

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Izabella Thays Jacob Felix

Isolamento e identificação de fungos associados às lesões suspeitas de dermatomicoses de pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), e avaliação do uso de Azul de Tripan no exame microscópico direto

Uberaba

2022

Izabella Thays Jacob Felix

Isolamento e identificação de fungos associados às lesões suspeitas de dermatomicoses de pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), e investigação do uso de Azul de Tripán no exame microscópico direto

Dissertação desenvolvida na área de Micologia na Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade

Uberaba

2022

Izabella Thays Jacob Felix

Isolamento e identificação de fungos associados às lesões suspeitas de dermatomicoses de pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), e investigação do uso de Azul de Tripán no exame microscópico direto

Dissertação desenvolvida na área de Micologia na Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade

_____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Examinador 1

Examinador 2

Examinador 3

Dedico este trabalho primeiramente à Deus que me deu forças para concluir minha dissertação e também aos meus pais, Cleide e Eduardo, e aos meus irmãos, Eduardo Matheus e Maria Eduarda, que sempre me apoiaram, acreditaram em mim e seguiram ao meu lado durante esses anos.

RESUMO

Dermatomicoses são doenças fúngicas de ocorrência mundial, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais, e estão entre as doenças dermatológicas mais comuns dos seres humanos. São classificadas como micoses superficiais e têm como causa fungos filamentosos, dermatófitos e não-dermatófitos, e leveduras. Para realizar o diagnóstico dessas infecções fúngicas é realizado o exame clínico das lesões apresentadas, e, quando há suspeita de micose, o médico encaminha o paciente para realização de exame micológico laboratorial, que auxilia na diferenciação das micoses de outras lesões dermatológicas. Além disso, considerando a diversidade de espécies que podem causar dermatomicoses, a identificação do agente etiológico contribui para direcionar o tratamento adequado para cada caso, aumentando as taxas de cura, proporcionando o estabelecimento de medidas profiláticas e gerando dados que podem ser utilizados em estudos epidemiológicos. Sendo assim, torna-se evidente a importância da identificação correta das espécies causadoras de dermatomicoses em humanos. Para essa identificação correta e rápida é necessário que os métodos de diagnóstico sejam aprimorados e sejam acessíveis aos laboratórios de rotina. Por isso, além de isolar e identificar fungos associados às lesões suspeitas de dermatomicoses de pacientes atendidos no setor de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), este estudo visou também melhorar a sensibilidade do exame direto, avaliando a utilização do corante Azul de Tripan (AT) no exame microscópico direto com ou sem KOH, analisado tanto na microscopia direta quanto na microscopia de fluorescência. As amostras coletadas foram utilizadas para realizar uma caracterização das dermatomicoses encontradas na região abrangida pelo HC-UFTM. A onicomicose foi o tipo de infecção mais frequente, seguido por lesões interdigitoplantares. Entre os fungos isolados, 49,5 % eram dermatófitos, 30,7 % eram leveduras e 19,8 % eram fungos filamentosos não dermatófitos (FFND), sendo os gêneros *Trichophyton*, *Candida* e *Scytalidium* os mais frequentes, respectivamente em cada grupo de fungos. A investigação do uso do Azul de Tripan revelou a propriedade exclusiva deste corante fúngico em poder ser utilizado tanto na microscopia de campo claro quanto na microscopia de fluorescência para o diagnóstico de micoses superficiais.

Palavras-chave: dermatomicoses; micoses superficiais; calcofluor white; exame micológico laboratorial; exame direto; azul de tripan.

ABSTRACT

Dermatomycoses are fungal diseases of worldwide occurrence, with higher prevalence in tropical and subtropical regions, and are among the most common dermatological diseases in humans. They are classified as superficial mycoses and are caused by filamentous fungi, dermatophytes and non-dermatophytes, and yeasts. To make the diagnosis of these fungal infections, a clinical examination of the lesions presented is performed, and, when there is a suspicion of mycosis, the doctor refers the patient to a laboratory mycological examination, which helps in the differentiation of mycoses from other dermatological lesions. In addition, considering the diversity of species that can cause dermatomycoses, the identification of the etiological agent contributes to directing the appropriate treatment for each case, increasing cure rates, providing the establishment of prophylactic measures and generating data that can be used in epidemiological studies. Therefore, the importance of correctly identifying the species that cause dermatomycoses in humans becomes evident. For this correct and fast identification it is necessary that the diagnostic methods are improved and accessible to routine laboratories. Thus, in addition to isolating and identifying fungi associated with suspected dermatomycosis lesions in patients seen in the Outpatient Dermatology Unit at the Clinical Hospital of the Federal University of Triângulo Mineiro (HC-UFTM), this study also aimed to improve the sensitivity of the direct examination, evaluating the use of Trypan Blue (TA) dye in the direct microscopic examination with or without KOH, analyzed both in direct microscopy and in fluorescence microscopy. The collected samples were used to characterize the dermatomycoses found in the region covered by the HC-UFTM. Onychomycosis was the most frequent type of infection, followed by interdigitoplar lesions. Among the isolated fungi, 49.5% were dermatophytes, 30.7% were yeasts and 19.8% were non-dermatophytic filamentous fungi (FFND), with the genera *Trichophyton*, *Candida* and *Scytalidium* being the most frequent, respectively in each fungal group. The investigation of the use of Trypan Blue revealed the unique property of this fungal dye in being able to be used both in bright field microscopy and in fluorescence microscopy for the diagnosis of superficial mycoses.

Keywords: dermatomycoses; superficial mycoses; calcofluor white; laboratory mycological examination; direct examination; trypan blue.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	15
3 METODOLOGIA.....	16
3.1 AMOSTRAS.....	16
3.2 EXAME MICROSCÓPICO DIRETO	16
3.2.1 Utilização do clarificador Hidróxido de Potássio (KOH).....	16
3.2.2 Utilização dos corantes Calcofluor White (CW) e Azul de Tripán (AT) em microscopia óptica, microscopia confocal e microscopia de imunofluorescência	17
3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.....	17
3.3.1 Análise em meio de cultura cromogênico.....	17
3.3.2 Microcultivo em lâmina.....	18
3.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	18
3.4.1 Microcultivo em lâmina.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DERMATOMICÓSES	20
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	21
5 ARTIGO.....	24
CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por fungos, chamadas de micoses, podem ser superficiais, subcutâneas e sistêmicas. As infecções superficiais atingem pele, pelos, unhas e mucosas. Por outro lado, as infecções subcutâneas comprometem tecidos subcutâneos e podem eventualmente se disseminar. As micoses sistêmicas envolvem um ou mais órgãos, frequentemente causando quadros graves. As micoses de pele, pelos e unhas, denominadas dermatomicoses, estão entre as doenças infecciosas mais comuns em seres humanos, principalmente em regiões em desenvolvimento e tropicais, afetando cerca de 25 % da população mundial. Seus agentes causadores são leveduras e fungos filamentosos dermatófitos e não-dermatófitos. A distribuição desses fungos varia de acordo com algumas características, como clima, área geográfica, fatores culturais e condições socioeconômicas (SILVA *et al.*, 2014; ARAYA *et al.*, 2020; KALEKHAN *et al.*, 2020; RAVID *et al.*, 2020).

As dermatomicoses causadas por fungos dermatófitos são as principais e, nesse caso, são classificadas como dermatofitoses. Os dermatófitos são fungos capazes de degradar a queratina e utilizá-la como principal fonte nutricional, sendo chamados, assim, de fungos queratinofílicos. Porém, fungos não queratinofílicos, como os considerados oportunistas ou fungos filamentosos não-dermatófitos (FFND), também podem ser causadores de tais micoses e têm sido registrados com maior frequência nos últimos anos (SILVA *et al.*, 2014; PIHET *et al.*, 2015; ARAYA *et al.*, 2020).

Apesar das infecções fúngicas superficiais não causarem condições graves, sendo, em alguns casos, até mesmo assintomáticas, são consideradas um problema de saúde pública devido à sua alta prevalência, o impacto socioeconômico que provocam e por afetar diretamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Por isso, não devem ser negligenciadas. Têm alta frequência em populações com baixo nível econômico, condições de higiene e saneamento básico precários, podendo afetar qualquer faixa etária, mas com maior incidência entre adultos e idosos. Fatores como o uso de sapatos fechados por períodos prolongados, roupas justas e práticas de atividades físicas, que aumentam a umidade da pele pela transpiração, também contribuem para o aumento dessas infecções, além do estado imunológico do

indivíduo acometido. Esses e outros fatores associados levaram ao aumento da incidência de dermatomicoses em todo o mundo nas últimas décadas (MEDRANO *et al.*, 2006; SILVA, 2012; PIHET *et al.*, 2017; KALEKHAN *et al.*, 2020).

Em relação às dermatofitoses, elas podem ser classificadas de acordo com o local da infecção, utilizando-se a palavra *tinea* seguida pelo termo em latim que designa o local particular do corpo onde a lesão se desenvolve. Assim, quando ocorrem nos pés podem ser chamadas de *tinea pedis*; *tinea manuum* nas mãos, *tinea cruris* em lesões inguinais, púbicas e perineais; *tinea capitis* no couro cabeludo, *tinea barbae* na área facial dos homens e *tinea unguium* nas unhas (ZHAN *et al.*, 2017).

Os fungos dermatófitos são representados por três gêneros, sendo eles *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, os quais incluem cerca de 50 espécies como agentes etiológicos das doenças fúngicas em humanos e outros animais. Esses fungos podem ser divididos de acordo com seu habitat em antropofílicos (predileção por seres humanos), zoofílicos (associados aos animais) e geofílicos (isolados no solo) (KUTLUBAY *et al.*, 2017).

Dentre os dermatófitos, aqueles do gênero *Trichophyton* são os isolados com maior frequência, sendo as seguintes espécies as principais causadoras de infecções: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton soudanense* e *Trichophyton violaceum*. No que se refere às infecções de pele e unha, as espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale* são as mais comuns. Os fungos do gênero *Microsporum* estão relacionados principalmente às micoses capilares, sendo as espécies *M. canis*, *M. gypseum* e *M. audouinii* isoladas na maioria dos casos. Em relação ao gênero *Epidermophyton*, somente a espécie *E. floccosum* apresenta patogenicidade para os seres humanos (SILVA, 2012; KUTLUBAY *et al.*, 2017; ZHAN *et al.*, 2017).

Entre os FFND associados às dermatomicoses estão os gêneros *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Fonsecaea* e *Curvularia*. Esses são fungos geralmente saprófitos, de distribuição ubíqua, amplamente presentes no solo. Durante muito tempo, quando isolados de lesões suspeitas de dermatomicoses, os FFND eram considerados

apenas contaminantes, devido ao fato de não serem queratinofílicos. Entretanto, o número de infecções associadas aos FFND tem aumentado nos últimos anos. Estudos atuais têm demonstrado a prevalência deles especialmente nas micoses que acometem as unhas, o que pode ser explicado, por exemplo, pelo uso de materiais não esterilizados em salões de beleza, além de outros fatores que favorecem a disseminação desses microrganismos. Porém, como a patogenicidade dos FFND não está bem definida, seu isolamento primário em cultura deve ser confirmado através de isolamento secundário, podendo assim confirmar o fungo como causa da infecção, quando ausente espécies de dermatófitos (SILVA, 2012; MORALES-CARDONA *et al.*, 2013; TUPAKI-SREEPURNA *et al.* 2017; BITEW, 2018).

Por fim, as dermatomicoses também podem ser causadas por leveduras, afetando pele, unhas e regiões interdigitais. Os gêneros *Candida*, *Trichosporon* e *Malassezia* são os mais comuns. Dentre esses, as espécies do gênero *Candida* são as mais comumente recuperadas de amostras clínicas, sendo *Candida albicans* a principal. No entanto, infecções por *Candida* não-albicans (CNA), como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. krusei* e *C. glabrata*, têm aumentado dramaticamente nos últimos anos (SILVA, 2012; ALENCAR *et al.*, 2017; GARCIA *et al.*, 2020).

Para o diagnóstico das dermatomicoses, primeiramente é realizado o exame clínico das lesões. Dependendo do grau de evidência clínica, o médico pode encaminhar o paciente para realização de exame micológico laboratorial ou fazer apenas o diagnóstico clínico. O exame micológico tem extrema importância para diferenciação das micoses de outras lesões dermatológicas não micóticas, que podem ser semelhantes visualmente, como psoríase, dermatite de contato, vitiligo, líquen plano, lesões traumáticas das unhas, entre outras. Para as distrofias ungueais, por exemplo, cerca de 50 % dos casos são de origem fúngica, sendo a outra metade causada por uma variedade de condições. Portanto, a investigação laboratorial apresenta grande importância para o diagnóstico correto. Além disso, a identificação do fungo causador das lesões direciona um tratamento específico e adequado, resultando em uma maior taxa de cura para os pacientes afetados, além de proporcionar ao médico possibilidades de estabelecer medidas profiláticas, como o

tratamento de animais de estimação, face à detecção de uma espécie zoofílica de dermatófito. Por fim, a identificação dos fungos também é importante para estudos epidemiológicos que buscam conhecer as espécies mais frequentes em uma determinada região (CALADO, 2005; PIHET, GOVIC, 2017).

No caso específico de onicomicoses, o “European Onychomycosis Observatory” afirma que a maioria dos clínicos gerais e cerca de 60 % dos dermatologistas não realizam amostragem em caso de suspeita de dermatofitose. Isso pode explicar a ineficiência de alguns tratamentos antifúngicos e pode ser prejudicial para os pacientes, levando-se em consideração a alta frequência de onicomicoses por fungos não dermatófitos, os quais costumam ser mais difíceis de erradicar do que os dermatófitos. Portanto, antes de iniciar o tratamento, é altamente recomendável coletar sistematicamente amostras de unhas para análise micológica, que deve ser realizada em um laboratório especializado com uma equipe experiente e de acordo com procedimentos rigorosos (PIHET, GOVIC, 2017).

Os métodos micológicos de diagnóstico incluem a coleta da amostra da lesão, seguido pela realização do exame microscópico direto com hidróxido de potássio (KOH) e da cultura em meios para isolamento e identificação acurada do agente etiológico. A associação desses dois métodos é considerada o “padrão ouro” de diagnóstico nas micoses superficiais. Nos laboratórios de análises clínicas, esses métodos são escolhidos por apresentarem baixo custo e serem de execução simples, sendo facilmente realizados por um profissional da área que esteja habilitado e tenha experiência. Outras técnicas também podem ser utilizadas para o diagnóstico final, como os métodos moleculares, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). No entanto, apesar de apresentar maior sensibilidade e especificidade, esses métodos requerem a utilização de equipamentos e materiais especializados, que geralmente apresentam alto custo, dificultando sua utilização nos laboratórios de rotina. Com isso, os métodos convencionais continuam sendo utilizados com maior frequência, pois permitem uma resposta rápida para os médicos, gerando resultados positivos ou negativos para elementos fúngicos, no caso do exame direto, ou uma identificação em nível de gênero/ espécie, no caso da cultura. A utilização dos dois

métodos certamente fornece resultados mais confiáveis, uma vez que ambos se completam (PIHET *et al.*, 2017; NORIKI *et al.*, 2016; SAUNTE *et al.*, 2019).

Apesar do exame microscópico direto representar uma técnica de triagem simples e barata, também apresenta frequentemente resultados falso-negativos, podendo chegar a 15 % dos casos. Isso se deve a diversos fatores, como a qualidade do material coletado e a experiência do profissional, além do fato do KOH apresentar dificuldade para digerir alguns espécimes clínicos, principalmente unhas, o que pode impedir a visualização das estruturas fúngicas. A sensibilidade do exame direto pode ser aumentada significativamente com o uso de fluoróforos, como o Calcofluor White (CW), o qual se liga à quitina presente na parede celular dos fungos, permitindo uma rápida detecção desses microrganismos ao microscópio de fluorescência (PANASITI *et al.*, 2006; COBÔ *et al.*, 2010; BAO *et al.*, 2018; AFSHAR *et al.*, 2018)

Estudos têm mostrado também o potencial da microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) no diagnóstico rápido de infecções fúngicas, tanto *in vivo* como *ex vivo*, principalmente nos casos de onicomicoses. Cinotti *et al.*, 2013 afirmam que a técnica de MCVL *in vivo* é uma ferramenta útil para o diagnóstico de onicomicose, sendo não invasiva, rápida e fácil de realizar, permitindo visualizar as hifas diretamente na placa ungueal, sem a necessidade de qualquer preparo das unhas. Por outro lado, na análise *ex vivo* um fluoróforo é usado para detectar elementos fúngicos nos fragmentos de unhas. Krammer *et al.*, 2020 utilizaram o fluoróforo laranja de acridina e demonstraram que a MCVL pode ser usada com sucesso para a detecção ultrarrápida de fungos nas unhas, sendo que essa técnica mostrou ainda melhor sensibilidade do que os exames padrão ouro usados rotineiramente, como o exame direto com KOH e a cultura para fungos. Porém, a baixa especificidade da técnica (57,58 %) torna a MCVL *ex vivo* primariamente como ferramenta de triagem para o diagnóstico de infecções fúngicas das unhas. Os autores desse trabalho destacaram também a importância de testar a combinação de outros fluoróforos e lasers de diferentes comprimentos de onda para tentar melhorar a especificidade da técnica.

LIESCHE e colaboradores (2015) demonstraram que o azul de tripan (AT), um corante azoico tradicionalmente utilizado em ensaios para verificar a viabilidade de

células, se liga à quitina e outros glicanos da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, emitindo forte fluorescência vermelha, sob microscopia confocal, com um padrão de coloração semelhante àquele do CW, porém, mais estável. Após dois minutos, a intensidade da fluorescência do AT diminui em cerca de 5 %. O CW, por sua vez, apresenta uma diminuição de 25 % no mesmo intervalo de tempo. Além disso, a coloração pelo AT é imediata, sem praticamente nenhuma autofluorescência de fundo.

Antes disso, em 2008 Ikeda e colaboradores propuseram a utilização de AT como um novo corante para o diagnóstico de micoses superficiais no exame direto ao microscópio ótico. Esses pesquisadores demonstraram que o AT cora os fungos rapidamente, incluindo espécies de *Candida*, *Malassezia* e dermatófitos, entre 5-10 minutos, sendo observado um aumento na coloração ao longo das horas. Dessa forma, a maioria dos elementos fúngicos tornam-se visíveis, mesmo quando incorporados em espécimes clínicas espessas, como raspados de unhas (Ikeda *et al.*, 2008).

Considerando o potencial do AT para melhorar a sensibilidade do exame direto ao microscópio ótico, junto com a sua propriedade fluorescente e afinidade por polissacarídeos da parede celular de *S. cerevisiae*, um dos objetivos desse trabalho foi avaliar o uso do AT no diagnóstico de dermatomicoses em exames diretos com KOH analisados em microscopia ótica convencional e em microscopia confocal. É importante enfatizar que esse corante ainda não foi testado para o diagnóstico de micoses utilizando MCVL. Portanto, seria a possibilidade de um mesmo corante ser usado para diagnóstico de micoses tanto na microscopia ótica convencional quanto na MCVL.

Além disso, esse trabalho também teve como objetivo avaliar os dados epidemiológicos fornecidos durante as coletas ambulatoriais realizadas para obtenção das amostras fúngicas, uma vez que as informações associadas às espécies mais frequentes isoladas nas dematomicoses em uma determinada região contribuem para aumentar o sucesso do tratamento empírico destas condições naquela região (KOKSAL *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

GERAL

- Isolar e identificar fungos associados às lesões suspeitas de dermatomicoses de pacientes atendidos no ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), e investigar o uso do Azul de Tripán no exame microscópico direto.

ESPECÍFICOS

- Isolar fungos de espécimes clínicos coletados de pacientes com suspeita de dermatomicoses e identificá-los por meio de métodos clássicos;

- Avaliar a utilização do corante Azul de Tripán (AT) no exame microscópico direto com ou sem KOH, analisado tanto na microscopia direta quanto na microscopia de fluorescência.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

Foram coletadas 111 amostras de pacientes com suspeita de dermatomicoses, encaminhados do ambulatório de Dermatologia do HC-UFTM, sob termo de consentimento livre e esclarecido, respeitando as exigências éticas para pesquisas envolvendo seres humanos. Os objetivos deste trabalho fazem parte do projeto intitulado: “Identificação e determinação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos de agentes causadores de dermatomicoses isolados de pacientes no ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM)”, aprovado pelo CEP com número de protocolo 3.254.758.

A coleta do material foi feita por meio de raspagem das áreas infectadas com um bisturi estéril e descartável, ou remoção dessa área com cortador, no caso de unhas. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para o laboratório de microbiologia, onde foram realizadas técnicas clássicas para identificação dos fungos isolados, sendo primeiramente a análise por microscopia direta com KOH e posteriormente o isolamento dos fungos por meio de sementeira dos espécimes clínicos em ágar Sabouraud dextrose (ASD) com Cloranfenicol e em ágar Mycosel.

Durante a coleta, foram anotados dados do paciente como sexo, idade, profissão, tempo de lesão e local da lesão. A utilização recente de antifúngico tópico ou oral (mínimo 14 dias sem uso) foi utilizada como critério de exclusão.

3.2 EXAME MICROSCÓPICO DIRETO

3.2.1 Utilização do clarificador Hidróxido de Potássio (KOH)

Os espécimes clínicos foram analisados microscopicamente, em microscópio óptico (CX41, Olympus®) com aumento de 200 e 400 x, pelo exame direto com KOH. Para isso, foi preparada uma lâmina com a amostra e uma gota de KOH à 10%. As lâminas foram avaliadas microscopicamente quanto à presença de elementos fúngicos, conforme SHENOY *et al.*, 2008.

3.2.2 Utilização dos corantes Calcofluor White (CW) e Azul de Tripán (AT) em microscopia óptica, microscopia confocal e microscopia de imunofluorescência

Após a clarificação com KOH a 10%, as lâminas foram coradas com AT a 0,1% e observados microscopicamente tanto em campo claro quanto em campo escuro através dos microscópios óptico (CX41, Olympus®) e de imunofluorescência.

Após a clarificação com KOH a 10% e a confirmação da presença de elementos fúngicos, as lâminas foram coradas com CW a 0,1% e AT a 0,01% e observados em microscópio laser confocal (LSM-710, Zeiss). O CW foi excitado a 405 nm usando laser diodo e a fluorescência foi adquirida a 400-460 nm. Para o AT, foi utilizado 633 nm de excitação e 627-720 nm de detecção.

Além dos raspados clínicos, foi verificada a capacidade do AT corar as estruturas de fungos causadores de dermatomicoses (dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos). Para isso, amostras de colônias dos fungos crescidos em Agar Sabouraud foram depositadas em lâminas de microscópio e coradas com CW a 0,1% e AT a 0,01, e observadas em seguida em microscópio confocal.

3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

As amostras foram semeadas em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com Cloranfenicol, e incubadas em estufa a 36°C ± 1 por 48 horas. A identificação das leveduras foi realizada por meio da comparação da morfologia microscópica pelo método de microcultivo, e observação da coloração das colônias crescidas em meio de cultura cromogênico.

3.3.1 Análise em meio de cultura cromogênico

Foi realizado cultivo das leveduras (isoladas em ASD a partir de amostras positivas para leveduras no exame direto) em CHROMagar Candida® por 48h a 36°C protegidos da luz. Este teste contribui com a diferenciação das espécies de *Candida*, por meio da coloração diferencial das colônias neste meio. Isto é possível graças a indicadores de pH e fermentação de substâncias específicas contidas no meio (PFALLER *et al.*, 1996).

3.3.2 Microcultivo em lâmina

Esta técnica permite a observação morfológica das leveduras em microscópio, através do crescimento de diferentes estruturas celulares em lâmina. Em Placa de Petri foi colocada uma lâmina sobreposta em um suporte previamente esterilizado. No centro da lâmina foi colocado 3 mL do meio ágar fubá (preparado segundo Lacaz *et al.* 1991) e, após a solidificação do meio, com a ajuda de uma alça de platina flambada, semeou-se a levedura a ser identificada, proveniente de uma cultura de 24-48 h em ASD em 3 estrias paralelas. As estrias foram cobertas com lamínula estéril, e na placa foi colocado um algodão estéril embebido de solução fisiológica, afim de formar uma câmara úmida. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 36°C por 2 a 5 dias, e após o período de incubação foram levadas para a observação das estruturas morfológicas em microscópio óptico em objetiva de 40x.

3.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

As amostras foram semeadas em ASD com Cloranfenicol e em meio seletivo ágar Mycosel, e incubadas em estufa à 28°C por até 4 semanas. A identificação de fungos filamentosos foi realizada através da análise dos aspectos macroscópios e microscópios. Macroscopicamente observou-se o tempo de crescimento, coloração do micélio vegetativo e reprodutivo, e consistência da colônia. Para a análise microscópica foi realizado o microcultivo em ágar batata Dextrose (ABD).

3.4.1 Microcultivo em lâmina

Em Placas de Petri foi colocada uma lâmina apoiada em suporte, ambos esterilizados, e no centro da lâmina foi colocado um fragmento grande e retangular de ABD, onde inoculou-se o fungo a ser identificado em 6 a 8 pontos. O meio foi coberto com lamínula estéril, e na placa de Petri foi adicionado um algodão estéril embebido por solução fisiológica, a fim de formar uma câmara úmida. As placas foram incubadas a 28°C por aproximadamente 14 dias. Vinte e quatro horas antes da análise do microcultivo, foi colocado um novo algodão no interior da placa embebido com formaldeído, a fim de diminuir os riscos biológicos na análise da lâmina. Posteriormente a lamínula foi removida e colocada sobre uma nova lâmina corada com lactofenol (azul de algodão), e levada para a observação das estruturas fúngicas

(hifas, macroconídeos, microconídeos, clamidoconídeos, arthroconídeos etc.) no microscópio óptico em objetiva de 40X (LACAZ *et al.*, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DERMATOMICOSSES

Das 111 amostras biológicas de pacientes que participaram deste estudo, 74 (66,6 %) apresentaram crescimento fúngico nos meios de cultivo utilizados. Dentre essas, 51 (68,9 %) eram de pacientes do sexo feminino e 23 (31,1 %) eram pacientes do sexo masculino. A faixa etária dos indivíduos variou de 14 a 82 anos, com média de 58,40 anos; mediana de 60 e desvio padrão (DP) de $\pm 9,77$ anos. O tempo médio de lesão foi de 4 anos, onde a lesão mais recente tinha 15 dias e a mais antiga cerca de 40 anos.

Diante dessa análise, pôde-se observar que a maior parte dos infectados eram pacientes do sexo feminino (68,9 %). Esse dado condiz com outros estudos realizados no Brasil, como o de Maranhão e colaboradores (2019) realizado em Alagoas, o de Fajardo e colaboradores (2017) realizado em Porto Alegre - RS, e o de Calado e colaboradores (2011) realizado em Natal – RN. Por outro lado, pesquisas realizadas em outros países demonstram uma maior prevalência em pacientes do sexo masculino, como no estudo de Salehi e colaboradores (2018), realizado na Alemanha, no de Tigga e colaboradores (2018), realizado na Índia, e no de Otašević e colaboradores (2019), realizado na Sérvia. Essa diferença de prevalência de gênero em diferentes partes do mundo, provavelmente, ocorre devido às diferenças culturais e hábitos populacionais de cada local. O fato de as mulheres exercerem profissões que mantêm contato frequente com água, como empregadas domésticas, lavadeiras e cozinheiras, mais do que os homens, pode ser um dos fatores que favorecem à infecção fúngica nelas, uma vez que a umidade excessiva leva à maceração da pele, o que pode ser uma porta de entrada para os fungos. Além disso, culturalmente é universal a maior preocupação e cuidado da saúde entre as mulheres comparada com os homens (FAJARDO *et al.*, 2017; HAGHANI *et al.*, 2019).

O tempo médio de presença da lesão fúngica foi de 4 anos, chegando até 40 anos, o que condiz com as micoses superficiais, que comumente se apresentam em caráter crônico ou recorrente (OVRÉN *et al.*, 2016).

Das 74 amostras positivas, foram isolados 101 fungos de diferentes sítios de infecção e/ou do mesmo sítio com coinfeção. Desses, 56 (55,4 %) foram obtidos de

raspados ungueais, dos quais 37 (36,6 %) eram das unhas dos pés e 19 (18,8 %) eram das unhas das mãos. Foram obtidos, também, 26 (25,8 %) isolados de raspado dos pés (região plantar ou interdigital), 8 (8 %) da superfície das mãos (raspado ou interdigital), e 11 (10,8 %) isolados de outras regiões do corpo, como axilas, virilha, nádegas e região lombosacral.

Analisando os locais de infecção afetados, percebe-se que o pé (62,4 %) foi a região mais acometida do corpo, levando em consideração as unhas dos pés (36,6 %) e os raspados das regiões plantar e interdigital (25,8 %). A alta prevalência de infecção nos pés pode estar relacionada ao uso constante de sapatos fechados, que aumenta o suor nos pés, e contribui para um ambiente quente e úmido, ideal para o crescimento fúngico (CALADO *et al.*, 2011; MAZZA *et al.*, 2017). Esses resultados se assemelham a outros encontrados em diferentes estudos, como os de Mosquera e colaboradores (2018) e Silva e colaboradores (2014), nos quais a onicomicose também foi o tipo de infecção mais comumente encontrada entre as dermatomicoses.

Pode-se dizer que *tinea unguium*, seguida de *tinea pedis*, foram os tipos de dermatomicoses mais encontrados neste trabalho, uma vez que a maioria dos isolados de unhas dos pés e raspados plantares/interdigitais eram dermatófitos. De forma semelhante, Mazza e colaboradores (2017) relataram a *tinea unguium* como a principal dermatofitose encontrada no estudo deles.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Dos 101 fungos isolados de diferentes sítios de infecção e/ou do mesmo sítio com coinfeção, 50 (49,5 %) eram fungos dermatófitos, 20 (19,8 %) eram fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) e 31 (30,7 %) eram leveduras.

A tabela 1 demonstra a distribuição dos agentes etiológicos encontrados de acordo com o local de lesão.

Tabela 1 - Fungos isolados de lesões dermatológicas segundo o local de infecção e o agente etiológico.

Agente etiológico n (%)	Local de infecção					Total n (%)
	Unhas dos pés n (%)	Unhas das mãos n (%)	Pés n (%)	Mãos n (%)	Corpo n (%)	
Dermatófitos	15 (14,8)	2 (2)	23 (22,8)	5 (4,9)	5 (4,9)	50 (49,5)
<i>Trichophyton</i> spp.	15 (14,8)	2 (2)	23 (22,8)	5 (4,9)	4 (3,9)	49 (48,5)
<i>Microsporum</i> spp.	-	-	-	-	1 (1)	1 (1)
FFND	12 (11,9)	5 (4,9)	2 (2)	-	1 (1)	20 (19,8)
<i>Scytalidium</i> spp.	6 (5,9)	2 (2)	-	-	-	8 (7,9)
<i>Fusarium</i> spp.	3 (3)	2 (2)	-	-	-	5 (4,9)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	2 (2)	1 (1)	1 (1)	-	-	4 (4)
<i>Cladosporium</i> spp.	-	-	1 (1)	-	1 (1)	2 (2)
<i>Paecilomyces</i> spp.	1 (1)	-	-	-	-	1 (1)
Leveduras	10 (9,9)	12 (11,9)	1 (1)	3 (3)	5 (4,9)	31 (30,7)
<i>Candida</i> spp.	8 (7,9)	9 (8,9)	-	2 (2)	4 (3,9)	23 (22,8)
<i>Trichosporon</i> spp.	2 (2)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	-	6 (5,9)
<i>Rhodotorula rubra</i>	-	1 (1)	-	-	1 (1)	2 (2)
Total	37 (36,6)	19 (18,8)	26 (25,8)	8 (7,9)	11 (10,8)	101 (100)

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Entre todos os fungos, o gênero com maior prevalência foi *Trichophyton* spp., sendo identificado em 49 (48,5 %) isolados. Além deste dermatófito, também foi isolado 1 (1 %) *Microscoporum* spp. na região pubiana de uma paciente do sexo feminino. Dos 50 (49,5 %) dermatófitos encontrados, 23 (22,8 %) estavam presentes nos pés, na região plantar ou interdigital, representando a maioria deles.

Semelhante a estudos feitos em outras regiões do Brasil, como o de Maranhão e colaboradores (2019), realizado em Alagoas, o de Damázio e colaboradores (2005), realizado em Pernambuco, e também estudos de outros países, como o de Kayman e colaboradores (2012), realizado na Turquia, a espécie predominante neste trabalho foi o *Trichophyton* spp., representando quase metade dos isolados.

Dentre os FFND, *Scytalidium* spp., foram os mais prevalentes, apresentando 8 (7,9 %) isolados, seguido por 5 (4,9 %) *Fusarium* spp., 4 (4 %) *Scopulariopsis*

brevicaulis, 2 (2 %) *Cladosporium* sp. e 1 (1%) *Paecilomyces* sp. A região prevalente entre estes foram as unhas dos pés, representando 12 (11,9 %).

Assim como o encontrado no estudo de Maranhão e colaboradores (2019), em nosso estudo houve a presença de FFND, principalmente em onicomicoses, apesar da alta porcentagem de infecções por dermatófitos (49,5 %), as contaminações por fungos filamentosos não dermatófitos representaram quase 20 % do total. Dentro deste grupo, o *Scytalidium* spp. (7,9 %) foi o gênero mais frequente, diferente do que foi encontrado no estudo de Calado e colaboradores (2011), onde destacam a prevalência de *Fusarium* spp., que em nosso estudo também esteve presente, porém com apenas 5 (4,9 %) isolados.

Das 31 (30,7 %) leveduras encontradas, foram isoladas 23 (22,8 %) *Candida* spp., 6 (5,9 %) *Trichosporon* spp. e 2 (2 %) *Rhodotorula rubra*. Desses isolados, 12 (11,9 %) estavam presentes nas unhas das mãos, representando o local de maior prevalência entre as leveduras, seguido pelas unhas dos pés, 10 (9,9 %).

Diferente de outro estudo realizado por nosso grupo em Uberaba por Silva e colaboradores (2014), onde somente as leveduras representaram mais da metade dos isolados identificados em dermatomicoses, no atual trabalho as leveduras representaram apenas 30 %, sendo o gênero *Candida* o mais frequente, como o encontrado por Brilhante e colaboradores (2005).

A identificação de fungos causadores de dermatomicoses e a caracterização da distribuição dos mesmos nas lesões de pacientes de uma determinada região, podem contribuir para decidir a melhor conduta terapêutica, proporcionando um tratamento eficaz para os pacientes, tendo em vista a cura total e o controle de recidivas. A partir deste trabalho, técnicas de biologia molecular poderão ser aplicadas nas diversas amostras, isoladas e armazenadas no laboratório de micologia, para a confirmação da identificação realizada por meio dos métodos clássicos e classificação a nível de espécie dos fungos.

5 ARTIGO

Segue o artigo contendo parte dos dados obtidos durante a realização do presente trabalho de mestrado. O artigo está formatado de acordo com as normas do periódico "Archives of Dermatological Research" no modelo de "Brief Report."

Nesse modelo o manuscrito deve ter no máximo 1200 palavras, 15 referências e até 2 figuras/tabelas.

Brief Report

The role of trypan blue as a conventional and fluorescent dye mixed with potassium hydroxide (KOH) for the diagnosis of superficial mycoses by direct microscopy

Izabella Thays Jacob Felix[†], Beatriz Arfelli Martins[†], Celso Tadeu Barbosa dos Santos[†], Romes José Tristão [‡], Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues[†], Meire Soares de Ataíde [‡], Anderson Assunção Andrade[†], *

[†]Laboratory of Microbiology, Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

[‡]Dermatology Unit, Institute of Health Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

Keywords: Trypan blue, superficial mycoses, direct examination test, fluorescence microscopy.

*Corresponding author:

Anderson Assunção Andrade,

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais.

Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Praça Manoel Terra, 330 – Abadia, Uberaba, MG, 38025-015, Brazil.

Tel: +55 34 3700-6480; e-mail: anderson.andrade@uftm.edu.br

Abstract:

Direct microscopic examination of samples using potassium hydroxide (KOH) is a fast, simple, and inexpensive method to confirm clinical suspicion of superficial mycosis. However, the lack of color contrast in this test makes it difficult to separate any fungal structures from artifacts. The sensitivity of the KOH mount technique may be enhanced by the use of both fluorochromes and conventional stains that highlight the fungal structures when observed under fluorescence microscopy and bright field, respectively. Here we study the possibility of using Trypan Blue (TB), an azo dye which is often used as a live/dead marker, in the diagnosis of superficial mycoses by KOH testing. TB at 0.01% displayed a fluorescent staining pattern similar to that of Calcofluor White (CFW), the conventional cell wall fluorophore. Furthermore, by adjusting the TB concentration to 0.1-0.3%, in addition to maintaining the fluorescent staining pattern, the fungal elements were blue staining visible on bright field. Thus, we demonstrate for the first time that TB has the unique property as a fungal stain that can be used in both bright field and fluorescence microscopy for diagnosis of superficial mycoses by direct microscopic examination.

Introduction:

Superficial mycoses are infections of the skin, nails, hair and mucous membranes caused by a variety of fungi, including dermatophytes, yeasts and nondermatophyte molds. They are estimated to affect 20-25% of the world's population and are most common in tropical and subtropical regions [1].

In many cases, the diagnosis of superficial mycosis is not clinically obvious, and mycological analysis is required [2]. Onychomycosis, for example, can be mistaken for many other infectious or noninfectious nail conditions, such as inflammatory disorders like psoriasis and lichen planus. Only 50% of nail dystrophy is because of fungal infection [3].

Direct microscopic examination of samples using potassium hydroxide (KOH) as a clearing agent is a fast, simple, and inexpensive method to confirm clinical suspicion of superficial mycosis [2, 4]. However, a high rate of false-negatives, ranging between 5% and 15%, has been reported [3]. The sensitivity of direct examination may be enhanced by the use of fluorochromes

(such as Calcofluor White - CFW) and conventional stains, including Evans Blue, Gram, Giemsa, and India ink [5].

The use of Trypan Blue (TB) as a conventional stain for fungi in keratinous tissue has also been previously described [6]. In addition, TB was reported as a fluorescent dye for the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, with a spectral properties superior to the conventional cell wall fluorophore CFW [7]. These staining properties of TB in fungi led us to study the possibility of using it in the diagnosis of superficial mycoses by KOH testing, observed both under conventional light microscope and fluorescence microscope.

Methods:

Skin scrapings or nail fragments were collected from patients with a clinically suspected superficial mycosis who were seen in the Outpatient Dermatology Unit at the Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. This study was approved by the UFTM Ethical Board (protocol 2.623.027). Each clinical specimen was placed on a glass slide, and a drop of 10% KOH was added. After at least 15 min, the samples were stained with a mixture of a drop of CFW stain (0.1% CFW containing 0.05% Evans blue - Sigma-Aldrich) and a drop of 0.01, 0.1 or 0.3% TB (Sigma-Aldrich). Then a cover slip was applied and the slide was further examined on a fluorescent laser microscope (LSM-710; Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany) under fluorescence and light fields. CFW was excited at 405 nm using the diode laser and fluorescence acquired at 400-460 nm spectral range. TB was excited at 633 nm using the red He-Ne laser and detected in the 627-720 nm range.

Results and discussion:

Initially, it was evaluated whether TB can be used as a fluorescent stain for fungal species involved in superficial mycosis (Fig. 1). Reference strains of *Candida albicans* (ATCC 14053) (Fig. 1 A and B) and *Trichophyton rubrum* (ATCC 4438 MYA) (Fig. 1 C and D) were stained with 0.01% TB and visualized under fluorescence microscopy. The fluorescence staining pattern of TB-stained fungal structures (Fig. 1 B and D) matched that of fungal structures

stained with CFW (Fig. 1 A and C). This data is consistent with previous work showing that TB emits strong red fluorescence upon binding to chitin and glucan present in *S. cerevisiae* cell wall and that TB staining shows the same patterns as CFW staining [7].

After confirming that TB could be used as a fluorescent dye to visualize the cell wall of fungal species causing superficial mycosis, we tested its ability to reveal fungal elements in skin scrapings and nail samples by direct microscopic examination. A total of 30 clinical specimens positive for fungal elements were observed. Figure 2 shows representative microscopy images of these observations, where it can clearly be seen that 0.01% TB (Fig. 2 D and H) displayed a fluorescent staining pattern similar to that of CFW (Fig. 2 C and G). However, at this concentration, fungal structures appeared colorless when observed in bright-field (Fig. 2 B and F).

By adjusting the TB concentration to 0.3%, fungal elements were blue staining visible on bright field (Fig. 2 J) and maintained the fluorescent staining pattern in fluorescence microscopy (Fig. 2 L). However, it is important to point out that, as reported by Ikeda et al. [6], there was a problem of precipitation when TB was used at 0.3% with KOH. We observed that the degree of precipitation was considerably reduced when using this dye at 0.1% (data not shown). In addition, fungal elements showed an increase in blue color intensity over time. This observation is in line with Ikeda et al. [6], who noted that TB stain increases by hours, and makes most fungal elements become visible even they are embedded in thick specimens such as in nail scrapings.

Conclusion:

In conclusion, we demonstrate that TB has the unique property as a fungal stain that can be used in both bright field and fluorescence microscopy for diagnosis of superficial mycoses by direct microscopic examination.

Conflict of interest:

The authors declare that there is no conflict of interest.

Funding:

No funding sources. The authors have no funding to disclose.

References:

1. Sharma B, Nonzom S (2021) Superficial mycoses, a matter of concern: Global and Indian scenario-an updated analysis. *Mycoses* 64:890-908. <https://doi.org/10.1111/myc.13264>
2. Pihet M, Le Govic Y (2017) Reappraisal of Conventional Diagnosis for Dermatophytes. *Mycopathologia* 182:169-180. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0071-y>
3. Ghannoum M, Mukherjee P, Isham N, Markinson B, Rosso JD, Leal L (2018) Examining the importance of laboratory and diagnostic testing when treating and diagnosing onychomycosis. *Int J Dermatol* 57:131-138. <https://doi.org/10.1111/ijd.13690>
4. Wilkison BD, Sperling LC, Spillane AP, Meyerle JH (2015) How to teach the potassium hydroxide preparation: a disappearing clinical art form. *Cutis* 96:109-112.
5. Lim SS, Ohn J, Mun JH (2021) Diagnosis of Onychomycosis: From Conventional Techniques and Dermoscopy to Artificial Intelligence. *Front Med (Lausanne)* 8:637216. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.637216>
6. Ikeda I, Nishimoto K, Sasamoto K, Nagira K, Ono T, Ihn H (2008) Alkaline Trypan Blue as a stain for superficial fungi. *Br J Dermatol* 158:1373-1374. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08523.x>
7. Liesche J, Marek M, Günther-Pomorski T (2015) Cell wall staining with Trypan blue enables quantitative analysis of morphological changes in yeast cells. *Front Microbiol* 6:107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00107>

Figure Captions:

Fig. 1 Comparison of cell wall staining of *Candida albicans* (**a** and **b**) and *Trichophyton rubrum* (**c** and **d**) with Calcofluor White (CFW) (**a** and **c**) and Trypan Blue (TB) (**b** and **d**): Typical fungal elements of each species were seen with both CFW and TB, i.e., hyphae and pseudohyphae growth of *C. albicans* with elongated and constricted chains of yeast cells (**a** and **b**), and a mass of septate hyphae with filaments of uniform width in *Trichophyton rubrum* (**c** and **d**).

Fig. 2 Clinical aspects of superficial fungal infections [pityriasis versicolor on the back (**a**), onychomycosis on right toenail (**e**) and dermatophytosis lesions in buttock area (**i**)] and direct examination of samples from these lesions seen under conventional light microscope (**b**, **f** and **j**) and fluorescence microscope after stained with Calcofluor White (CFW) (**c**, **g** and **k**) and Trypan Blue (TB) (**d**, **h** and **l**). Upper panel: numerous short non-septate hyphae with a cluster of spherical yeasts (**b**, **c** and **d**); middle panel: arthroconidia in chain (**f**, **g** and **h**); bottom panel: fragment of septate hyphae (**j**, **k** and **l**).

Fig 1

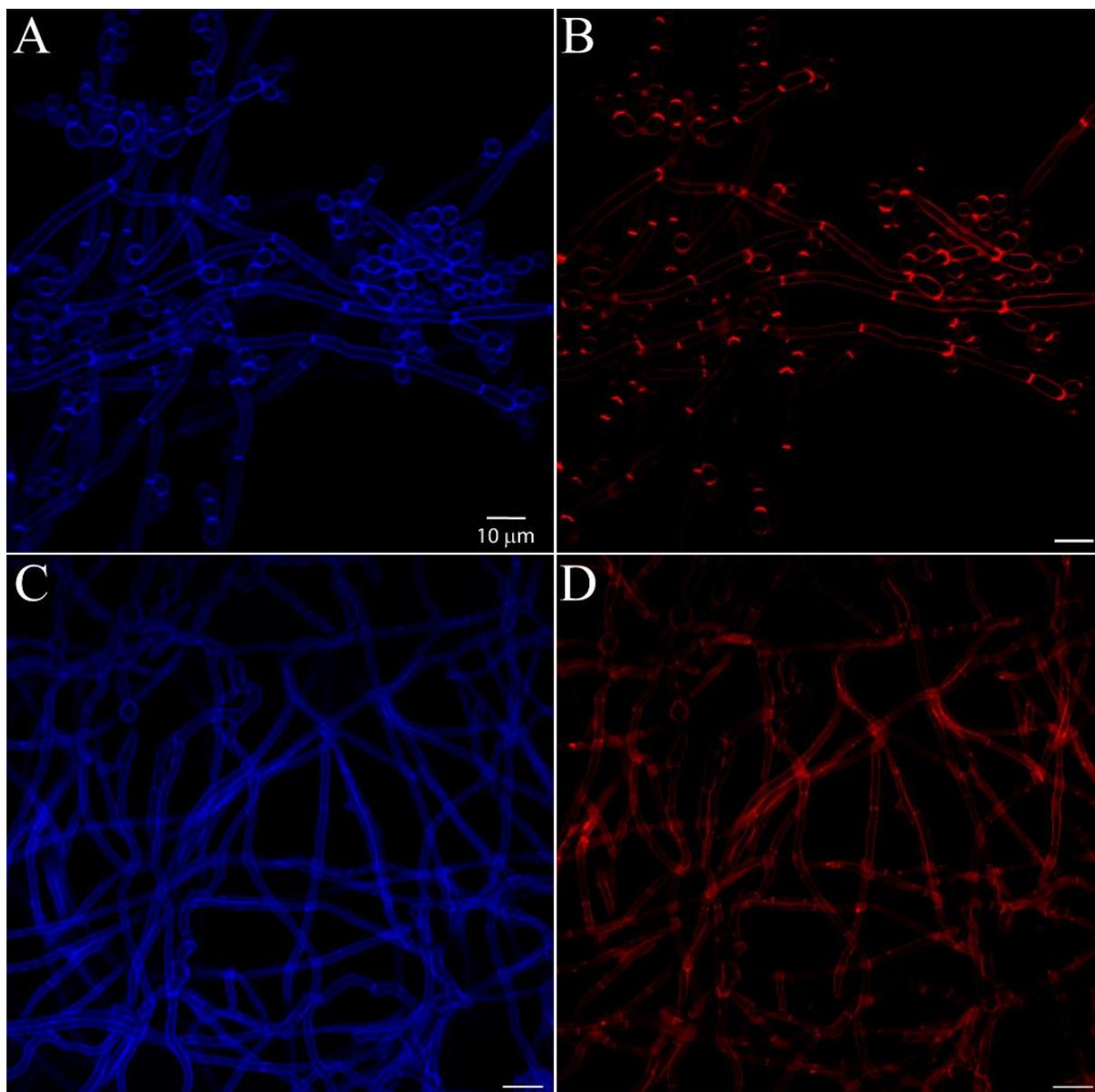
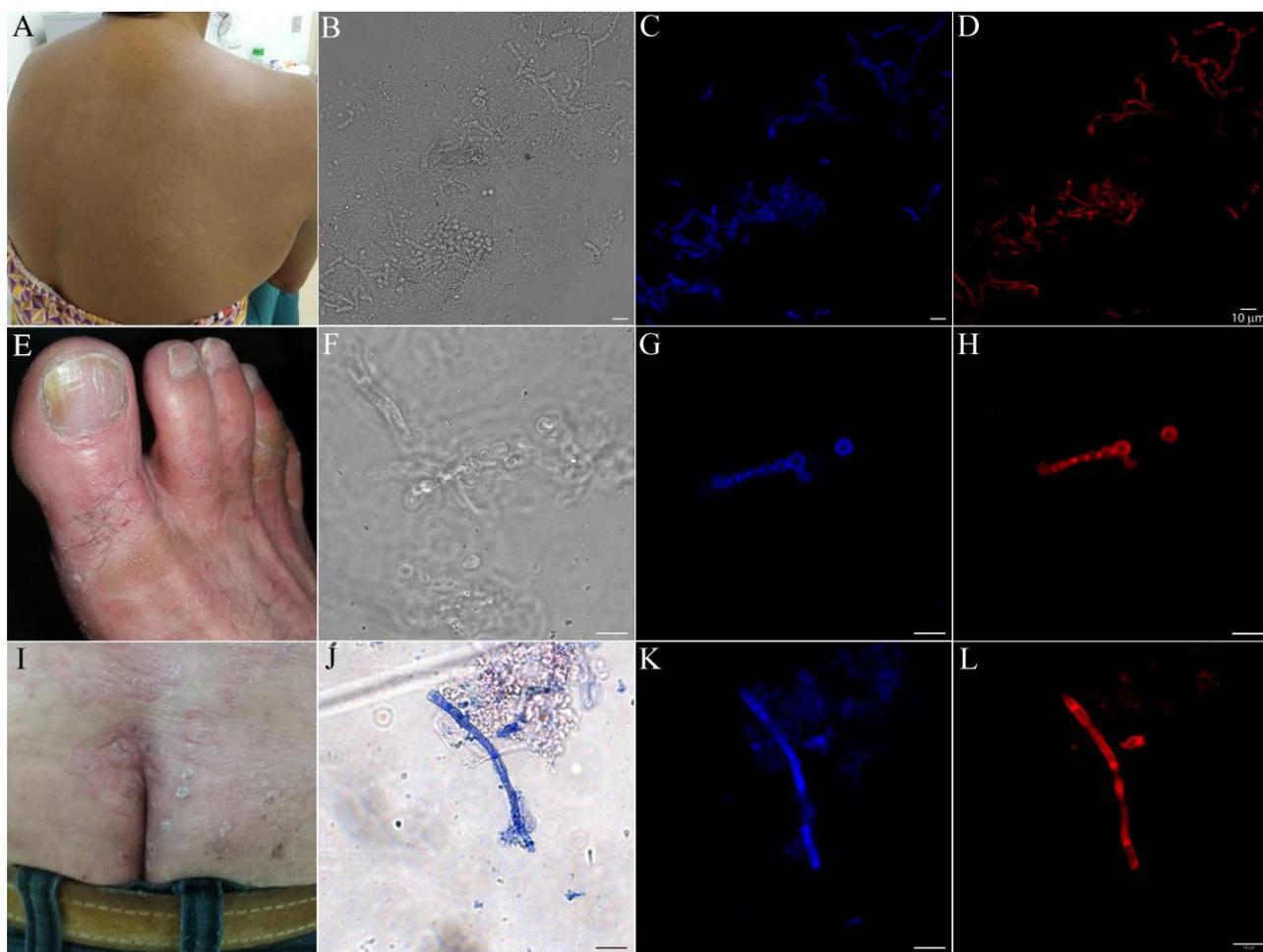


Fig. 2

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, o gênero mais acometido por dermatomicoses foi o feminino e a média de idade atingida foi de 58 anos.

A onicomicose foi o tipo de infecção mais frequente, seguido por lesões interdigitoplantares.

Os dermatófitos foram os fungos mais comuns, sendo que o gênero identificado com maior número de isolados foi o *Trichophyton*, e o tipo de infecção mais frequentemente causado por estes fungos foi a tinea pedis.

Os FFND foram os fungos menos frequentes nas lesões, sendo o gênero *Scytalidium* o mais comum.

As leveduras foram encontradas em quase 1/3 dos isolados, sendo a *Candida* predominante dentre estas.

A investigação do uso do Azul de Tripán no exame microscópico direto neste estudo revelou a propriedade exclusiva deste corante fúngico em poder ser utilizado tanto na microscopia de campo claro quanto na microscopia de fluorescência para o diagnóstico de micoses superficiais.

REFERÊNCIAS

- AFSHAR, P. *et al.* A comparison of conventional rapid methods in diagnosis of superficial and cutaneous mycoses based on KOH, Chicago sky blue 6B and calcofluor white stains. **Iran J. Microbiol.**, v. 10, n. 6, p. 433-440, dez. 2018.
- ALENCAR, D. *et al.* Candidaemia due to *Candida parapsilosis* species complex at a hospital in Brazil: Clinical characteristics and antifungal susceptibility profile. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 34, n. 2, p. 106–108, 2017.
- ÁLVAREZ-MOSQUERA, I. *et al.* Diagnosis of superficial mycoses by a rapid and effective pcr method from samples of scales, nails and hair. **Mycopathologia**, v. 183, n. 5, p.777-783, ago. 2018.
- ARAYA, S. *et al.* Epidemiology of Dermatophyte and Non-Dermatophyte Fungi Infection in Ethiopia. **Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.**, v. 13, p. 291-297, abr. 2020.
- BAO, F. *et al.* Comparison of fungal fluorescent staining and ITS rDNA PCR-based sequencing with conventional methods for the diagnosis of onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology**, v. 32, n. 6, p. 1017-1021, 2018.
- BITEW, A. Dermatophytosis: Prevalence of Dermatophytes and Non-Dermatophyte Fungi from Patients Attending Arsho Advanced Medical Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. **Dermatol. Res. Pract.**, v. 2018, ID 8164757, 2018.
- BRILHANTE, R. *et al.* Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 131-135, 2005.
- CALADO N. B. **Frequência e etiologia das dermatomicoses em pacientes atendidos no Hospital Giselda Trigueiro, Natal/RN.** [Dissertação na Internet]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2005 [acesso em 12 jan. 2012]. 94p. Disponível em: http://btdt.bczm.ufrn.br/tesdesimplificado/tde_arquivos/23/TDE-2007-07-02T040932Z 740/Publico/NicaciaBC.pdf
- CALADO, N. B. *et al.* A 7-year survey of superficial and cutaneous mycoses in a public hospital in Natal, Northeast Brazil. **Brazilian Journal Of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p.1296-1299, dez. 2011.
- CINOTTI, E. *et al.* Confocal microscopy for healthy and pathological nail. **Journal of the European Academy of Dermatology & Venerology**, v. 28, n. 7, p. 853-858, jul. 2014.
- COBÔ, E. *et al.* Evaluation of a modified microscopic direct diagnosis of dermatophytosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 205-207, 2010.
- DAMÁZIO, P. *et al.* Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 484-486, 2007.

FAJARDO, A. D. *et al.* Epidemiological study of surface fungal infections in Itajaí, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 396-400, 2017.

GARCIA, L. *et al.* A Two-Way Road: Antagonistic Interaction Between Dual-Species Biofilms Formed by *Candida albicans*/*Candida parapsilosis* and *Trichophyton rubrum*. **Front. Microbiol.**, v. 11, p. 1980, set. 2020.

HAGHANI, I. *et al.* Molecular identification and antifungal susceptibility of clinical fungal isolates from onychomycosis (uncommon and emerging species). **Mycoses**, v.62, p. 128-143, set. 2019.

IKEDA, I. *et al.* Alkaline Trypan Blue as a stain for superficial fungi. **Br. J. Dermatol.**, v. 158, n. 6, p. 1373, jun. 2008.

KALEKHAN, F. *et al.* Role of Tinea Unguium and Other Factors in Chronic and Recurrent Dermatophytosis: A Case Control Study. **Indian. Dermatol. Online J.**, v. 11, n. 5, p. 747-752, set. 2020.

KAYMAN, T. *et al.* Etiological agents of superficial mycoses in Kayseri, Turkey. **Journal of the European Academy of Dermatology & Venerology**, v. 27, n. 7, p. 842-845, jul. 2013.

KOKSAL, F.; ER, E.; SAMATI, M. Causative Agents of Superficial Mycoses in Istanbul, Turkey: Retrospective Study. **Mycopathologia**, v. 169, p. 117–123, 2009.

KRAMMER, S. *et al.* Ex vivo confocal laser scanning microscopy: a potential new diagnostic imaging tool in onychomycosis comparable with gold standard techniques. **Front. Med.**, v. 7, ID. 586648, nov. 2020.

KUTLUBAY, Z. *et al.* Acral manifestations of fungal infections. **Clinics in Dermatology**, v. 35, p. 28-39, 2017.

LACAZ, C. *et al.* **Meios de cultivo**. In: LACAZ, C. *et al.* Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8ª edição. Sarvier, 1991. cap. 36, p. 557-575.

LACAZ, C.S. *et al.* **Tratado de micologia médica**. 9.ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LIESCHE, J.; MAREK, M.; GUNTHER-POMORSKI, T. Cell wall staining with Trypan blue enables quantitative analysis of morphological changes in yeast cells. **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 107, 2015.

MARANHÃO, F. *et al.* Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Braz. J. Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 969-978, 2019.

MAZZA, M. *et al.* Epidemiology of dermatophytoses in 31 municipalities of the province of Buenos Aires, Argentina: A 6-year study. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 2, p.97-102, abr. 2018.

MEDRANO, D. *et al.* Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.**, v. 48, n. 1, fev. 2006.

MORALES-CARDONA, C. *et al.* Non-dermatophyte mould onychomycosis: a clinical and epidemiological study at a dermatology referral centre in Bogota, Colombia. **Mycoses**, v. 57, p. 284 – 293, 2013.

NORIKI, S.; ISHIDA, H. Production of an anti-dermatophyte monoclonal antibody and its application: immunochromatographic detection of dermatophytes. **Medical Mycology**, v. 54, n. 8, p. 808-815, nov. 2016.

OTAŠEVIĆ, S. *et al.* Species distribution and epidemiological characteristics of superficial fungal infections in Southeastern Serbia. **Mycoses**, v. 62, n. 5, p. 458-465, 2019.

OVRÉN, E. *et al.* Dermatophytosis: fluorostaining enhances speed and sensitivity in direct microscopy of skin, nail and hair specimens from dermatology outpatients. **Mycoses**, v.59, p. 436-441, 2016.

PANASITI, V. *et al.* Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. **Mycoses**, v. 49, n. 1, p. 26-29, jan. 2006.

PFALLER, MA. *et al.* Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 58-61, jan. 1996.

PHIET, M. *et al.* Diagnosis of dermatophytosis: an evaluation of direct examination using MycetColor® and MycetFluo®. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.83, p.170-174, 2015.

PIHET, M.; LE GOVIC, Y. Reappraisal of Conventional Diagnosis for Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, p. 169–180, 2017.

RAVID, A. *et al.* Dermatomycoses in the Israeli defense forces - Epidemiological and clinical aspects. **Mycoses**, v. 63, n. 1, p. 65-70, 2019.

SALEHI, Z.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Antifungal drug susceptibility profile of clinically important dermatophytes and determination of point mutations in terbinafine-resistant isolates. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 10, p.1841-1846, jul. 2018.

SAUNTE, D.M.L. *et al.* A survey among dermatologists: Diagnostics of superficial fungal infections – what is used and what is needed to initiate therapy and assess efficacy?. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.33, n.2, p. 251-256., 2019.

SHENOY, M.M. *et al.* Comparison of potassium hydroxide mount and mycological culture with histopathologic examination using periodic acid-Schiff staining of the nail clippings in the diagnosis of onychomycosis. **Indian. J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, v. 74, p. 226–229, 2008.

SILVA, Larissa Beatriz. **Identificação e determinação do perfil de susceptibilidade a antifúngicos de leveduras e fungos filamentosos isolados de dermatomicoses e avaliação da produção de proteinases e fosfolipases pelas leveduras**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em 2012) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, 2012.

SILVA, L. *et al.* Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. **Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereology**, v. 28, n. 5, p. 633-640, 2014.

TIGGA, R. A. *et al.* Burden of Chronic Dermatophytosis in a Tertiary Care Hospital: Interaction of Fungal Virulence and Host Immunity. **Mycopathologia**, v. 183, n. 6, p. 951-959, nov. 2018.

TUPAKI-SREEPURNA, A. *et al.* Multidrug-resistant *Fusarium* in keratitis: a clinico-mycological study of keratitis infections in Chennai, India. **Mycoses**, v. 60, n. 4, p. 230-233, 2017.

ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p.77-86, out. 2016.