levedura que ocorre mais frequentemente, logo a seguir a fungos dermatófitos, correspondendo a 31% dos isolamentos em pacientes diabéticos e a 5% dos isolamentos no grupo controlo (Alteras e Saryt, 1979). Num estudo mais recente, Chanussot e Arenas (2007), referem que, em pacientes diabéticos, *Candida spp.* constitui o agente etiológico isolado em segundo lugar, por ordem de frequência, logo a seguir aos

fungos dermatófitos. Na pesquisa bibliográfica efectuada, em estudos semelhantes ao do presente trabalho, não encontrámos mais nenhuma referência relativamente a diferentes espécies de leveduras isoladas. Vários autores salientam a importância de *Trichophyton rubrum* como o principal agente etiológico responsável por dermatomicoses, especialmente de onicomioses (Torres-Rodríguez e López-Jodra, 2000; Interamerican College of Physicians & Surgeons, 2006; Onychomycosis, 2007). Os nossos resultados estão de acordo com a maioria dos estudos que referem que *Trichophyton rubrum* é o fungo dermatófito mais comum em pacientes diabéticos e não diabéticos (Alteras e Saryt, 1979; Piérard e Piérard-Franchimont, 2005; Chanussot e Arenas, 2007). Dois desses trabalhos referem, inclusivamente, que *Trichophyton mentagrophytes* foi a segunda espécie de dermatófito mais frequentemente isolada nos dois tipos de populações (Alteras e Saryt, 1979; Chanussot e Arenas, 2007), o que confirma os nossos resultados. Outros autores, num estudo de prevalência de dermatofitias na pele e nas unhas em pacientes diabéticos, referem que *Trichophyton mentagrophytes* foi o fungo mais frequentemente isolado (Romano *et al.*, 2001). Verifica-se, desta forma, alguma evidência relativa ao aumento de dermatofitias causadas por espécies antropofílicas e que as infecções por espécies zoofílicas e geofílicas estão a diminuir, um pouco por todo o mundo. Esta constatação está de acordo as conclusões extraídas de um relatório sobre “Mycotic Diseases in Europe” (1983), citado por Rosado e Teles (1989). A única referência bibliográfica encontrada que descreve géneros/espécies de fungos filamentosos não dermatófitos em pacientes diabéticos, apresenta resultados semelhantes aos do presente estudo. Piérard e Piérard-Franchimont (2005), referem que os fungos filamentosos não dermatófitos identificados englobaram os seguintes géneros/espécies: *Aspergillus spp.*, *Acremonium spp.*, *Alternaria tennis*, *Fusarium oxysporum* e *Scopulariopsis brevicaulis*. A maioria dos géneros/espécies fúngicas isoladas no presente estudo, em ambas as populações estudadas, encontra-se referenciada num artigo de revisão sobre a epidemiologia das infecções das unhas devido a fungos queratinofílicos (Torres-Rodríguez e López-Jodra, 2000).

Em ambas as populações estudadas foram encontradas diversas associações de fungos. A frequência de infecções mistas foi de 8,0% na população diabética e de 6,4%, na população controlo. Está descrito que, nas onicomioses, uma superinfecção com um segundo agente patogénico ocorre numa fase avançada de uma infecção não tratada (Baran *et al.*, 1998 citados por Järv *et al.*, 2004). De acordo com os mesmos autores, na população controlo, a frequência de infecções mistas poderá estar relacionada com o facto de alguns pacientes só marcarem uma Consulta de Dermatologia já num estado avançado da infecção. As razões poderão ser

sócio-económicas, como o custo da consulta médica e do tratamento e da sua eficácia, ou poderão estar relacionadas com os hábitos culturais, como a atitude perante uma infecção fúngica superficial constituir apenas um simples problema estético. De acordo com Araújo *et al.* (2003), muitos pacientes com unhas anormais não estão cientes de que podem ter onicomicoses nem de que essas infecções são tratáveis. No caso dos doentes diabéticos, a perda de sensibilidade local, devida ao comprometimento da enervação superficial e profunda dos tecidos causada pela neuropatia diabética que, por sua vez, predispõe ao aparecimento de infecções e traumatismos, poderá estar relacionada com o facto dos doentes não procurarem de imediato o seu médico quando apresentam manifestações da pele e seus anexos, como infecções fúngicas das unhas, das margens ungueais e dos espaços interdigitais, uma vez que essas lesões são, geralmente, indolores e não lhes causam desconforto.

A relação entre a concentração do agente patogénico e a severidade da sua acção é bem conhecida para muitas infecções. Na candidíase vaginal, por exemplo, sabe-se que *Candida albicans* ocorre como comensal, comportando-se, ocasionalmente, como um agente patogénico oportunista e que outras espécies de leveduras são também isoladas, embora com menor frequência, da pele e das mucosas de indivíduos aparentemente saudáveis (Esteves *et al.*, 1990). A avaliação micológica deve, no entanto, ser valorizada conjuntamente com a clínica, afim de se averiguar o provável comensalismo ou patogenia da levedura isolada. Considerando a natureza dos agentes etiológicos identificados, no presente trabalho, obtivemos uma predominância de fungos não dermatófitos em relação a fungos dermatófitos, em pacientes diabéticos e não diabéticos. O papel das leveduras e dos fungos filamentosos não dermatófitos como agentes causadores de dermatomicoses ainda não se encontra devidamente esclarecido, e a sua prevalência tem variado consideravelmente em diferentes estudos (Evans, 1998 e Tosti *et al.*, 2000 citados por Järv *et al.*, 2004). Muitas dessas espécies poderão ser contaminantes mas também serão capazes de causar infecção. Alguns autores sugeriram que a presença de elementos característicos, células leveduriformes ou esporos, ao exame directo constitui critério de patogenicidade para uma infecção por leveduras ou por fungos filamentosos não dermatófitos, respectivamente (Summerbell, 1997 citado por Järv *et al.*, 2004). Järv *et al.* (2004), defendem que outra forma de confirmar que determinada infecção é causada por leveduras ou fungos filamentosos não dermatófitos consiste no sucessivo isolamento do provável agente patogénico em cultura. Num estudo anteriormente efectuado na Unidade de Micologia do INSA, I.P., constatou-se que existe, realmente, uma actividade queratinofílica de relevo em determinadas espécies de fungos ambientais, denotando, algumas delas, actividades queratinofílicas surpreendentemente elevadas. É, pois,

de considerar a sua estreita relação com determinadas patologias clínicas que afectam a pele, as unhas ou os cabelos. No mesmo estudo, chegou-se à conclusão que se devem considerar como significativos os resultados que apontem para infecções provocadas por estas espécies, passando os mesmos a ser validados no decorrer da rotina laboratorial (Sabino, 2002). Dos nossos resultados, podemos concluir que o facto de existirem 14,1% e 23,4% de infecções causadas por fungos filamentosos não dermatófitos, respectivamente, na população diabética e na população controlo, fornece, por si só, indicação de que existem espécies anteriormente consideradas como ambientais ou contaminantes que, em contacto com o Homem, e sob determinadas condições, se podem tornar patogénicas.

No presente trabalho, todos os presumíveis factores predisponentes apurados nos Quadros XVIII e XIX foram analisados estatisticamente, mas apenas serão objecto de discussão aqueles que, de algum modo, sugeriram ter importância quando correlacionados com a positividade/negatividade das amostras, em cada uma das populações estudadas. Assim, na população diabética, a correlação dos possíveis factores predisponentes para a infecção com a positividade das amostras demonstrou a existência de associação entre o tipo clínico de diabetes ($p = 0,013$), designadamente a diabetes tipo 2, e a presença de dermatomicoses. No entanto, não foi encontrada correlação entre a positividade das amostras e os anos de evolução da doença ou os níveis de hemoglobina A1c (controlo A1c ⁽¹⁾). Romano *et al.* (2001), num estudo de prevalência de dermatofitias na pele e nas unhas em doentes diabéticos, confirmam, apenas em parte, os nossos resultados. Estes autores, não encontraram qualquer correlação entre a presença de dermatofitias e a duração ou o tipo de diabetes e suas complicações, nem com os níveis de açúcar no sangue ou os níveis de hemoglobina glicosilada. Outros estudos contrariam, por sua vez, alguns destes resultados. Alteras e Saryt (1979), num estudo de prevalência da presença de fungos patogénicos nos espaços interdigitais e nas unhas dos pés em doentes diabéticos, comprovaram a existência de

⁽¹⁾ **Observação:** O controlo A1c é uma análise fundamental na monitorização do doente diabético, idealmente doseada de 3 em 3 meses, que permite dosear a glucose que está ligada à hemoglobina no interior dos glóbulos vermelhos, designada por glicohemoglobina ou hemoglobina glicosilada ou hemoglobina A1c (HbA1c). Como a vida média dos glóbulos vermelhos em circulação é de 3 meses, esta análise permite avaliar o comportamento dos últimos 2 a 3 meses. Quanto mais açúcar existe no sangue, mais glóbulos vermelhos têm glucose ligada à sua hemoglobina e maior será o valor da glicohemoglobina. Deste modo, a análise da hemoglobina A1c pode dar-nos uma ideia de quais os valores de açúcar no sangue (glicemia) nas últimas semanas. Embora existam vários métodos de análise, a maioria (caso do Laboratório Lamartine, por ex.) considera como níveis normais de HbA1c valores entre 4,0 e 6,0%. Isto significa que as pessoas que não têm diabetes têm açúcar ligado a 4,0 a 6,0% da sua hemoglobina. Nesta escala, um diabético bem compensado da sua diabetes tem uma hemoglobina A1c de 6,0 a 7,0%. Uma pessoa com uma diabetes não diagnosticada ou não tratada pode ter uma glicohemoglobina superior a 10,0%, ou mesmo valores superiores a 15,0%. A maioria dos médicos usa o valor de 8,0% como o valor acima do qual é necessário agir para corrigir o tratamento da diabetes (APDP, 2007).

associação entre os níveis de açúcar no sangue e a percentagem de amostras positivas e concluíram que todos os pacientes diabéticos com valores de glicemia superiores a 3000 mg/ml se encontravam infectados. Foss *et al.* (2005), num estudo mais recente de prevalência de dermatoses em pacientes diabéticos, referiram que em pacientes com controlo metabólico inadequado (valores médios de hemoglobina glicosilada de 11,9% nos diabéticos tipo 1 e de 12,7% nos diabéticos tipo 2) foi observada maior frequência de dermatofitoses, em ambos os tipos de diabetes, e sugeriram que o descontrolo metabólico do diabético propicia a uma maior susceptibilidade às infecções cutâneas.

A diabetes caracteriza-se por um conjunto de alterações no organismo, de evolução crónica e degenerativa, provocado pela ausência de secreção de insulina e/ou pela sua acção no organismo que determina, por sua vez, um conjunto de alterações metabólicas, caracterizadas principalmente pela hiperglicémia (Marble *et al.*, 1985 citados por Foss *et al.*, 2005). Com base nos diferentes mecanismos etiopatogénicos e fisiopatológicos da doença, estabeleceram-se dois tipos clínicos principais e distintos da diabetes: diabetes do tipo 1 e do tipo 2. A diabetes tipo 1 é, geralmente, um distúrbio auto-imune, com produção de auto-anticorpos contra as células β dos ilhéus de Langerhans, e consequentemente, conduz à diminuição da produção de insulina. Desenvolve-se em indivíduos geneticamente susceptíveis e pode estar associado a diversos factores ambientais (Eisenbarth, 1986 citado por Foss *et al.*, 2005). Na diabetes tipo 2 o mecanismo patogénico é diferente, pois a hiperglicémia crónica é causada, predominantemente, por resistência da célula alvo (muscular, adiposa e hepática) à acção da insulina circulante. A diabetes tipo 2 é frequentemente associada à deficiência quantitativa e qualitativa da secreção de insulina para o controle dos níveis de glicemia normais (De Fronzo e Ferrannini, 1991 citados por Foss *et al.*, 2005).

Os doentes diabéticos apresentam muitas vezes manifestações cutâneas aliadas à doença, sendo frequente a colonização dos tecidos queratinizados por fungos, o que pode constituir uma porta de entrada para infecções mais graves ou dar origem ao aparecimento de dermatomicoses, especialmente onicomicoses, de difícil tratamento, sobretudo nos membros inferiores (Minelli *et al.*, 2003; Mateus, 2005). Em ambas as formas da doença há descrições do aumento da incidência de dermatomicoses, no entanto, as causas da maior susceptibilidade às infecções não se encontram ainda bem esclarecidas. De acordo com alguns autores, a hiperglicémia crónica tem influência no aparecimento das complicações crónicas da diabetes, por indução da glicação não enzimática de proteínas (Ansel *et al.*, 1997 citados por Foss *et al.*, 2005). Esses produtos são inicialmente reversíveis, porém, devido à hiperglicémia crónica, algumas proteínas sofrem alterações significativas nas paredes dos vasos, levando ao

comprometimento do tecido local (Dyer *et al.*, 1993 citados por Foss *et al.*, 2005). Esta situação pode ocorrer, por exemplo, com as proteínas do endotélio e do colagénico, causando uma maior susceptibilidade às infecções. Outros autores, referem que a insuficiência vascular periférica e a neuropatia diabética representam factores que predisõem à instalação e ao desenvolvimento de infecções nos tecidos queratinizados (Huntley, 1986 citado por Minelli *et al.*, 2003). A hiperosmolaridade do soro do diabético ocasiona anomalias na função leucocitária, a qual é associada à diminuição na difusão de nutrientes e à migração dos leucócitos através das paredes vasculares espessadas. A pele do diabético passa a ser um órgão aberto às mais variadas formas de comprometimento, nomeadamente de origem fúngica, facilitando as complicações e/ou retardando a cura de processos aparentemente benignos e de curta duração (Torres *et al.*, 1993 e Koivukangas *et al.*, 1999 citados por Minelli *et al.*, 2003). Adicionalmente, é conhecido que a colonização da pele queratinizada por determinado fungo requer que esse microorganismo atravesse a barreira natural da camada córnea. Isso inclui, entre vários factores, a presença de ácidos gordos fungistáticos produzidos por queratinócitos (Nelson *et al.*, 2003 citados por Foss *et al.*, 2005). Dessa forma, a penetração dos esporos fúngicos na epiderme depende da integridade dessa barreira e da defesa contra a infecção (presente nas camadas mais profundas da epiderme) estando também relacionada com a activação da resposta imunológica, ambas comprometidas na pele do diabético (Bub e Olerud, 2003 citados por Foss *et al.*, 2005). Foi, também, descoberta a actividade imunológica inata de péptidos com propriedades antimicrobianas naturais que são sintetizados na epiderme e nas unhas (Gallo *et al.*, 2002, Zasloff, 2002 e Dorschner *et al.*, 2004 citados por Piérard e Piérard-Franchimont, 2005). A actividade antifúngica destes péptidos ainda não foi especificamente estudada em doentes diabéticos. No entanto, supõe-se que ao ocorrer glicação destas moléculas, a defesa natural contra os fungos possa ficar comprometida (Piérard e Piérard-Franchimont, 2005). Outro aspecto que tem sido descrito por vários autores é que as alterações endócrinas favorecem o aparecimento de candidíase e que as células epiteliais e das mucosas dos doentes diabéticos apresentam aderência para alguns agentes patogénicos, nomeadamente *Candida albicans* (Esteves *et al.*, 1990; Leonhart e Heymann, 2003 citados por Foss *et al.*, 2005).

De acordo com estudos recentes a nível internacional têm sido, também, referidos outros factores predisponentes e/ou de risco para o desenvolvimento de onicomicoses em pessoas com diabetes como: sexo (Gupta *et al.*, 1998; Piérard e Piérard-Franchimont, 2005), aumento da idade, história familiar de onicomicose, tratamentos com imunossuppressores, doença vascular periférica (Gupta *et al.*, 1998), caminhar descalço em zonas contaminadas

(piscinas; duches comuns), prática de exercício físico e uso de meias de desporto (Interamerican College of Physicians & Surgeons, 2006). No nosso estudo não houve confirmação destes resultados, uma vez que não foi encontrada existência de associação entre os referidos factores de risco e a presença de dermatomicoses em doentes diabéticos.

Na população controlo, só nos foi possível apurar dois presumíveis factores predisponentes para a infecção – localização da lesão e sexo –, por análise das fichas de identificação dos utentes. A correlação desses possíveis factores predisponentes para a infecção com a positividade das amostras não sugeriu a existência de associação com a presença de dermatomicoses na referida população.

No presente estudo determinámos, ainda, a susceptibilidade *in vitro* de 17 estirpes de fungos leveduriformes isolados (nos meios de cultura sólidos) na população diabética a diferentes antifúngicos pelo método dos discos. De acordo com os critérios de quantificação seguidos na rotina laboratorial da Unidade de Micologia do INSA, I.P., as colónias de leveduras isoladas a partir do meio de cultura líquido, *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco) com cloranfenicol, são sempre quantificadas como raras colónias e, nessa situação, salvo se houver pedido expresso do médico, não se efectua o antifungigrama. Para um total de 17 isolamentos, verificámos que o econazol constituiu o fármaco a que a globalidade das estirpes foi sensível *in vitro* (100,0%) seguida do cetoconazol, em 94,1% dos isolamentos, do clotrimazol e do miconazol, em 82,4% dos casos, e do itraconazol, em 76,5% das estirpes isoladas. O fármaco menos eficaz *in vitro* foi o fluconazol, em 52,9% dos isolamentos. No que respeita às diferentes espécies de leveduras isoladas, as estirpes de *Candida parapsilosis* (n = 5) e de *Cryptococcus curvatus* (n = 1) apresentaram o mesmo padrão de sensibilidade para todos os antifúngicos testados, enquanto que para as restantes espécies os resultados mostraram variações, dependendo dos diferentes antifúngicos (Quadro XXI). Caprilli e Crescimbeni (1987), num estudo relativo às actividades *in vitro* de algumas substâncias antimicóticas, concluíram que, para leveduras do género *Candida*, um dos antifúngicos com maior eficácia *in vitro* é a nistatina, fármaco que não foi testado no presente trabalho, uma vez que, em regra, é mais utilizado nas formas diagnosticadas de candidíase vaginal. Os mesmos autores referiram que o clotrimazol constitui, de igual modo, um dos fármacos mais activos *in vitro*, facto confirmado no nosso estudo. Na pesquisa bibliográfica efectuada não encontramos trabalhos especificamente dirigidos à susceptibilidade *in vitro* de leveduras, que afectam a pele ou as unhas, a diferentes antifúngicos. A maioria dos estudos é dirigida aos ensaios laboratoriais de actividade *in vitro* de vários antimicóticos contra leveduras vaginais patogénicas. Mais estudos serão necessários, abrangendo um número maior de estirpes,

dirigidos ao estudo da susceptibilidade *in vitro* de fungos leveduriformes, que afectam os tecidos queratinizados em pacientes diabéticos e não diabéticos, a diversos antifúngicos.

No presente estudo determinámos, também, a susceptibilidade *in vitro* de 31 estirpes de fungos dermatófitos isoladas na população diabética a diferentes antifúngicos pelo método dos discos. Para um total de 31 isolamentos, verificámos que o cetoconazol e o ciclopirox constituíram os fármacos a que a totalidade das estirpes foi presumivelmente sensível *in vitro* (100,0%), seguida do miconazol, em 96,8% dos isolamentos, do clotrimazol, em 90,3% dos casos, e da griseofulvina, em 74,2% das estirpes isoladas. O fármaco menos eficaz *in vitro* foi o fluconazol, em apenas 16,1% dos isolamentos. No que respeita às diferentes espécies de dermatófitos isolados, apenas as estirpes de *Trichophyton soudanense* (n = 2) apresentaram o mesmo padrão de sensibilidade para todos os antifúngicos testados, enquanto que para as restantes espécies os resultados mostraram variações, dependendo dos diferentes antifúngicos (Quadro XXIII). Karaca e Koç (2004), num estudo relativo à susceptibilidade *in vitro* de dermatófitos aos antifúngicos, que compara o método de difusão em disco com o método de referência standardizado proposto pelo NCCLS para fungos filamentosos (“Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard”), concluíram que, para diferentes espécies de dermatófitos do género *Trichophyton*, o fármaco com maior actividade antifúngica contra todos os dermatófitos é a terbinafina. Esse antifúngico não foi testado no presente estudo devido ao seu elevado custo de aquisição para ser utilizado neste tipo de ensaios laboratoriais. Os mesmos autores referiram que a terbinafina e o itraconazol são os agentes antifúngicos mais eficazes *in vitro*, o que está de acordo com diversos estudos anteriores levados a cabo por outros autores (Korting *et al.*, 1995, Fernández-Torres *et al.*, 2000 e Fernández-Torres *et al.*, 2001 citados por Karaca e Koç, 2004). Em contraste, referiram que o fluconazol constitui a droga menos activa *in vitro*, facto confirmado na nossa experiência. Jessup *et al.* (2000), num estudo anterior de susceptibilidade *in vitro* de fungos dermatófitos a diferentes antifúngicos, no qual os mesmos autores pretendiam, também, estabelecer o meio de cultura ideal para induzir o crescimento conidial e avaliar a susceptibilidade de isolados clínicos, concluíram que, para diferentes espécies de dermatófitos do género *Trichophyton* e para diferentes estirpes pertencentes às espécies *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*, a terbinafina possui a actividade antifúngica mais elevada, comparativamente aos outros antifúngicos testados: fluconazol, griseofulvina e itraconazol.

Os valores das CMI do posaconazol, obtidos *in vitro* pelo método E-test, para as estirpes de dermatófitos isoladas na população diabética, encontram-se registados no

Quadro XXIV. Não se encontram, ainda, definidos os critérios de avaliação do fabricante (valores de sensibilidade) para classificar as estirpes como sensíveis, intermédias ou resistentes ao posaconazol. Os nossos resultados serão disponibilizados ao fabricante, constituindo, assim, um pequeno contributo para o estabelecimento dos referidos critérios.

A actividade antifúngica é definida como a capacidade de uma substância interferir negativamente, através de processos físico-químicos, com as funções vitais de um fungo. *In vitro*, a actividade fungistática caracteriza-se pela inibição do crescimento do fungo, à medida que o antifúngico entra em contacto com o microorganismo (Caprilli e Crescimbeni, 1987). O estudo da susceptibilidade *in vitro* constitui contributo importante, antes do tratamento, para a escolha do fármaco mais adequado em cada caso individual, uma vez que ficou demonstrado pelo presente estudo poderem existir resistências *in vitro* para determinados antifúngicos, independentemente de episódios passados de dermatomicoses provocadas por fungos leveduriformes ou por fungos dermatófitos, ou de tratamento antimicótico recente. No decurso do tratamento, a determinação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos tem valor significativo no controlo terapêutico e na detecção do possível aparecimento de resistências (Favel *et al.*, 1995). É importante salientar que os resultados obtidos *in vitro* não devem ser hipervalorizados na perspectiva de constituírem um guia terapêutico predictivo da actividade *in vitro* e do sucesso clínico, dado que, até à data, poucos estudos demonstraram a correlação entre a clínica e os resultados *in vitro* (Van Cutsen, 1988; Dromer, 1995).

No presente estudo, não nos foi possível determinar qual a correlação existente entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, uma vez que, de harmonia com o nosso protocolo, efectuámos colheitas únicas nos doentes diabéticos e, conseqüentemente, não averiguámos o eventual sucesso ou ineficácia da terapêutica antifúngica prescrita. Um dos possíveis objectivos a atingir no prosseguimento deste estudo prospectivo será precisamente a repetição de colheitas num determinado subgrupo de doentes diabéticos com culturas positivas, a avaliação da persistência ou da ausência dos agentes etiológicos anteriormente isolados, e a subsequente avaliação da correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo*. Outro objectivo importante será o de alargar o estudo à Consulta de 1ª vez da APDP, onde serão efectuadas colheitas, de forma aleatória, a doentes com ou sem suspeita de dermatomicose, que se dirigem pela primeira vez a uma consulta da APDP, o que permitirá efectuar um rastreio da população diabética e, posteriormente, determinar a prevalência de dermatomicoses em doentes diabéticos.

5. CONCLUSÕES

- A prevalência de dermatomicoses nos membros inferiores na população diabética (n = 163) foi de 43,6%.
- Na população controlo (n = 141), constituída por pacientes não diabéticos com suspeita clínica de dermatomicose, houve confirmação micológica de dermatomicoses nos membros inferiores em 51,1% dos pacientes.
- Comparando os resultados obtidos entre as duas populações, constatámos que a presença de dermatomicoses foi superior na população controlo.
- Em ambas as populações estudadas, as infeções mais frequentes foram as onicomioses seguidas de *tinea pedis*.
- A distribuição dos agentes etiológicos isolados em doentes diabéticos com culturas positivas foi, por ordem de frequência: fungos leveduriformes 45,5%; fungos dermatófitos 31,3%; outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos 23,2%.
- A distribuição dos agentes etiológicos isolados em pacientes não diabéticos com culturas positivas foi de: fungos leveduriformes 43,8%; fungos dermatófitos 19,1%; outros fungos filamentosos potencialmente queratinofílicos 37,1%.
- A prevalência de infeções fúngicas superficiais provocadas por fungos não dermatófitos tem vindo a aumentar, e devido à similaridade clínica das lesões com as dermatomicoses causadas por fungos dermatófitos, o estudo micológico revela-se essencial para a sua diferenciação, sendo também importante do ponto de vista epidemiológico e terapêutico.
- *Candida spp.* e *Candida parapsilosis* foram as leveduras mais frequentemente isoladas em ambas as populações. *Trichophyton rubrum* foi o fungo dermatófito isolado com maior frequência, em pacientes diabéticos e não diabéticos. No seu conjunto, várias espécies do género *Aspergillus*, com predominância de *Aspergillus flavus* na população diabética e de

Aspergillus versicolor na população controlo, constituíram os fungos filamentosos não dermatófitos mais frequentemente isolados nas duas populações estudadas.

- Verifica-se alguma evidência relativa ao aumento de dermatofitias causadas por espécies antropofílicas, em detrimento das infecções por espécies zoofílicas e geofílicas.
- Em ambas as populações estudadas foram encontradas diversas associações de fungos. A frequência de infecções mistas foi de 8,0% na população diabética e de 6,4%, na população controlo.
- Na população diabética, a correlação dos possíveis factores predisponentes para a infecção com a positividade das amostras demonstrou a existência de associação entre o tipo clínico de diabetes, designadamente a diabetes tipo 2, e a presença de dermatomicoses.
- O econazol constituiu o agente antifúngico a que a totalidade das estirpes de leveduras testadas, provenientes da população diabética, foi sensível *in vitro*. O fármaco menos activo *in vitro* foi o fluconazol.
- A determinação da susceptibilidade *in vitro* de estirpes de dermatófitos pelo método de difusão em agar, utilizando discos impregnados de agentes antifúngicos com diferentes concentrações, constitui uma técnica relativamente simples e rápida, reprodutível e económica, que poderá ser aplicada na rotina laboratorial. No entanto, mais estudos serão necessários para que se verifique a aceitação interlaboratorial e a standardização do método dos discos e dos respectivos critérios de interpretação.
- O cetoconazol e o ciclopirox constituíram os agentes antifúngicos a que a totalidade das estirpes de dermatófitos testadas, provenientes da população diabética, foram presumivelmente sensíveis *in vitro*. O fármaco menos activo *in vitro* foi o fluconazol.

BIBLIOGRAFIA

- Alteras, I. e Saryt, E. (1979). Prevalence of pathogenic fungi in the toe-webs and toe-nails of diabetic patients. *Mycopathologia*, **16**: 157-59.
- APDP – Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal. (2007). *O que é a Diabetes?* Acedido em: 16 de Novembro de 2007, em: <http://www.apdp.pt/diabetes.asp>.
- Araújo, A.J.G., Bastos, O.M.P., Souza, M.A.J. e Oliveira, J.C. (2003). Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *An bras Dermatol*, **78** (3): 299-308.
- Badillet, G., Bièvre, C. e Guého, E. (1987). *Champignons contaminants des cultures. Champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique*. Tome I. Éditions Varia. Paris.
- Badillet, G. (1995). *Dermatophyties et Dermatophytes. Atlas Clinique et Biologique*. 3th Édition. Éditions Varia. Paris.
- Bergold, A.M. e Georgiadis, S. (2004). Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Académica*, **5** (nº 2): 159-72.
- Bernhardt, H., Schulz, K. e Knoke, M. (1996). Mixed *Candida* isolations. Clinical occurrence and cultivations in a continuous flow culture. *Proceedings of the 3rd meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM)*. Lisboa, 9-11 May 1996. Abstract P-3.4.
- Bio-Rad. *Disks for antifungal susceptibility of yeasts. Study of the susceptibility of Candida species to triazole antifungal agents (Fluconazole, Voriconazole)*.
- Caprilli, F. e Crescimbeni, E. (1987). Attività *in vitro* di alcuni farmaci antimicotici. Parte I: Campo di sensibilità di ceppi del genere *Candida*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. *Micologia Dermatológica*, **2**: 147-55.

- Carrillo-Munõz, A.J. (1993). Padrones de sensibilidad a los antifúngicos en *Candida* spp.. *Revista Iberoamericana de Micología*, S13-S17.
- Carrillo-Munõz, A.J. (1994). Estandarizacion de la determinación de la sensibilidad a los antifungicos *in vitro*. *Actas do II Congreso Nacional de Micología*, Santiago de Compostela, 4-7 Julio 1994. Abstract PO 1, pp. S-9.
- Chanussot, C. e Arenas, R. (2007). Infección micótica plantar e interdigital en pacientes con onicomicosis. *Rev Iberoam Micol*, **24**: 118-21.
- Circular Normativa Nº 09/DGCG de 4 de Julho de 2002. *Actualização dos critérios de classificação e diagnóstico da Diabetes Mellitus*. Direcção-Geral da Saúde, Ministério da Saúde. Lisboa.
- Collier, L., Balouws, A. e Sussman, M. (1999). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections Microbiology - Medical Mycology*. Volume 4. 9th Edition, Hodder Headline Group. London.
- Difco Laboratories. (1996). *1996/97 Product Catalog for Microbiology*. Detroit.
- Dromer, F. (1995). Antifungal susceptibility testing: correlation between *in vivo* results. *Proceedings of the 2nd meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM)*. Congress Centre, Brussels, 27-29 April 1995. Abstract form.
- Drouhet, E. (1983). *Generalites sur les Mycoses*. Cours de Micologie Medicale. Institut Pasteur. Paris.
- Drouhet, E. e Dupont, B. (1978). Sensitivity of fungi to antifungal compounds. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.*, **7**: 165-70.
- Enweani, I.B., Ogbonna, C.I. e Kozak, W. (1987). The incidence of candidiasis amongst the asymptomatic female students of the University of Jos, Nigéria. *Mycopathologia*, **99**: 135-41.

- Esteves, J.A., Cabrita, J.D. e Nobre G.N. (1990). *Micologia Médica*. 2ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Esteves, J.A., Poiaraes Baptista, A., Guerra Rodrigo, F. e Marques Gomes, M.A. (1990). *Dermatologia*. 2ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Faggi, E., Pini, G., Campisi, C., Bertellini, C., Difonzo, E. e Mancianti, F. (2001). Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol*, **39**(9): 3382-85.
- Favel, A., Liebermann, M., Michel-Nguyer, A. e Regli, P. (1995). Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species: a comparative study of RPMI, High resolution and Casitone media. *J. Mycol. Méd.*, **5**: 7-12.
- Foss, N.T., Polon, D.P., Takada, M.H., Foss-Freitas, M.C. e Foss, M.C. (2005). Dermatoses em pacientes com diabetes mellitus. *Rev Saúde Pública*, **39** (4): 677-82.
- Fusconi, A. e Filipello Marchisio, V. (1991). Ultrastructural aspects of the demolition of human hair *in vitro* by *Chrysosporium tropicum* charmichael. *Mycoses*, **34**: 153-65.
- Galán-Shánchez, F., Garcia-Martos, P., Marín-Casanova, P. e Mira-Gutiérrez, J. (1996). Yeasts in oropharynx of immunocompromised patients. *Proceedings of the 3rd meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM)*. Lisboa, 9-11 May 1996. Abstract P-7.3.
- Galgiani, J.N., Rinaldi M.G., Polak, A.M. e Pfaller, M.A. (1992). Standardization of fungal susceptibility testing. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **30** (suppl 1): 213-24.
- Ghannoum, M.A. e Edwards Jr, J.E. (1992). *Candida* adherence to epithelial cells. *J. Mycol. Méd.*, **2**: 10-3.

- Ghannoum, M.A., Edwards, K.E. e Edwards Jr, J.E. (1995). Pathogenesis of fungal infections. Em: F., Meunier (ed.), *Invasive fungal infections in cancer patients*, Baillière Tindal. London.
- Grigoriu, D. e Delacrétaz, J. (1979). *Genital and perigenital candidosis*. Nº 2. Cilag-Chemie. Germany.
- Grigoriu, D., Delacrétaz, J. e Borelli, D. (1987). *Medical Mycology*. Editiones Roche. Basle.
- Grillot, R. (1996). *Les Mycoses Humaines: Démarche Diagnostique*. Collection Option Bio. Elsevier.
- Gugnani, H.C. (2002). Nondermatophytic fungi: their role in nature and human infection. *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*, **17**: 109-14.
- Gupta, A.K., Konnikov, N., MacDonald, P., Rich, P., Rodger, N.W., Edmonds, M.W., McManus, R. e Summerbell, R.C. (1998). Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: A multicentre survey. *Br J Dermatol*, **139**: 665-71.
- Hay, R.J. (1994). Drogas antimicóticas – actualidad y futuro. *Actas do II Congresso Nacional de Micología*, Santiago de Compostela, 4-7 Julio 1994. Abstract CONF 2, pp. S-9.
- Hoog, G.S. e Guarro, J. (eds.). (1995). *Atlas of clinical fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili. Baarn and Delft/Reus.
- Interamerican College of Physicians & Surgeons. (2006). *Hispanic-Americans with diabetes urged to maintain healthy feet, prevent and manage nail fungus*. Acedido em: 02 de Novembro de 2006, em: <http://www.icps.org>.
- Järv, H., Naaber, P., Kaur, S., Eisen, M. e Silm, H. (2004). Toenail onychomycosis in Estonia. *Mycoses*, **47**: 57-61.

- Jessup, C.J., Warner, J., Isham, N., Hasan, I. e Ghannoum, M.A. (2000). Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J Clin Microbiol.*, **38** (1): 341-44.
- Karaca, N. e Koç, A.N. (2004). In vitro susceptibility testing of dermatophytes: comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **48**: 259-64.
- Laboratoires Pfizer. (1989). *Les mecanismes de défense au cours des infections fongiques chez l'hôte normal et immunodéprimé*. Paris.
- Lacaz, C.S. (1960). *Manual de Micologia Médica*. Atheneu. Rio de Janeiro.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. e Pedersen J. (2000). Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. Med. Microbiol.*, **49**: 493-97.
- Liu, D., Pearce, L., Lilley, G., Coloe, S., Baird, R. e Pedersen J. (2002). PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. *J. Med. Microbiol.*, **51**: 117-22.
- Lodder, J. (ed.). (1970). *The yeasts. A taxonomic study*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam/London.
- Martins, M.L.M. (1993). *Dermatófitos e sua ocorrência em Portugal*. Trabalho de Síntese apresentado no âmbito das provas de acesso à categoria de Assistente de Investigação. Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Mateus, C.M.B. (2005). *O Pé Diabético: uma revisão*. Acedido em: 28 de Março de 2007, em: <http://www.gaif.net/artigos/SegartigorevisFev2005.pdf>.
- Mendeling, W. (1988). *Vulvovaginal candidosis. Theory and practice*. Springer-Verlag. Berlin.

Minelli, L., Nonino, A.B., Salmazo, J.C., Neme, L. e Marcondes, M. (2003). Diabetes mellitus e afecções cutâneas. *An bras Dermatol*, **78** (6): 735-47.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1998). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard*. NCCLS document M38-P. Wayne, PA: NCCLS.

Odds, F.C. (1995). Testing antifungal sensitivity: is it worth the trouble? *Proceedings of the 2nd meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM)*. Congress Centre, Brussels, 27-29 April 1995. Abstract form.

Odds, F.C., Webster, C.E. e Mayuranathan, P.D. (1988). Candida concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **26**: 277-83.

Onychomycosis. (2007). Acedido em: 10 de Janeiro de 2007, em: http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/other/onychomycosis_general.htm.

Piérard, G.E. e Piérard-Franchimont, C. (2005). The nail under fungal siege in patients with type II diabetes mellitus. *Mycoses*, **48**: 339-42.

Pike, W.J., Clarke, J., Lacey, C.J.N. Hunter, P.A. e Evans E.G.V. (1991). Candida cell wall mannan in the vagina and its association with the signs and symptoms of vaginal candidosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **29**: 305-312.

Pinheiro, P. (2007). Dermatomicoses. [Versão electrónica]. *Mundo Farmacêutico*, **28**. Acedido em: 13 de Agosto de 2007, em: <file:///F:/JASFarma,%20Artigos20%20sobre%20saúde%em%20Portugal.htm>.

Ramos-e-Silva, M. (1995). Infecções cutâneas por fungos – micoses superficiais. [Versão electrónica]. Apoio à Residência Médica, **1** (1): 5-10. Acedido em: 13 de Agosto de 2007, em: <file:///G:/Dissertação%20de%20Mestrado/Artigos/Infecções%20cutâneas%20por%20fungos%20-%20micoses%20superficiais.htm>.

- Romano, C., Massai, L., Asta, F. e Signorini, A.M. (2001). Prevalence of dermatophytic skin and nail infections in diabetic patients. *Mycoses*, **44**: 83-6.
- Rosado, M.L. e Teles, R. (1989). Micoses nos pés, numa amostragem colhida numa fábrica de montagem de automóveis numa região industrial dos arredores de Lisboa. *Arquivos do Instituto Nacional de Saúde*, **14**: 175-78.
- Rosco. (1998). *User's Guide Neo-Sensitabs®. Susceptibility testing*. 10th Edition. Denmark.
- Ryley, J.F. (1986). Pathogenicity of *Candida albicans* with particular reference to the vagina. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **24**: 5-22.
- Sabino, R.F.P. (2002). *Fungos potencialmente queratinofílicos – suas implicações clínicas e ambientais* –. Tese de estágio profissionalizante do Curso de Biologia Microbiana e Genética. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Sandi, R.L. e Rogers, A.L. (1982). Inhibition of adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Mycopathologia*, **77**: 23-6.
- Santos, I.M., Venâncio, A. E Lima, N. (1998). *Fungos contaminantes na indústria alimentar*. Micoteca da Universidade do Minho/Centro de Engenharia da Universidade do Minho. Braga.
- Segretain, G., Drouhet, E. e Mariat, F. (1987). *Diagnostic de laboratoire en Mycologie Médicale*. Maloine. Paris.
- Senet, J.M. e Robert, R. (1995). Physiopathologie des candidosis. *J. Mycol. Méd.*, **5** : 145-66.
- Shu-Hui Tan, C., Hoekstra, E. e Samson, R. (1994). *Fungi that cause superficial mycoses*. Centraalbureau voor Schimmel cultures. Belgium.
- Simpanya, M.F. (2002). Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*, **17**: 1-2.

Sobel, J.D. (1996). Fungal diseases in Genitourinary Medicine. Em: C.C., Kibbler, D.W.R., Mackenzie e F.C., Odds (eds.), *Principles and practice of Clinical Mycology*, John Wiley & Sons. Chichester.

Torres-Rodríguez, J.M. (1996). *In vitro* susceptibility tests for antifungals drugs. *Proceedings of the 3rd meeting of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM)*. Lisboa, 9-11 May 1996. Abstract form.

Torres-Rodríguez, J.M. e Carceller, A. (1993). Factores de patogenicidad en *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología*, S2-S7.

Torres-Rodríguez, J.M. e López-Jodra, O. (2000). Epidemiology of nail infection due to keratinophilic fungi. *Rev. Iberoam. Micol.*, **17**: 122-35.

Van Cutsem, J. (1988). *In-vitro* activity of antifungal in relation to *in vivo* efficacy. Em: J.M., Torres-Rodríguez (ed.). *Proceedings of the X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*, JR Prous Science Publishers, Barcelona, 1988. pp. 218-22.

ANEXOS

ANEXO I

CONSENTIMENTO INFORMADO

Consentimento informado para o estudo: “Pesquisa de dermatomicoses em pessoas com diabetes”

As pessoas com diabetes constituem um grupo com maior predisposição a infecções fúngicas da pele e das unhas (micoses superficiais).

O Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, em colaboração com a Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal, está a desenvolver um estudo que tem como objectivo avaliar a presença de fungos responsáveis por este tipo de micoses na população com diabetes portuguesa.

Às pessoas que colaborarem no estudo serão colhidas amostras e colocadas algumas perguntas com vista ao preenchimento de uma ficha clínica, sendo sempre mantida a confidencialidade dos dados pessoais.

Os resultados das análises realizadas serão entregues ao médico assistente dos doentes para ser efectuado tratamento, no caso de ser diagnosticada uma infecção fúngica.

Em qualquer caso, a sua eventual decisão em não colaborar neste estudo em nada prejudicará o seu tratamento.

Sempre que tenha questões ou dúvidas sobre o estudo por favor contacte:

Nome: _____ Telefone: _____

Morada: _____

CONSENTIMENTO INFORMADO (continuação)

Recebi informação verbal sobre este estudo e compreendo toda a informação escrita neste documento;

Tive oportunidade de a discutir e esclarecer todas as dúvidas;

Aceito participar no estudo e estou ciente que a minha participação é voluntária;

Compreendo que posso solicitar a minha retirada do estudo em qualquer altura e que, se o fizer, não serão comprometidos os futuros cuidados que receberei dos profissionais de saúde;

Percebi, pela descrição feita neste documento, em que medida os meus dados de saúde protegidos serão usados para efeitos de investigação;

Receberei uma cópia deste formulário de Consentimento Informado escrito.

O PARTICIPANTE:

LOCAL E DATA: _____, ___/___/___

NOME (MAIÚSCULAS): _____

ASSINATURA: _____

(no caso do participante ser menor, o consentimento deverá ser assinado por um dos pais ou pelo tutor).

O INVESTIGADOR:

LOCAL E DATA: _____, ___/___/___

NOME: _____

ASSINATURA: _____

PROTOCOLO CLÍNICO

CONSULTA:.....DATA:.....

Nº. DE PROCESSO DO DOENTE:.....MÉDICO:.....

Exame micológico de: pele* unha(s)*
(* indicar localização da lesão)

Sexo: F M **Idade:**..... **Etnia:**..... **Profissão:**.....

Região do País onde reside: Norte Centro Sul Ilhas Outra

Diabetes: Tipo 1 Tipo 2 **Anos de evolução:**..... **Controlo A1c:**.....

Obesidade: não sim **Outras doenças gerais** Quais?.....

Doença vascular periférica: não sim ignora

Úlcera do pé: não sim

Trauma prévio da(s) pele/unha(s):** não sim

Dificuldade/incapacidade para manter higiene apropriada da(s) pele/unhas:** não sim
(** riscar o que não interessar)

Terapêutica hipoglicemiante: AO Insulina

Tratamentos gerais: não Antibióticos Antifúngicos Imunosupressores

Corticosteróides Outros Quais?.....

Data do tratamento:..... **Duração do tratamento:**.....

Tratamentos locais: não Antissépticos Antibióticos Antifúngicos Outros

Quais?.....

Data do tratamento:..... **Duração do tratamento:**.....

Episódio(s) anterior(es) de infecção fúngica: não sim Se sim, onde? na pele na(s) unha(s)

História familiar de infecções fúngicas: não sim Quem?.....

Prática de exercício físico em piscina/ginásio:** não sim

Uso de meias/sapatos de desporto:** não sim **Uso de meias de fibra:** não sim

Animais domésticos: não sim Quais?.....
(** riscar o que não interessar)

PROTOCOLO LABORATORIAL

N.º de Processo do Doente (APDP):.....N.º de Processo (INSA):.....Amostra N.º:.....

Exame micológico de:

Pele Pele

Unha Unha Unha Unha

Data da Sementeira:...../...../.....

Sementeira: Agar Micobiotico Sabouraud c/ cloranfenicol (agar) Sabouraud c/ cloranfenicol (líquido)

Exame directo: Negativo Presença de: esporos filamentos células leveduriformes pseudomicélio

Exame cultural: Negativo Fungo filamentoso Levedura

Repicagem: Meio de cultura:.....

ID 32 C: Identificação por ID 32 C:.....

Identificação de Género/Espécie:.....

Susceptibilidade *in vitro* dos fungos leveduriformes isolados aos antifúngicos:

Sabouraud

	≤ 11 mm	12-19 mm	≥ 20 mm	Resultado (S/I/R)*
Cetoconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Clotrimazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Econazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fluconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Miconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	sem halo	10-14 mm	≥ 15 mm	Resultado (S/I/R)*
Itraconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(* S = Sensível; I = Intermédio; R = Resistente)

Observações:.....

.....

PROTOCOLO LABORATORIAL (continuação)

Identificação de estirpe:.....

Proveniência:.....

Susceptibilidade <i>in vitro</i> de fungos filamentosos aos antifúngicos:				
Mueller-Hinton <input type="checkbox"/>				
	≤ 11 mm	12-19 mm	≥ 20 mm	Resultado
Cetoconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ciclopirox	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Clotrimazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fluconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Miconazol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	sem halo		≥ 10 mm	
Griseofulvina	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Posaconazol (CMI): $\mu\text{g/ml}$				

Observações:.....

.....

.....

ANEXO II

COMPOSIÇÃO DOS LÍQUIDOS DE MONTAGEM

Os líquidos de montagem utilizam-se para exames directos de produtos patológicos e para observação directa de culturas.

- **Hidróxido de potássio (KOH)**

KOH a 30% para pele e unhas 1 gota

O material em estudo é colocado sobre lâmina com uma gota de KOH e coberto com lamela, evitando bolhas de ar. Espera-se o tempo necessário para dissociação do material biológico queratinizado.

- **Água destilada**

Água destilada 1 gota

- **Azul de lactofenol**

Lactofenol

Fenol	20 g
Ácido láctico	16 ml
Glicerol	31 ml
Água destilada	20 ml

Lactofenol Azul de Algodão

Lactofenol	100 ml
Azul anilina	0,1 g

Este corante utiliza-se para exame microscópico de culturas em diferentes condições.

ANEXO III

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura comercializados têm a vantagem de permitir comparação entre os resultados de diferentes laboratórios, sobretudo se se tratar de produtos com características constantes e com larga difusão.

- *Mycobiotic Agar (Difco)* (ou *Agar Micobiótico*)

Bacto Soytone	10,00 g
Bacto Dextrose	10,00 g
Bacto Agar	15,00 g
Cycloheximide	0.50 g
Chloramphenicol	0.05 g

Preparação do meio de cultura:

Suspender 35,6 g em 1000 ml de água destilada e cozer o meio, sem deixar ferver, para dissolução completa.

O pH final deverá ser de 6.5 ± 0.2 , a 25° C.

Autoclavar durante 10 min., a 115° C.

Este meio é selectivo para fungos filamentosos contaminantes, sendo usado exclusivamente para o isolamento de fungos dermatófitos, uma vez que nenhum dermatófito é sensível à ciclo-heximida e ao cloranfenicol. A adição de ciclo-heximida ao meio de cultura inibe o desenvolvimento de fungos saprófitas e de bactérias.

- ***Sabouraud Dextrose Agar (Difco) com antibiótico*** (Cloranfenicol)

Bacto Neopeptona 10 g

Bacto Dextrose 40 g

Bacto Agar 15 g

Nota: Adição de Cloranfenicol 50 mg

Preparação do meio de cultura:

Suspender 65 g em 1000 ml de água destilada e cozer o meio, deixando ferver, para dissolução completa.

O pH final deverá ser de $5,6 \pm 0,2$, a 25° C.

Autoclavar durante 10 min., a 115° C.

Este meio é selectivo por ter um pH baixo que leva à inibição do crescimento bacteriano. Por outro lado, a adição de antibiótico – cloranfenicol – ao meio de cultura conduz a um isolamento selectivo dos fungos patogénicos (Difco Laboratories, 1996) e inibe, também, o desenvolvimento bacteriano. Dissolve-se o cloranfenicol (50 mg/L) em 10 ml de etanol a 95% e adiciona-se ao meio em fervura. Remove-se do calor, mexe-se bem para dissolução completa e leva-se a autoclavar.

- ***Sabouraud Dextrose Broth (Difco) com antibiótico*** (Cloranfenicol)

Bacto Neopeptona 10 g

Bacto Dextrose 20 g

Nota: Adição de Cloranfenicol 50 mg

Preparação do meio de cultura:

Perfazer com água destilada até 1000 ml. Dissolução dos ingredientes por fervura.

O pH final deverá ser de $5,6 \pm 0,2$, a 25° C.

Autoclavar durante 10 min., a 115° C.

A elevada concentração de dextrose e o pH ácido tornam este meio selectivo para fungos. A neopeptona constitui uma fonte de carbono e de azoto necessária ao crescimento de uma grande variedade de organismos. A dextrose é adicionada ao meio de cultura como fonte de energia. Por outro lado, a adição de antibiótico – cloranfenicol – ao meio de cultura conduz a um isolamento selectivo dos fungos patogénicos (Difco Laboratories, 1996) e inibe, também, o desenvolvimento bacteriano. Dissolve-se o cloranfenicol (50 mg/L) em 10 ml de etanol a 95% e adiciona-se ao meio em fervura. Remove-se do calor, mexe-se bem para dissolução completa e leva-se a autoclavar.

- **Malte Agar (Difco) com antibiótico (Cloranfenicol)**

Extracto de malte	30 g
Peptona micológica	5 g
Agar	15 g

Nota: Adição de Cloranfenicol 50 mg

Preparação do meio de cultura:

Perfazer com água destilada até 1000ml. Dissolução dos ingredientes por fervura.

Autoclavar durante 10 min., a 115° C.

Este meio é bastante rico e recomendado como alternativa ao meio de Sabouraud para estimular a esporulação numa vasta gama de fungos, incluindo os fungos dermatófitos. É utilizado para o isolamento, quantificação e identificação de fungos filamentosos e leveduriformes. A peptona micológica constitui uma fonte de carbono e de azoto necessária ao crescimento de uma grande variedade de organismos, enquanto que o malte constitui uma fonte de energia. O agar é utilizado como agente solidificante. Por outro lado, a adição de antibiótico – cloranfenicol – ao meio de cultura conduz a um isolamento selectivo dos fungos patogénicos (Difco Laboratories, 1996) e inibe, também, o desenvolvimento bacteriano.

Dissolve-se o cloranfenicol (50 mg/L) em 10 ml de etanol a 95% e adiciona-se ao meio em fervura. Remove-se do calor, mexe-se bem para dissolução completa e leva-se a autoclavar.

- ***Ureia líquida***

Fosfato monopotássico (Merk)	2 g
Cloreto de Sódio p.a. (Merk)	5 g
Bacto-Peptone	1 g
Solução de Vermelho de fenol a 0,2%	6 ml
Solução de glucose a 10%	10 ml
Solução de ureia a 20%	100 ml

Preparação do meio de cultura:

Pesar 2 g de fosfato monopotássico, 5 g de cloreto de sódio e 1 g de peptona e diluir em 1000 ml de água destilada. Em seguida, aquecer ao bico de Bunsen para dissolução completa. Deixar arrefecer a 55-60° C e juntar 6 ml da solução de vermelho de fenol a 0,2%. Ajustar o pH a 6.8. Em seguida, esterilizar a 121° C durante 20 min.. Deixar arrefecer a 55-60° C e juntar 10 ml da solução de glucose a 10% e 100 ml da solução de ureia a 20%.

- ***Candida ID***[®] (bioMérieux)

Não é possível indicar a composição deste meio de cultura por se tratar de uma informação confidencial, patenteada e registada pela marca bioMérieux.

- **API[®] C Medium (bioMérieux) (7ml)**

Sulfato de amônio	5,000 g
Fosfato monopotássico	0,310 g
Fosfato dipotássico	0,450 g
Fosfato dissódico	0,920 g
Cloreto de sódio	0,100 g
Cloreto de cálcio	0,050 g
Sulfato de magnésio	0,200 g
L-Histidina	0,005 g
L-Triptofano	0,020 g
L-Metionina	0,020 g
Agente Gelificante	0,500 g
Solução de vitaminas	1 ml
Solução de oligo-elementos	10 ml
Água desmineralizada	q.B. 1000 ml

pH final: 6,4 – 6,8 a 20°-25° C

- ***Sabouraud Dextrose Agar (Difco)***

Bacto Neopeptona	10 g
Bacto Dextrose	40 g
Bacto Agar	15 g

Preparação do meio de cultura:

Suspender 65 g em 1000 ml de água destilada e cozer o meio, deixando ferver, para dissolução completa.

O pH final deverá ser de $5,6 \pm 0,2$, a 25° C.

Autoclavar durante 10 min., a 115° C.

- **API[®] Suspension Medium (bioMérieux)**

Água desmineralizada 2 ml

O API[®] Suspension Medium (bioMérieux) destina-se a ser utilizado com os produtos das gamas API, ID 32 C ou ATB[™] como meio de suspensão de microrganismos.

- ***Mueller-Hinton Agar (OXOID)***

Beef, dehydrated infusion from	300,0 g
Casaein hydrolysate	17,5 g
Starch	1,5 g
Agar	17,0 g

Preparação do meio de cultura:

Suspender 38 g em 1000 ml de água destilada e deixar entrar o meio em ebulição para dissolução completa.

O pH final deverá ser de $7,3 \pm 0,1$, a 25° C.

Autoclavar durante 15 min., a 121° C.

ANEXO IV

DISCOS PARA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO*

- Ciclopirox* (50 µg)
- Fluconazol* (25 µg)
- Griseofulvina* (25 µg)
- Itraconazol* (8 µg)
- Cetoconazol** (50 µg)
- Clotrimazol** (50 µg)
- Econazol** (50 µg)
- Miconazol** (50 µg)

* NEO-SENSITABSTM, International Medical Products.

** BIO-RAD.

TIRAS DE E-TEST PARA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO*

- Posaconazol E-test[®] (AB BIODISK) CMI: 0,002-32 µg/ml

ANEXO V

BASES DE DADOS DAS POPULAÇÕES ESTUDADAS

As bases de dados das duas populações estudadas apresentam-se em suporte informático.

- **Base de dados da população diabética** (Ficheiro: Base de dados da população diabética):
 - i. **Folha 1:** Resultado do exame cultural; Identificação de género/espécie de acordo com a localização da lesão; Localização da lesão.
 - ii. **Folha 2:** Resultado do exame cultural; Identificação de género/espécie de acordo com a localização da lesão; Factores predisponentes apurados.

- **Base de dados da população controlo** (Ficheiro: Base de dados da população controlo):
 - i. **Folha 1:** Resultado do exame cultural; Identificação de género/espécie de acordo com a localização da lesão; Localização da lesão; Sexo.